



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ ИНЖЕЊЕРСКИХ НАУКА

Павић Н. Јелена

**УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У АПОПТОЗУ,
РЕДОКС СТАТУСА И ПАТОГЕНЕЗУ НА ТИП
КАРДИОМИОПАТИЈЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF ENGINEERING

Jelena N. Pavić

**INFLUENCE OF THE EXPRESSION OF GENES
INVOLVED IN APOPTOSIS, REDOX STATUS AND
PATHOGENESIS ON THE CARDIOMYOPATHY
TYPE**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Аутор
Име и презиме: Јелена Павић
Датум и место рођења: 13.09.1993. године у Ћуприји
Садашње запослење: истраживач сарадник
Докторска дисертација
Наслов: Утицај експресије гена укључених у апоптозу, редокс статуса и патогенезу на тип кардиомиопатије
Број страница: 100
Број слика: 17
Број библиографских података: 253
Установа и место где је рад израђен: Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Машинско инжењерство и Медицинске науке
Ментор: проф. др Ненад Филиповић, редовни професор Факултета инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу и др Марко Живановић, виши научни сарадник Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу.
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-07-273/3 16.04.2024. године

Захвалница....

Изражавам дубоку захвалност свом ментору, др Ненаду Филиповићу, редовном професору Факултета инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу, на несебичној помоћи, стручним смерницама и континуираној подршци током израде ове дисертације. Његово знање и искуство били су непроцењиви у сваком кораку мог истраживања.

Такође, захваљујем редовним професоркама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу др Ирени Танасковић и др Весни Станковић, на драгоценим саветима и стручном доприносу који су значајно унапредили квалитет овог рада.

Поред њих, изражавам искрену захвалност својим драгим колегиницама и пријатељицама, Катарини Виријевић и Тамари Младеновић, на несебичној помоћи и подршци у експерименталном делу истраживања. Посебну захвалност дугујем Огњену Павићу, који је својим знањем и ангажовањем помогао у делу дисертације везаном за примену вештачке интелигенције, чиме је значајно унапредио квалитет овог истраживања. Захваљујући њима експериментални део је прошао у смеху и шали. Хвала и др Марку Живановићу на пажљивом читању и корисним сугестијама током прегледа дисертације.

*Највећу захвалност дугујем свом супругу, **Небојши**, који је био моја неизмерна подршка и мотивација током целог овог изазовног пута, чинећи га лакшим својим охрабрењима и разумевањем. Моја ћерка **Нина**, која је својим осмехом унела радост и лепоту у сваки тренутак овог процеса, заслужује посебну захвалност што је овај пут учинила не само лакшим већ и смисленијим.*

Од срца хвала мојој породици и породици мог супруга на сваком виду помоћи, разумевања и подршке током писања ове дисертације. Њихова присутност и охрабрења били су ми велики ослонац. На крају, али никако мање важно, желим да се захвалим својој пријатељици Лоли, чије су речи подршке и способност да ми подигне самопоуздање у тежким тренуцима биле од непроцењивог значаја.

Од срца хвала свима који су били део овог путовања и допринели његовом успешном завршетку.

САЖЕТАК

Увод: У докторској дисертацији „Утицај експресије гена укључених у апоптозу, редокс статус и патогенезу на тип кардиомиопатије“ истражују се молекуларни и генетски механизми хипертрофичне кардиомиопатије. Кардиомиопатије су водећи узрок срчане инсуфицијенције и изненадне смрти. Ова студија анализира генетске полиморфизме у генима *MYBPC3* и *MYH7* и њихову корелацију са клиничким подацима пацијената.

Циљ: Циљ је истраживање експресије гена повезаних са апоптозом, редокс статусом и патогенезом хипертрофичне кардиомиопатије, као и анализа генетских и клиничких података применом вештачке интелигенције ради прецизније дијагнозе и персонализованог лечења.

Материјал и методе: Примењене су методе молекуларне биологије, као што су qRT-PCR за анализу експресије гена и полиморфизама, напредне статистичке анализе и алгоритми машинског учења, укључујући Random Forest, за класификацију пацијената на основу генетских профила.

Резултати: Група пацијената са хипертрофичном кардиомиопатијом показала је стабилну клиничку слику између две посете. PCR анализа је указала на смањење експресије испитиваних гена, што истиче њихову улогу у патогенези болести. Класификациони модел који комбинује клиничке и генетске податке постигао је тачност од 92%.

Закључак: Истраживање потврђује важност мултидимензионалног приступа који комбинује генетске и клиничке податке за боље разумевање хипертрофичне кардиомиопатије, развој биомаркера и персонализоване терапије.

Кључне речи: кардиомиопатија, експресија гена, апоптоза, редокс статус, полиморфизам гена, прецизна медицина, персонализована терапија, машинско учење, молекуларна биологија, кардиоваскуларна обољења.

ABSTRACT

Introduction: The doctoral dissertation titled “*The Impact of Gene Expression Involved in Apoptosis, Redox Status, and Pathogenesis on the Type of Cardiomyopathy*” investigates molecular and genetic mechanisms underlying hypertrophic cardiomyopathