Korelacija aktivnosti PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G u genu za PAI-1

Čolić, Merima

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:541059

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Merima Čolić

Korelacija aktivnosti PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G u genu za PAI-1

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Koagulacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Zadro.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Renati Zadro i dr. sc. Désirée Coen Herak pod čijim je stručnom vodstvu izveden i napisan ovaj diplomski rad, te svim djelatnicima Odjela za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb na strpljenju i pruženoj pomoći.

Veliko hvala roditeljima i sestri koji su mi bili podrška kroz cijelo moje obrazovanje.

Hvala prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studiranje, bez njih se moji planovi nikad ne bi ostvarili.

SADRŽAJ

1 Uvod....1

1.1 Sustav zgrušavanja....1

1.1.1 Inicijacija....1

1.1.2 Amplifikacija....2

1.1.3 Propagacija....2

1.1.4 Inhibicija zgrušavanja....3

1.2 Fibrinoliza....3

1.2.1 Aktivacija plazminogena....4

1.2.2 Inhibicija fibrinolize....4

1.3 Inhibitor aktivatora plazminogena-1....5

1.3.1 Polimorfizmi gena za PAI-1....5

1.3.2 Faktori koji utječu na aktivnost PAI-1....6

2 Obrazloženje teme....9

3 Materijali i metode....10

3.1 Određivanje genotipa PAI-1....10

3.2 Određivanje aktivnosti PAI-1 u plazmi....12

3.3 Statistička analiza podataka....14

4 Rezultati i rasprava....15

4.1 Rezultati....15

4.2 Rasprava....21

5 Zaključci....22

6 Literatura....23

7 Sažetak / Summary....27

7.1 Sažetak....27

7.2 Summary....28

1 UVOD

1.1 SUSTAV ZGRUŠAVANJA

Hemostaza obuhvaća složene, međusobno povezane sustave čija je zadaća održati krv u tekućem stanju u krvožilnom sustavu, ali i omogućiti brzo stvaranje krvnog ugruška nakon ozljede krvne žile (Chan i Paredes, 2013). Prvi važan čimbenik hemostatskog sustava je sustav zgrušavanja, a drugi je aktivacija trombocita koji ne samo da doprinose stvaranju ugruška, nego i ubrzavaju proces zgrušavanja (Versteeg i sur., 2013). Sustav zgrušavanja čini ravnoteža prokoagulacijskog puta koji je odgovoran za stvaranje ugruška i mehanizma inhibicije nastanka ugruška u neoštećenim žilama (Palta i sur., 2014). Poimanje koagulacijske kaskade je osmišljeno na temelju *in vitro* interakcije faktora zgrušavanja: pojedini aktivirani faktor uzrokuje aktivaciju sljedećeg (Bain i sur., 2003).

Tradicionalno se sustav zgrušavanja dijelio na unutarnji i vanjski put zgrušavanja, no takva podjela ne postoji *in vivo* zbog preklapanja učinaka određenih kompleksa faktora zgrušavanja (Colman i sur., 2001). Novi model je stanični model hemostaze i sastoji se od tri faze: inicijacije, amplifikacije i propagacije.

1.1.1 Inicijacija

Faza inicijacije, prije poznata kao vanjski put zgrušavanja, započinje ozljedom endotelnog sloja krvne žile. Trombociti se brzo vežu za mjesto ozljede uz pomoć von Willebrandovog faktora koji se veže za kolagen na subendotelu i glikoprotein Ib na trombocitima. Kolagen potom putem trombocitnog receptora glikoproteina IV aktivira trombocite što dovodi do njihove degranulacije koja uzrokuje otpuštanje pohranjenih proteina među kojima je i djelomično aktivirani faktor V.

Stanice oko vaskulature bogate su tkivnim faktorom (TF) koji na sebe veže faktor VII. Faktor VII se zatim aktivira staničnim proteazama, djelovanjem faktora Xa (nastao djelovanjem kompleksa faktora VIIa i TF) ili autoaktivacijom već nastalog FVIIa. Aktivirani kompleks FVIIa-TF katalizira aktivaciju faktora X i faktora IX. Faktor Xa stvara kompleks s djelomično aktiviranim faktorom V iz trombocita. Kompleks Xa-Va pretvara 5% protrombina u trombin.

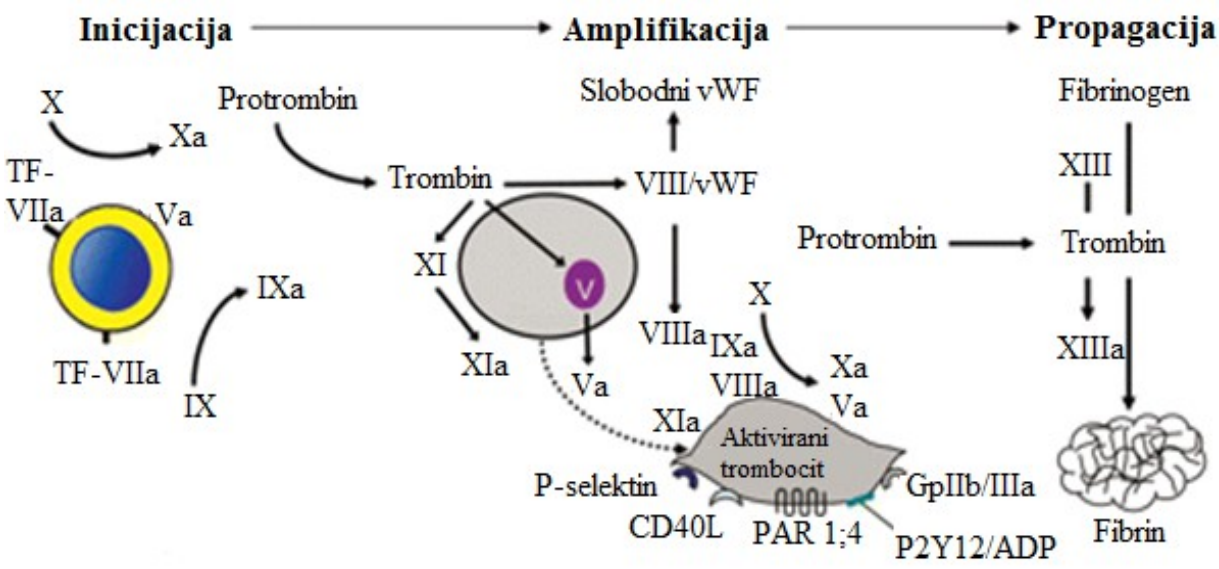
Aktivacijom faktora X također započinje proces regulacije zgrušavanja. Inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI) može vezati faktore Xa i VIIa i tako spriječiti daljno djelovanje kompleksa VIIa-TF. Faktor Xa je u kompleksu s faktorom Va zaštićen od djelovanja antitrombina (Saba i sur., 2014).

1.1.2 Amplifikacija

Trombin se počinje akumulirati i dodatno aktivira trombocite na mjestu ozljede krvne žile vežući se na glikoprotein Ib i receptor aktiviran proteazama 1 (PAR-1). Aktivacija uzrokuje ispoljavanje kiselih fosfolipida na površini trombocita, promjenu konformacije i funkcije nekih staničnih proteina (uključujući i kompleks glikoproteina IIb i IIIa), te već spomenutu degranulaciju. Trombin aktivira faktore V koji je prethodno bio pohranjen u granulama trombocita, kao i onaj koji je cirkulirao plazmom. Faktor VIII se u kompleksu s von Willebrandovim faktorom nalazi vezan za glikoprotein Ib i tu je podložan brzoj aktivaciji trombinom. Trombin također aktivira i faktor XI (Saba i sur., 2014; Versteeg i sur., 2013).

1.1.3 Propagacija

Dok se inicijacijska faza odvijala na stanicama bogatim tkivnim faktorom, propagacija se odvija na stanicama čija površina sadrži prokoagulacijske fosfolipide, a to su aktivirani trombociti. Aktivirani faktor XIa aktivira faktor IX koji krvlju dolazi na aktivirani trombocit i veže se s faktorom VIII u kompleks FVIIIa/ FIXa. Taj kompleks potom aktivira faktor X koji s faktorom V stvara kompleks Xa/Va odgovoran za nastanak dovoljno trombina za stvaranje ugruška. Trombin potom pretvara topivi fibrinogen u fibrin i aktivira i faktor XIIIa koji je transglutaminaza odgovorna za nastanak kovalentnih veza između vlakana fibrina (Versteeg i sur., 2013; Zupančić-Šalek, 2005).



Slika 1. Prikaz triju faza puta zgrušavanja (prilagođeno prema: http://eurheartj.oxfordjournals.org)

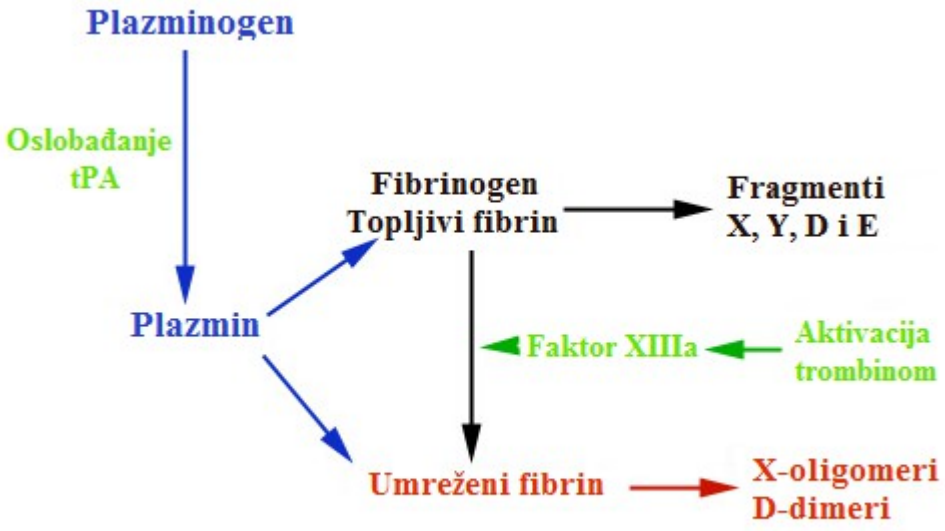
1.1.4 Inhibicija zgrušavanja

Regulacijski mehanizam koji kontrolira zgrušavanje i ograničava širenje ugruška čine inhibitori antitrombin, protein C i protein S (Sallah, 1997). Antitrombin inhibira trombin ireverzibilno ga vežući u kompleks trombin-antitrombin (TAT). Na sličan način antitrombin inhibira i druge aktivirane faktore zgrušavanja (osim faktora VIIIa). Heparin ubrzava reakciju inhibicije 500 puta (Antovic i sur., 2013).

Protein C i protein S su protein ovisni o vitaminu K koji inaktiviraju faktore Va i VIIIa. Protein C je proteolitička komponenta kompleksa, a protein S služi kao kofaktor aktiviranom proteinu C (Esmon i sur., 1987).

1.2 FIBRINOLIZA

Nakon što se ugrušak stvori, fibrinolitički sustav osigurava da se ugrušak razgradi te se uspostavila prohodnost krvne žile kako ne bi došlo do patoloških komplikacija (Chan i Paredes, 2013). Fibrinolitički sustav se često promatra samo kao sekundarni fenomen tj. odgovor na stvaranje tromba, no ta dva procesa su zapravo u dinamičkoj ravnoteži. Ukoliko dođe do abnormalnosti u jednom od tih puteva, može doći do tromboze (Booth, 1999). U fibrinolitičkom sustavu fibrinski ugrušak se razgrađuje djelovanjem serinske proteaze plazmina. Plazmin je proteolitički enzim koji nastaje djelovanjem aktivatora na njegov prekursor plazminogen (www.merckmanuals.com). Njegovim djelovanjem na fibrinogen i fibrin nastaju razgradni produkti: različiti fragmenti (X, Y, D i E) i D-dimer (Antovic i sur., 2013).



Slika 2. Prikaz djelovanja plazmina na fibrinogen i fibrin (prilagođeno prema: http://www.eclinpath.com)

1.2.1 Aktivacija plazminogena

Plazminogen aktiviraju serinske proteaze urokinaza (uPA) i tkivni aktivator plazminogena (tPA). tPA sintetiziraju i otpuštaju endotelne stanice, a uPA monociti, makrofagi i endotelne stanice. uPA ima manji afinitet za plazminogen od tPA, ne treba fibrin kao kofaktor, te većinom djeluje izvan krvnih žila (Chapin i Hajjar, 2015). Plazminogen se sastoji od domene s proteaznom aktivnošću, N-terminalne Pap domene, te pet *kringle* domena. *Kringle* domene su zadužene za interakciju s receptorima na površini stanica i fibrinom. Zbog interakcije s fibrinom, plazminogen iz zatvorene konformacije koja je otporna na aktivaciju prelazi u otvorenu konformaciju na koju aktivatori plazminogena mogu djelovati (Law i sur., 2012). Također, na površini fibrina je plazminogen zaštićen od inaktivacije inhibitorom plazmina kojoj slobodni tPA brzo podliježe (atvb.ahajournals.org).

1.2.2 Inhibicija fibrinolize

U inhibiciji fibinolize sudjeluju brojni faktori među kojima su najvažniji inhibitor plazmina, α_2-makroglobulin, inhibitor fibrinolize aktiviran trombinom, te inhibitori aktivatora plazminogena

Primarni fiziološki inhibitor plazmina je inhibitor plazmina koji regulira fibrinolizu na tri načina:

1. tvori stehiometrijski kompleks sa slobodnim plazminom i na taj način ograničava sistemsko djelovanje plazmina;
2. inhibira adsorpciju plazmina na fibrinski ugrušak i time povećava otpornost ugruška na fibrinolizu;
3. sprječava vezanje plazminogena na fibrin vežući se na isto vezno mjesto (http://practical-haemostasis.com).

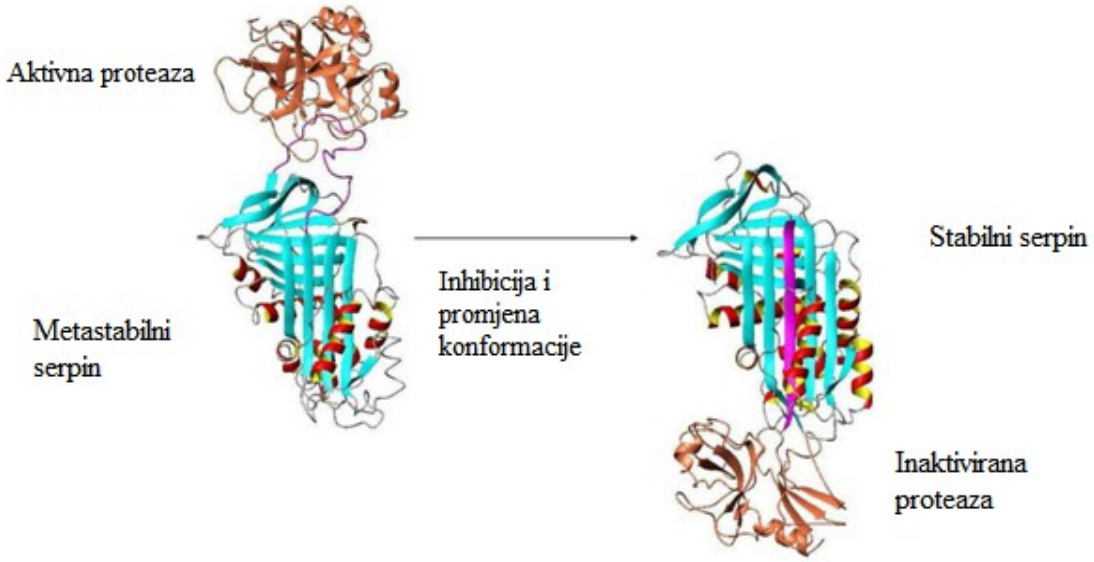
α_2-makroglobulin je inaktivator brojnih proteaza, a na fibrinolizu djeluje inhibirajuće inaktivirajući plazmin.

Inhibitor fibrinolize aktiviran trombinom (TAFI) u svom aktivnom obliku inhibira fibrinolizu uklanjajući lizinske ostatake s fibrinskog ugruška i time sprječava vezanje tPA za ugrušak i aktivaciju plazminogena (http://practical-haemostasis.com).

1.3 INHIBITOR AKTIVATORA PLAZMINOGENA-1

Najvažniji inhibitori tPA i uPA su inhibitori aktivatora plazminogena (PAI) -1 i -2, a dolaze iz obitelji serpina, inhibitora serinskih proteaza. Serpini sadrže reaktivni centar koji nalikuje proteaznom supstratu, pa nastaje inaktivni stehiometrijski kompleks proteaza-serpin. PAI-1 je široko rasprostranjen u tkivima, a sintetizira se u endotelu, jetri, adipoznom tkivu, slezeni, stanicama glatkog mišićnog tkiva, megakariocitima i makrofagima. PAI-2 se sintetizira u posteljici tako da se u plazmi javlja samo u vrijeme trudnoće (Booth, 1999).

PAI-1 je jednolančani glikoprotein (47 kDa) koji se sastoji od 379 do 381 aminokiseline (ovisno o djelovanju peptidaza na N-terminalni kraj) koje čine tri β-ploče (A-C) i devet α-uzvojnica (hA-hI). Može zauzeti tri konformacije: aktivnu, latentnu i oblik supstrata. Za prelazak iz jedne konformacije u drugu ključna je interakcija središnje reaktivne petlje s proteazom. Pri stvaranju kompleksa PAI-1-tPA tj. PAI-1-uPA dolazi do iskrivljenja konformacije proteaze i njeno aktivno mjesto prestaje biti funkcionalno (Yasar Yildiz i sur., 2014).



Slika 3. Prikaz nastanka kompleksa serpin-proteaza; ružičasta boja predstavlja središnju reaktivnu petlju (prilagođeno prema: http://pharmacy.umaryland.edu)

1.3.1 Polimorfizmi gena za PAI-1

PAI-1 je kodiran genom SERPINE1 koji se nalazi na 7. kromosomu (q21.3–q22), sadrži približno 12200 baznih parova, te ga čine 9 eksona i 8 introna. Poznata su tri polimorfizma:

1. polimorfizam *Hind*III - nastaje zbog promjene baze u 3´ netranslatirajućoj regiji,
2. polimorfizam uzrokovan ponavljanjem dinukleotida $(C\text{-}A)_n$,
3. polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji (Kwaan i sur., 2003).

Polimorfizam 4G/5G je uzrokovan insercijom (5G)/delecijom (4G) na položaju -675 u promotorskoj regiji gena za PAI-1. Ovaj polimorfizam utječe na vezanje transkripcijskih faktora: alel 4G na sebe veže pojačivač, dok alel 5G može vezati i pojačivač i supresor što dovodi do niže razine ekspresije gena (Festa i sur., 2003; Francis, 2002).

1.3.2 Faktori koji utječu na aktivnost PAI-1

Aktivnost PAI-1 ovisi o cirkadijalnom ritmu zato što je promotor gena SERPINE1 pod direktnom kontrolom gena *core clock*. Vršak koncentracije postići će se ujutro neovisno o okolišnim i bihevioralnim čimbenicima (Scheer i Shea, 2014; Chong i sur., 2006).

Pojavnost pojedinih genotipova je različita u pojedinim rasama: frekvencija alela 4G je veća kod pripadnika bijele rase nego kod Hispanjolaca i pripadnika crne rase, a to je rezultiralo i većom aktivnosti PAI-1 u toj populaciji (Festa i sur., 2003).

Aktivnost PAI-1 ovisi o spolu - muškarci imaju veću aktivnost od žena (Nienaber i sur., 2008; MacCallum i sur., 1998). Također ovisi i o dobi - aktivnost starenjem raste (Sobel i sur., 2006; Yamamoto i sur., 2005).

Postoje naznake da C-reaktivni protein može poticati ekspresiju gena za PAI-1. Ta povezanost je dokazana u *in vitro* uvjetima, no mehanizam još nije točno poznat i povezanost *in vivo* nije jednoznačno potvrđena (Ji i sur., 2014).

Glukokortikoidi djeluju na brojne faktore hemostaze tako što povećavaju rizik za hiperkoagulabilnost. Osim povećanja broja trombocita, koncentracije fibrinogena i skraćenja protrombinskog vremena, povećavaju i aktivnost PAI-1. Utjecaj djelovanja glukokortikoida na fibrinolitički sustav treba se pratiti kod oboljelih od Cushingovog sindroma (Erem i sur., 2009). Smatra se da se djelovanjem PAI-1 može objasniti izazivanje inzulinske rezistencije i dijabetesa kod dugotrajnog uzimanja glukokortikoida (Tamura i sur., 2015).

1.3.2.1 Uloga PAI-1 u kardiovaskularnim bolestima

Velike epidemiološke studije su pokazale kako povišene koncentracije PAI-1 u plazmi predstavljaju rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Primijećeno je da povišene koncentracije PAI-1 prethode infarktu miokarda, a u stanju poslije preživljenog infarkta predstavljaju prijetnju za novi. Smatra se da bolesnici s alelom 4G imaju veću prijetnju zbog

povećane ekspresije gena (Nikolopoulos i sur., 2014; Ploplis, 2013). Nakon akutnog infarkta miokarda aktivira se renin angiotenzin aldosteronski sustav, a angiotenzin II djeluje na ekspresiju gena za PAI-1 tako što ju povećava, čime se omogućuje hiperkoagulabilno stanje (Vaughan i sur., 1995).

Ateroskleroza je složena bolest koja ovisi o brojnim staničnim, lipidnim i proteinskim komponentama. Pokazana je korelacija koncentracije PAI-1 u plazmi i poznatih faktora rizika za razvoj ateroskleroze poput pretilosti, dijabetesa, hiperinzulinemije i hipertrigliceridemije. Pronađena je povećana ekspresija mRNA za PAI-1 u stanicama koje okružuju aterosklerotski plak. Postoji nekoliko objašnjenja o ulozi PAI-1 u aterosklerozi. PAI-1 bi mogao doprinositi razvoju plaka stabilizirajući matriks djelujući kao uporište za migrirajuće stanice. Također, može stimulirati proliferaciju stanica glatkih mišića i unos lipoproteina LDL koji doprinose rastu plaka. No, druge studije su pokazale kako PAI-1 sprječava razvoj ateroskleroze, tako da njegova točna uloga još nije poznata. Pretpostavlja se da zbog složenosti njegovih uloga u organizmu, djelovanje PAI-1 na aterosklerozu ovisi o strukturi plaka, okolnoj vaskulaturi te različitim proteinima s kojima stupa u interakciju (Ploplis 2013; Diebold i sur., 2008).

PAI-1 djeluje na angiogenezu tako što inhibira aktivaciju receptora za faktor rasta vaskularnog endotela-2 (VEGFR-2), endocitozu tog receptora, te unutarstanični signalni put u kojem sudjeluje faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) nizvodno od njegovog receptora (Wu i sur., 2015).

1.3.2.2 Tumori

Nekoliko studija je pokazalo kako faktori zgrušavanja imaju važnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora. Aktivacija sustava zgrušavanja doprinosi agresivnosti tumora i obratno (Lima i Monterio, 2013). Kao i u razvoju ateroskleroze, istraživanja o ulozi PAI-1 u nastanku i širenju tumora pokazuju oprečne rezultate. Pro-tumorsko djelovanje plazmina se očituje u aktivaciji faktora rasta koji potiču stanice tumora na proliferaciju, migraciju, invaziju i metastaziranje. Antitumorsko djelovanje PAI-1 je inhibicija tPA i uPA koja rezultira smanjenom aktivacijom plazminogena. Osim toga, PAI-1 ima i antiadhezivno djelovanje kojim sprječava vezanje urokinaze za njezin receptor urokinaze (uPAR). Zbog ovih učinaka, pretpostavljalo se da povišene koncentracije PAI-1 predstavljaju pokazatelj boljeg ishoda bolesti, no paradoksalno su uočeni i raličiti mehanizmi kojima PAI-1 djeluje pro-tumorski. Jedan od njih je poticanje angiogeneze izazivanjem migracije endotelnih stanica iz perivaskularnog područja prema tumoru. Također, PAI-1 štiti tumorske stanice od spontane apoptoze tako što inhibira aktivaciju plaminogena u plazmin koji ima ulogu u apoptozi

posredovanoj ligandom Fas. (Fang i sur., 2012). PAI-1 se koristi kao biomarker angiogeneze i invazije tumorskih stanica glioblastoma, te je dokazana korelacija polimorfizma 4G/5G i rizika od nastanka tog oblika tumora (Pooyan i sur., 2015).

1.3.2.3 Dijabetes

Kao što je prethodno navedeno, PAI-1 se sintetizira u adipoznom tkivu, posebice u visceralnom masnom tkivu. Pokazano je kako inzulin, angiotenzin II, glukokortikoidi i neke masne kiseline povećavaju ekspresiju gena za PAI-1 (Skurk i Hauner, 2004). No, pronađeni su i neki dokazi koji idu u prilog teoriji da povišena koncentracija PAI-1 nije samo posljedica pretilost i inzulinske rezistencije, nego da im može biti uzrok (Ma i sur., 2004). Povišena koncentracija PAI-1 u dijabetesu donosi veći rizik od pojave mikrovaskularnih komplikacija (Adly i sur., 2014). Pretpostavlja se da bi PAI-1 mogao biti zanimljiva meta u terapiji dijabetesa i inzulinske preosjetljivosti.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

U novijim studijama se istražuje povezanost aktivnosti PAI-1 u plazmi s mnogim patološkim stanjima, a također se istražuje i PAI-1 kao terapijska meta. Za kliničku je praksu važno znati koji čimbenici i na koji način utječu na aktivnost PAI-1. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u aktivnosti PAI-1 između žena i muškaraca i utvrditi moguću povezanost između aktivnosti PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G u genu za PAI-1.

3 MATERIJALI I METODE

U ovom istraživanju određivanje genotipa i aktivnosti PAI-1 provedeno je u uzorcima 60 ispitanika, 30 žena i 30 muškaraca. Uzorci su prikupljeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb u periodu od 28. siječnja 2015. do 2. rujna 2015. U odabiru pacijenata korišetan je slučajni izbor pri čemu je osnovni kriterij bio postojanje uzorka plazme i uzorka izolirane DNA za istog ispitanika.

3.1 ODREĐIVANJE GENOTIPA PAI-1

Za određivanje genotipa izdvojena je DNA na instrumentu MagnaPure kompletom reagencija MagnaPure (Roche, Švicarska). Uzorci krvi liziraju se inkubacijom u puferu s kaotropnim solima i proteinazom K. DNA se potom veže na magnetizirane staklene čestice, a nevezane supstance se ispiru kroz nekoliko koraka. Tako pročišćena DNA potom se eluira a dobivene koncentracije DNA iznosile su od 50-80 ng/mL.

Nakon toga slijedi određivanje genotipa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu analizom krivulje taljenja korištenjem uređaja LightCycler 2.0 (Roche, Švicarska) i sljedećih reagensa:

1. DNA Master Hybprobe (Roche, Švicarska) – sadrži nukleotide, $MgCl_2$ (10 mM) i Taq DNA polimerazu
2. $MgCl_2$ (25 mM)
3. Sterilna voda
4. Fluorescentno obilježene probe, 20 pmol/mL (TIB MOLBIOL Synthestelabor GmbH, Njemačka):

   PAI-FL 5’-TGACTCCCCCACGTGTCC-3’

   PAI-LCred 5’-ACTCTCTCTGTGCCCCTGAGGGCTCT-3’
5. Početnice, 100 pmol/mL (TIB MOLBIOL Synthestelabor GmbH, Njemačka):

   PAI-f 5’-AGCCAGACAAGGTTGTTGACAC-3’

   PAI-r 5’-CAGAGGACTCTTGGTCTTTCCC-3’ (Wang i sur., 2011).

Postupak određivanja:

Reakcijska smjesa za 1 uzorak (ukupno 16 µl):

10x LC DNA Master Hybprobe (Roche)	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2,4 µl
Sterilna voda	11,08 µl
p PAI-f (100 µl)	0,06 µl
p PAI-r (100 µl)	0,06 µl
proba PAI-FL (20 µl)	0,2 µl
proba PAI-LCred (20 µl)	0,2 µl

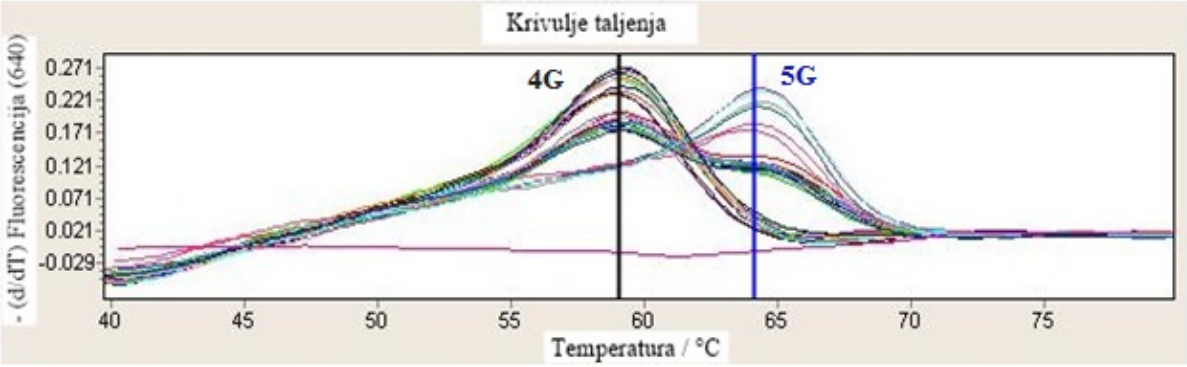
DNA se umnožava pomoću lančane reakcije polimerazom sa specifičnim početnicama i fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim probama prema protokolu u Tablici 1. Šesnaest µl reakcijske smjese se otpipetira u svaku LightCycler kapilaru, te doda 4 µl uzorka DNA ili kontrolnog uzorka. Kao pozitivna kontrola korišteni su uzorci DNA ispitanika poznatih genotipova za PAI-1 (po jedan uzorak za svaki genotip). Kao negativna kontrola korištena je sterilna destilirana voda.

Tablica 1. Program umnažanja postupkom genotipizacije polimorfizma PAI-1 4G/5G

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Denaturacija	95 °C	60sek	1
Umnožavanje	95 °C	1 sek	50
	57 °C	5 sek	
	72 °C	3 sek	
Postupak izrade krivulje taljenja	95 °C	60 sek	1
	40 °C	60 sek	
	80 °C	0 sek	
Hlađenje	40 °C	30 sek	1

Probe prepoznaju samo onu DNA koja im je komplementarna, što povećava specifičnost metode. Pri stvaranju novog lanca, zbog 5'-3' egzonukleaznog djelovanja, polimeraza

razgrađuje probu čime odvaja fluorescentnu boju od prigušivača. Grafičkim prikazom krivulje taljenja i određivanjem temperature taljenja nastalih produkata moguće je razlikovati homozigote 5G/5G i 4G/4G i heterozigote 4G/5G. Homozigot 5G/5G ima jedan vršak i temperaturu taljenja (T_m) 63-64 °C. Homozigot 4G/4G ima jedan vršak i temperaturu taljenja (T_m) 56-57 °C. Heterozigot 4G/5G ima dva vrška i temperature taljenja (T_m) 56-57 °C i 63-64 °C.



Slika 4. Grafički prikaz krivulja taljenja - na temelju vršaka i temperature taljenja moguće je razlikovati homozigote 5G/5G i 4G/4G i heterozigote 4G/5G.

3.2 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PAI-1 U PLAZMI

Određivanje aktivnosti PAI-1 u uzorcima plazme provedeno je na koagulacijskom analizatoru Behring Coagulation Timer (Siemens Medical Solutions, Njemačka) s komercijalno dostupnim reagencijama Berichrom PAI istog proizvođača. Pakiranje reagensa je sljedećeg sastava:

Reagens U (urokinaza)

Reagens P (plazminogen)

Reagens O (kloraminT)

Supstrat plazmina

Otapalo za supstrat

Kontrola (raspon aktivnosti 2,2 – 3,6 U/mL; LOT 518968)

Standard S1 (liofilizirani uzorak PAI standard S1 ljudskog podrijetla s aktivnošću 0,0 U/mL; LOT 518797)

Standard S2 (liofilizirani uzorak PAI standard S2 ljudskog podrijetla s aktivnošću 5,49 U/mL; LOT 518897)

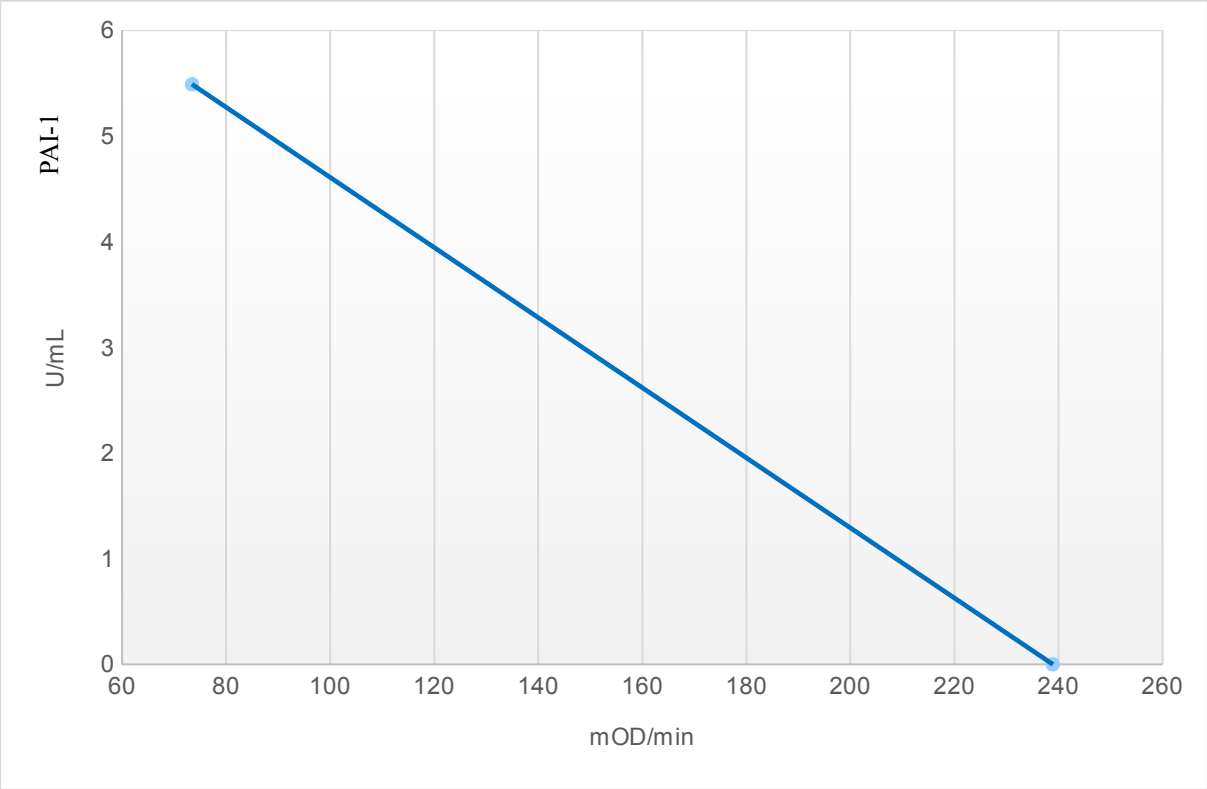
Metoda se temelji na inaktivaciji urokinaze pomoću PAI-1 iz uzorka ispitanika. Aktivnost preostale urokinaze se odredi pretvorbom plazminogena u plazmin. Aktivnost plazmina se zatim odredi mjerenjem optičke gustoće boje (405 nm) koja nastaje djelovanjem plazmina na kromogeni supstrat. Dodatkom oksidansa (kloramin T) spriječi se razorno djelovanje inhibitora plazmina.

$$PAI + urokinaza \rightarrow [urokinaza - PAI] + urokinaza_{(ostatna)}$$

$$plazminogen \xrightarrow{urokinaza_{(ostatna)}} plazmin$$

$$HD - Nva - CHA - Lys - pNA \xrightarrow{plazmin} HD - Nva - CHA - Lys - OH + p - Nitroanilin$$

Na temelju izmjerenih optičkih gustoća standarda napravi se baždarna krivulja prema kojoj se na temelju optičke gustoće uzorka odredi aktivnost PAI-1 u uzorku plazme. Pri tom vrijednost kontrole mora biti u rasponu aktivnosti 2,2 – 3,6 U/mL.



Slika 5. Baždarna krivulja ovisnosti aktivnosti PAI-1 u plazmi o optičkoj gustoći uzorka

3.3 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišten je software SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19). Analiza razlike aktivnosti između pojedinih genotipova je provedena jednosmjernom analizom varijance (ANOVA); p-vrijednost < 0,05 je smatrana statistički značajnom. Analiza razlike aktivnosti između pojedinih genotipova i spolova provedena je višesmjernom analizom varijance (ANOVA) gdje su genotip i spol uzeti kao nezavisne varijable; p-vrijednost < 0,05 je smatrana statistički značajnom. Prije provođenja ANOVA testova, napravljena je analiza distribucije Shapiro-Wilk testom i analiza normalnosti populacije Levenovim testom za homogenost varijance. Analiza razlike aktivnosti između žena i muškaraca unutar pojedinog genotipa provedena je studentovim t-testom; p-vrijednost < 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 REZULTATI

Raspodjela ispitanika prema spolu i dokazanom genotipu za PAI-1 prikazana je u Tablici 2. Shapiro-Wilk test je pokazao da je distribucija unutar svih genotipova te oba spola normalna.

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema spolu i genotipu

Genotip	Žene (N=30)		Muškarci (N=30)		Ukupno (N=60)	
	N	%	N	%	N	%
5G/5G	7	23,3	7	23,3	14	23,3
4G/4G	10	33,3	8	26,7	18	30,0
5G/4G	13	43,3	15	50,0	28	46,7

Rezultati određivanja aktivnosti PAI-1 i genotipa PAI-1 4G/5G u uzorcima plazme i DNA 60 ispitanika prikazani su u Tablici 3. Pri određivanju aktivnosti PAI-1 dobivena je vrijednost kontrole 2,99 U/mL (deklarirani raspon vrijednosti 2,2-3,6 U/mL). Pri određivanju genotipa PAI-1, pozitivne kontrole svih genotipova su bile pozitivne a uzorak negativne kontrole (sterilna voda) bio je negativan.

Tablica 3. Rezultati genotipizacije polimorfizma PAI-1 4G/5G i aktivnosti PAI-1

Ispitanik	Spol	Genotip	Aktivnost PAI-1 (U/mL)
1.	Ž	5G/5G	3,70
2.	Ž	5G/5G	3,73
3.	Ž	5G/5G	1,73
4.	Ž	5G/5G	4,40
5.	Ž	5G/5G	2,59
6.	Ž	5G/5G	1,96
7.	Ž	5G/5G	2,88
8.	M	5G/5G	3,66
9.	M	5G/5G	4,03
10.	M	5G/5G	2,17

Ispitanik	Spol	Genotip	Aktivnost PAI-1 (U/mL)
11.	M	5G/5G	5,87
12.	M	5G/5G	3,23
13.	M	5G/5G	3,04
14.	M	5G/5G	0,97
15.	Ž	4G/4G	2,58
16.	Ž	4G/4G	3,77
17.	Ž	4G/4G	3,14
18.	Ž	4G/4G	1,48
19.	Ž	4G/4G	2,78
20.	Ž	4G/4G	2,34
21.	Ž	4G/4G	1,57
22.	Ž	4G/4G	1,76
23.	Ž	4G/4G	4,12
24.	Ž	4G/4G	2,32
25.	M	4G/4G	3,41
26.	M	4G/4G	2,14
27.	M	4G/4G	3,18
28.	M	4G/4G	2,59
29.	M	4G/4G	2,19
30.	M	4G/4G	3,30
31.	M	4G/4G	3,58
32.	M	4G/4G	3,02
33.	Ž	5G/4G	1,09
34.	Ž	5G/4G	2,68
35.	Ž	5G/4G	4,06
36.	Ž	5G/4G	2,83

Ispitanik	Spol	Genotip	Aktivnost PAI-1 (U/mL)
37.	Ž	5G/4G	0,88
38.	Ž	5G/4G	*
39.	Ž	5G/4G	2,12
40.	Ž	5G/4G	3,26
41.	Ž	5G/4G	2,96
42.	Ž	5G/4G	2,19
43.	Ž	5G/4G	1,91
44.	Ž	5G/4G	2,51
45.	Ž	5G/4G	2,68
46.	M	5G/4G	3,23
47.	M	5G/4G	4,96
48.	M	5G/4G	4,03
49.	M	5G/4G	5,68
50.	M	5G/4G	2,75
51.	M	5G/4G	2,09
52.	M	5G/4G	3,17
53.	M	5G/4G	1,50
54.	M	5G/4G	3,74
55.	M	5G/4G	1,67
56.	M	5G/4G	3,55
57.	M	5G/4G	2,17
58.	M	5G/4G	1,98
59.	M	5G/4G	2,02
60.	M	5G/4G	3,51

* Aktivnost PAI-1 nije mogla biti određena u uzorku ispitanika pod brojem 38 jer je uzorak plazme bio lipemičan

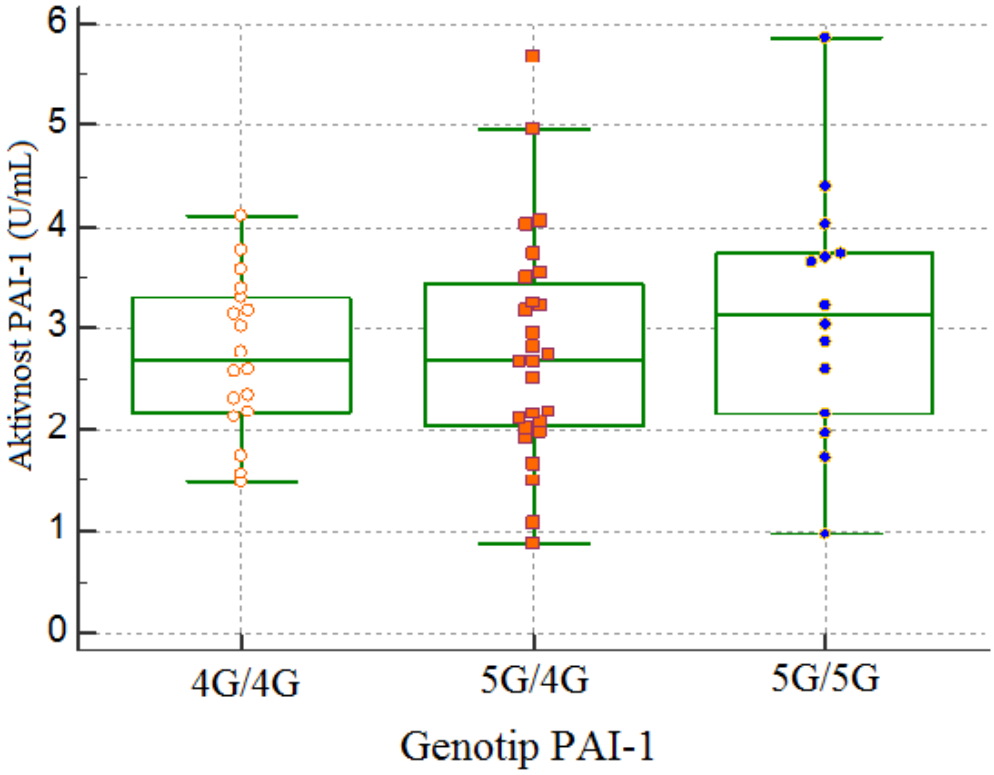
Kako bi se utvrdilo postojanje korelacije između aktivnosti i genotipa PAI-1, napravljena je statistička analiza usporedbe aktivnosti između pojedinih genotipova jednosmjernim ANOVA testom. Prije provedbe ANOVA testa, napravio se Levenov test za homogenost varijance koji je pokazao da su varijance homogene.

Tablica 4. Prikaz srednjih vrijednosti, standardne devijacije i raspona dobivenih vrijednosti aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema genotipu

Aktivnost PAI-1 (U/mL)	Genotip			Svi genotipovi (N=59)
	4G/4G (N=18)	5G/4G (N=27)	5G/5G (N=14)	
$\acute{x}$ ± sd	2,74 ± 0,76	2,79 ± 1,11	3,14 ± 1,25	2,86 ± 1,05
raspon	1,48 – 4,12	0,88 – 5,68	0,97 – 5,87	0,88 – 5,87

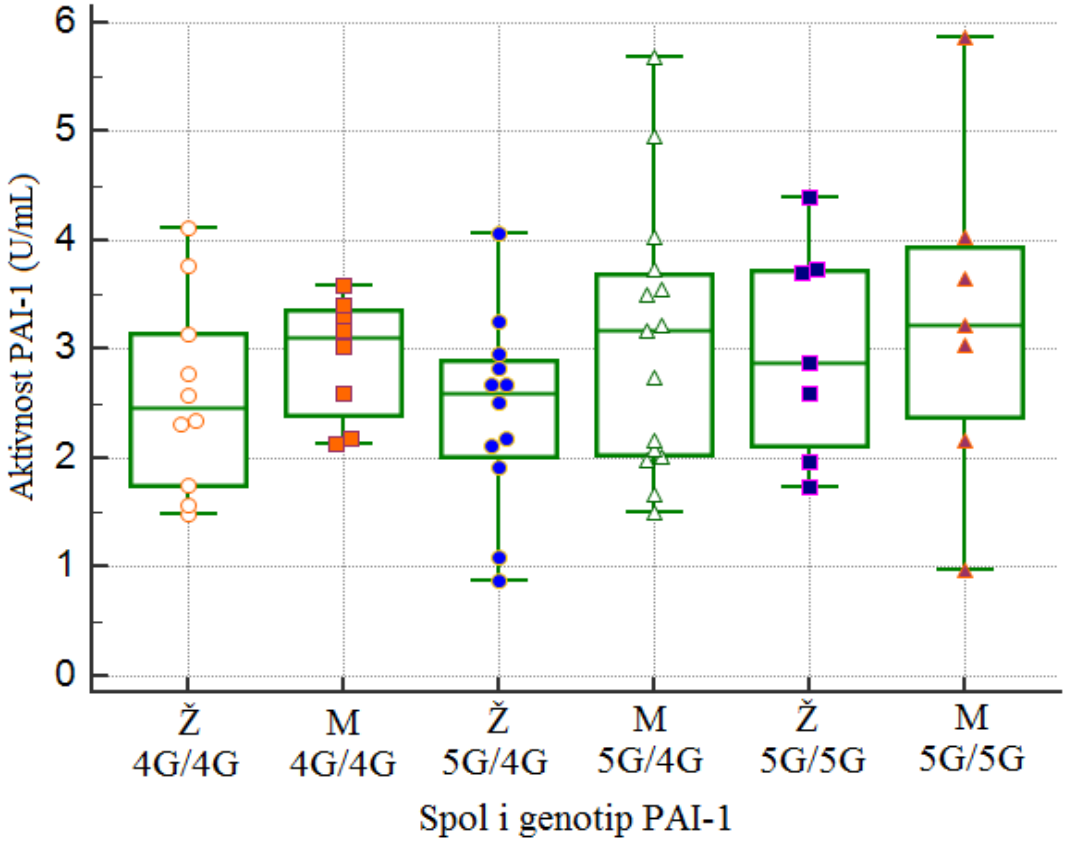
$\acute{x}$: srednja vrijednost; sd: standardna devijacija

Analiza je pokazala da nema značajne statističke razlike u aktivnosti PAI-1 između genotipova (p=0,509).



Slika 6. Prikaz raspodjele aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema genotipu PAI-1

Analiza razlike aktivnosti PAI-1 između pojedinih genotipova i spolova provedena je višesmjernom analizom varijance (ANOVA) gdje su genotip i spol uzeti kao nezavisne varijable. Prije provedbe ANOVA testa, napravio se Levenov test za homogenost varijance koji je pokazao kako su varijance homogene.



Slika 7. Prikaz raspodjele aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema genotipu i spolu

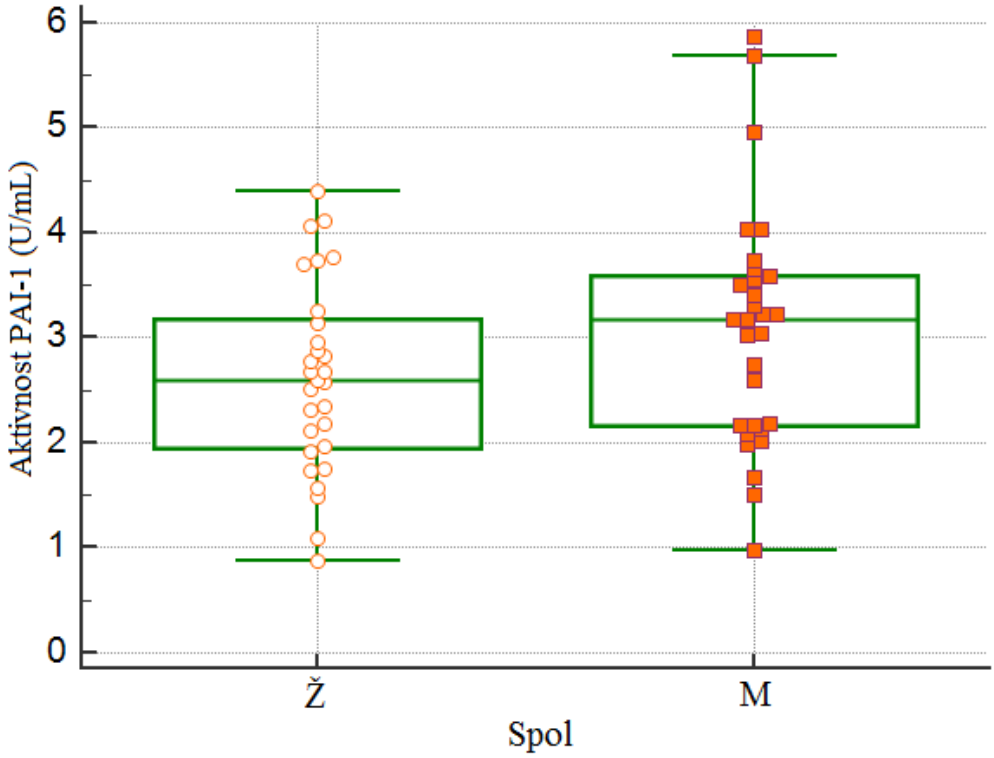
Tablica 5. Prikaz srednjih vrijednosti, standardne devijacije i raspona dobivenih vrijednosti aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema genotipu i spolu

Aktivnost PAI-1 (U/mL)	Genotip					
	4G/4G		5G/4G		5G/5G	
	Žene	Muškarci	Žene	Muškarci	Žene	Muškarci
$\acute{x}$ ± sd	2,59 ± 0,89	2,93 ± 0,55	2,43 ± 0,88	3,07 ± 1,22	3,00 ± 1,00	3,28 ± 1,53
raspon	1,48 – 4,12	2,14 – 3,58	0,88 – 4,06	1,50 – 5,68	1,73 – 4,40	0,97 – 5,87

$\acute{x}$: srednja vrijednost; sd: standardna devijacija

Nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti PAI-1 između grupa ispitanika određenog spola i genotipa (p=0,840).

Usporedba aktivnosti PAI-1 između žena i muškaraca napravljena je korištenjem Studentovog t-testa. Prije provedbe ovog testa napravio se Levenov test za homogenost varijance koji je pokazao da su varijance homogene.



Slika 8. Prikaz raspodjele aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema spolu.

Tablica 6. Prikaz srednjih vrijednosti, standardne devijacije i raspona dobivenih vrijednosti aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanika prema spolu.

Aktivnost PAI-1 (U/mL)	Žene	Muškarci
$\acute{x}$ ± sd	2,62 ± 0,91	3,0 8± 1,14
raspon	0,88 – 4,40	0,97 – 5,87

$\acute{x}$: srednja vrijednost; sd: standardna devijacija

Analiza je pokazala postojanje blagog trenda (p=0,092) prema kojem je aktivnost PAI-1 u uzorku ispitanika viša kod muškaraca u odnosu na žene.

4.2 RASPRAVA

Iako nije dobivena statistički značajna razlika u aktivnosti PAI-1 u plazmi između muškaraca i žena, uočeno je postojanje trenda ($p=0,092$) prema kojem je aktivnost PAI-1 viša kod muškaraca. Prisutnost trenda, a ne statistički značajne razlike ($p<0.05$), može se objasniti malim brojem uzoraka: ukupan broj od 59 uzoraka, tj. 29 uzoraka za žene i 30 uzoraka za muškarce.

Nepostojanje statistički značajne razlike između aktivnosti PAI-1 kod ispitanika različitih genotipova za PAI-1 može se objasniti na više načina. Prvi problem koji je mogao uzrokovati ove neočekivane rezultate je mali broj uzoraka: ukupan broj od 59 uzoraka, tj. 27 uzoraka za genotip 5G/4G, 18 uzoraka za genotip 4G/4G i 14 uzoraka za genotip 5G/5G. Također, nije poznato vrijeme uzorkovanja, a koncentracija PAI-1 ovisi o cirkadijalnom ritmu. Dodatan problem predstavlja nepoznavanje povijesti bolesti ispitanika. Kao što je već navedeno, na ekspresiju PAI-1 utječe velik broj faktora među kojima su dob, pretilost, dijabetes i drugi upalni procesi. Kako se PAI-1 određuje za procjenu rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti, a pretpostavlja se da će se u kliničkoj praksi početi određivati i za procjenu rizika od nastanka dijabetesa i tumora, te se smatra potencijalnom metom za terapiju, bilo je korisno potvrditi korelaciju genotipa i aktivnosti ne uzimajući u obzir i ostale faktore. Iako alel 4G donosi veći rizik od pojave bolesti zbog povećane ekspresije gena, djelovanje drugih faktora također ima snažan utjecaj. Procjena rizika od nastanka bolesti ne može se napraviti samo na temelju poznavanja genotipa, nego se u obzir moraju uzeti i ostali čimbenici.

5 ZAKLJUČCI

1. Nije dokazana korelacija između aktivnosti PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G u genu za PAI-1.

2. Potvrđena je viša aktivnost PAI-1 u plazmi muškaraca od one u plazmi žena.

3. Zbog složenosti patofizioloških poremećaja koji utječu na ekspresiju gena za PAI-1 i aktivnost PAI-1 u plazmi, u kliničkoj praksi se za procjenu rizika u obzir moraju uzeti i drugi faktori.

6 LITERATURA

α_2-Plasmin Inhibitor [historically known as α_2-Antiplasmin], 2012., http://practical-haemostasis.com, pristupljeno 13. 12. 2015.

Adly AA, Elbarbary NS, Ismail EA, Hassan SR. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: relation to diabetic micro-vascular complications and carotid intima media thickness. *J Diabetes Complications,* 2014, 28, 340-347.

Antovic JP, Blombäck M. Essential guide to Blood Coagulation. Chichester, Wiley-Blackwell Publishing, 2013, str. 5.

Bain BJ, Gupta r. A-Z of Haematology. Oxford, Blackwell Publishing, 2003, str. 76.

Booth NA. Fibrinolysis and thrombosis. Baillière's Clinical haematology, 1999, 12, 423-433.

Chan AK, Paredes N. The coagulation system in humans. *Methods Mol Biol,* 2013, 992, 3-12.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev,* 2015, 29, 17-24.

Chong NW, Codd V, Chan D, Samani NJ. Circadian clock genes cause activation of the human PAI-1 gene promoter with 4G/5G allelic preference. *FEBS Lett,* 2006, 580, 4469-4472.

Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, str. 7.

Diebold I, Kraicun D, Bonello S, Görlach A. The 'PAI-1 paradox' in vascular remodeling. *Thromb Haemost,* 2008, 100, 984-991.

Erem C, Nuhoglu I, Yilmaz M, Kocak M, Demirel A, Ucuncu O, Onder Ersoz H. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing's syndrome: increased plasminogen activator inhibitor-1, decreased tissue factor pathway inhibitor, and unchanged thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels. *J Endocrinol Invest,* 2009, 32, 169-174.

Esmon CT, Vigano-D'Angelo S, D'Angelo A, Comp PC. Anticoagulation proteins C and S. *Adv Exp Med Biol,* 1987, 214, 47-54.

Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104, 1470-1484.

Festa A, D'Agostino R Jr, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, Hispanics, and non-Hispanic whites: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation,* 2003, 107, 2422-2427.

Francis CW. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels and Polymorphisms. *arch Pathol Lab med,* 2002, 126, 1401-1404.

History of Discovery: The Tissue-Type Plasminogen Activator Story, 2009., http://atvb.ahajournals.org, pristupljeno 5. 12. 2015.

http://eurheartj.oxfordjournals.org, pristupljeno 30.1.2016.

http://www.eclinpath.com, pristupljeno 4. 12. 2015.

Ji Y, Fish PM, Strawn TL, Lohman AW, Wu J, Szalai AJ, Fay WP.C-reactive protein induces expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 and promotes fibrin accumulation in vein grafts. *J Thromb Haemost,* 2014, 12, 1667-1677.

Kwaan HC, Nabhan C. Hereditary and acquired defects in the fibrinolytic system associated with thrombosis. *Hematol Oncol Clin N Am,* 2003, 17, 103-114.

Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep,* 2012, 1, 185-190.

Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci Rep,* 2013, 33, 701–710.

Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan YF et al. Prevention of Obesity and Insulin Resistance in Mice Lacking Plasminogen Activator Inhibitor 1. *Diabetes,* 2004, 53, 336-346.

MacCallum PK, Cooper JA, Howarth DJ, Meade TW, Miller GJ. Sex differences in the determinants of fibrinolytic activity. *Thromb Haemost,* 1998, 79, 587-590.

Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsangaris I, Tsiara CG, Kopterides P, Vaiopoulos A, Kapsimali V, Bonovas S, Tsantes AE. The association between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) levels, PAI-1 4G/5G polymorphism, and myocardial infarction: a Mendelian randomization meta-analysis. *Clin Chem Lab Med,* 2014, 52, 937-950.

Nienaber C, Pieters M, Kruger SH, Stonehouse W, Vorster HH. Overfatness, stunting and physical inactivity are determinants of plasminogen activator inhibitor-1 activity, fibrinogen

and thrombin-antithrombin complex in african adolescents. *Blood Coagulation and Fibrinolysis,* 2008, 19, 361-368.

Overview of Hemostasis, 2012., http://www.merckmanuals.com, pristupljeno 4. 12. 2015.

Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth,* 2014, 58, 515–523.

Ploplis VA. Effects of altered plasminogen activator inhibitor-1 expression on cardiovascular disease. *Curr Drug Targets,* 2011, 12, 1782-1789.

Pooyan H, Ahmad E, Azadeh R. 4G/5G and A-844G Polymorphisms of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Associated with Glioblastoma in Iran - a Case- Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev,* 2015, 16 6327-6330.

Saba HI, Roberts HR. Hemostasis and Thrombosis: Practical Guidelines in Clinical management. Chichester, Wiley-Blackwell, 2014, str. 4-6.

Sallah S. Inhibitors to clotting factors. *Ann Hematol,* 1997, 75, 1-7.

Scheer FAJL, Shea SA. Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood,* 2014, 123, 590–593.

Serpins: folding, misfolding and conformational change, 2015., http://pharmacy.umaryland.edu, pristupljeno 13. 12. 2015.

Skurk T, Hauner H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004, 28, 1357-1364.

Sobel BE, Lee Y-H, Pratley RE, Schneider DJ. Increased plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in the heart as a function of age. Life Sci, 2006, 79, 1600–1605.

Tamura Y, Kawao N, Yano M, Okada K, Okumoto K, Chiba Y, Matsuo O, Kaji H. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced diabetes and osteopenia in mice. *Diabetes,* 2015, 64, 2194-2206.

Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor [TAFI], 2012., http://practical-haemostasis.com, pristupljeno 13. 12. 2015.

Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest,* 1995, 95, 995–1001.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev,* 2013, 93, 327-358.

Wang H, Madhusudhan T, He T, Hummel B, Schmidt S, Vinnikov IA, Shahzad K, Kashif M, Muller-Krebs S, Schwenger V, Beirhaus A, Rudofsky G, Nawroth PP, Isermann B. Low but sustained coagulation activation ameliorates glukose-induced podocyte apoptosis: protective effect of factor V Leiden in diabetic nephropathy. *Blood,* 2011, 117, 5231-5242.

Wu J, Strawn TL, Luo M, Wang L, Li R, Ren M, Xia J, Zhang Z, Ma W, Luo T, Lawrence DA, Fay WP. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2-αVβ3 integrin cross talk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 2015, 35, 111-120.

Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H. Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res,* 2005, 66, 276–285.

Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, and Mehmet Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *The Scientific World Journal,* 2014.

Zupančić-Šalek S. Uvod u hemostazu. *Paediatr Croat,* 2005, 49, 237-239.

7 SAŽETAK / SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Hemostaza obuhvaća složene, međusobno povezane sustave čija je zadaća održati krv u tekućem stanju u krvožilnom sustavu, ali i omogućiti brzo stvaranje krvnog ugruška nakon ozljede krvne žile. Zgrušavanje i fibrinoliza, dvije ključne komponente hemostaze, moraju biti strogo kontrolirane. Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) je jedan od faktora kontrole fibrinolize. Uloga ovog serpina je spriječiti aktivaciju plazminogena u plazmin inhibirajući njegove aktivatore tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazu (uPA). Na aktivnost PAI-1 utječe polimorfizam 4G/5G koja se javlja u promotorskoj regiji gena za PAI-1. Homozigoti 4G/4G će imati veću aktivnost PAI-1 od homozigota 5G/5G. Osim toga, na aktivnost PAI-1 djeluju brojni drugi faktori uključujući spol, doba dana, pretilost, inzulin i glukokortikoide.

U ovom istraživanju utvrđivali smo ovisnost aktivnosti PAI-1 o prisutnosti polimorfizma 4G/5G u uzorcima plazme 60 ispitanika. Također je ispitana razlika u aktivnosti PAI-1 između muškaraca i žena. Genotip se određivao uređajem za PCR u stvarnom vremenu LightCycler 2.0 (Roche, Švicarska), a aktivnosti funkcionalnim testom na automatskom koagulacijskom analizatoru Behring Coagulation Timer koristeći komplet reagencija Berichrom PAI (Siemens Medical Solutions, Njemačka). Pokazan je trend (p=0.092) veće aktivnosti PAI-1 kod muškaraca, kao što je i očekivano. Nije dokazana statistički značajna razlika u aktivnosti PAI-1 između pojedinih genotipova. Taj neočekivan rezultat objašnjava se malim brojem ispitanika, te ne uzimanjem u obzir ostalih faktora koji utječu na aktivnost PAI-1 kao što su dob, vrijeme uzorkovanja, pretilost, inzulin i glukokortikoidi.

7.2 SUMMARY

Hemostasis consists of complex and interrelated systems whose task is to maintain blood fluidity in the vascular system, while allowing the rapid formation of solid blood clots in the prevention of hemorrhage after a blood vessel injury. The balance between coagulation and fibrinolysis, two key components of hemostasis, has to be strictly controlled. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a serpin that prevents the conversion of plasminogen to plasmin by inhibiting its activators - urokinase (uPA) and tissue plasminogen activator (tPA). The PAI-1 gene has a common polymorphism 4G/5G which is located in the promoter region and it affects the activity of PAI-1. People who are homozygotes 4G/4G have a higher plasma PAI-1 activity. Other factors such as age, circadian rhythm, obesity, insulin and glucocorticoids can also influence plasma PAI-1 activity.

The aim of this study was to determine the correlation between the 4G/5G polymorphism and the plasma PAI-1 activity in plasma samples of 60 subjects. Additionally, we compared the activities of plasma PAI-1 of female and male subjects. The genotype was determined using the LightCycler 2.0 real-time PCR system (Roche, Switzerland). The activity was determined using the automated hemostasis analyzer Behring Coagulation Timer with the Berichrom PAI test kit (Siemens Medical Solutions, Germany). A trend was found ($p=0.092$) which confirmed the premise of a higher activity in male patients. A statistically significant difference in the activities between genotypes was not found. This unexpected result can be explained taking into account the small sample size and not considering the other influential factors (age, circadian rhythm, obesity, insulin, glucocorticoids) whilst selecting subject samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Korelacija aktivnosti PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G u genu za PAI-1

Merima Čolić

SAŽETAK

Hemostaza obuhvaća složene, međusobno povezane sustave čija je zadaća održati fluidnost krvi u tekućem stanju u krvožilnom sustavu, ali i omogućiti brzo stvaranje krvnog ugruška nakon ozljede krvne žile. Zgrušavanje i fibrinoliza, dvije ključne komponente hemostaze, moraju biti strogo kontrolirane. Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) je jedan od faktora kontrole fibrinolize. Uloga ovog serpina je spriječiti aktivaciju plazminogena u plazmin inhibirajući njegove aktivatore tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazu (uPA). Na aktivnost PAI-1 utječe polimorfizam 4G/5G koja se javlja u promotorskoj regiji gena za PAI-1. Homozigoti 4G/4G će imati veću aktivnost PAI-1 od homozigota 5G/5G. Osim toga, na aktivnost PAI-1 djeluju brojni drugi faktori uključujući spol, doba dana, pretilost, inzulin i glukokortikoide. U ovom istraživanju utvrđivali smo ovisnost aktivnosti PAI-1 o prisutnosti polimorfizma 4G/5G u uzorcima plazme 60 ispitanika. Također je ispitana razlika u aktivnosti PAI-1 između muškaraca i žena. Genotip se određivao uređajem za PCR u stvarnom vremenu LightCycler 2.0 (Roche, Švicarska), a aktivnosti funkcionalnim testom na automatskom koagulacijskom analizatoru Behring Coagulation Timer koristeći komplet reagencija Berichrom PAI (Siemens Medical Solutions, Njemačka). Pokazan je trend (p=0.092) veće aktivnosti PAI-1 kod muškaraca, kao što je i očekivano. Nije dokazana statistički značajna razlika u aktivnosti PAI-1 između pojedinih genotipova. Taj neočekivan rezultat objašnjava se malim brojem ispitanika, te ne uzimanjem u obzir ostalih faktora koji utječu na aktivnost PAI-1 kao što su dob, vrijeme uzorkovanja, pretilost, inzulin i glukokortikoidi.

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

Rad sadrži: 28 stranica, 8 grafičkih prikaza, 6 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Inhibitor aktivatora plazminogena-1, polimorfizam 4G/5G, fibrinoliza

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Zadro,** *redovna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sanja Dabelić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE CORRELATION BETWEEN PLASMA PAI-1 ACTIVITY AND THE 4G/5G POLYMORPHISM IN THE PAI-1 GENE

Merima Čolić

SUMMARY

Hemostasis consists of complex and interrelated systems whose task is to maintain blood fluidity in the vascular system, while allowing the rapid formation of solid blood clots in the prevention of hemorrhage after a blood vessel injury. The balance between coagulation and fibrinolysis, two key components of hemostasis, has to be strictly controlled. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a serpin that prevents the conversion of plasminogen to plasmin by inhibiting its activators - urokinase (uPA) and tissue plasminogen activator (tPA). The PAI-1 gene has a common polymorphism 4G/5G which is located in the promoter region and it affects the activity of PAI-1. People who are homozygotes 4G/4G have a higher plasma PAI-1 activity. Other factors such as age, circadian rhythm, obesity, insulin and glucocorticoids can also influence plasma PAI-1 activity. The aim of this study was to determine the correlation between the 4G/5G polymorphism and the plasma PAI-1 activity in plasma samples of 60 subjects. Additionally, we compared the activities of plasma PAI-1 of female and male subjects. The genotype was determined using the LightCycler 2.0 real-time PCR system (Roche, Switzerland). The activity was determined using the automated hemostasis analyzer Behring Coagulation Timer with the Berichrom PAI test kit (Siemens Medical Solutions, Germany). A trend was found (p=0.092) which confirmed the premise of a higher activity in male patients. A statistically significant difference in the activities between genotypes was not found. This unexpected result can be explained taking into account the small sample size and not considering the other influential factors (age, circadian rhythm, obesity, insulin, glucocorticoids) whilst selecting subject samples.

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

Thesis includes: 28 pages, 8 figures, 6 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Plasminogen activator inhibitor-1, 4G/5G polymorphism, fibrinolysis

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

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

Sanja Dabelić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Nada Vrkić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2016.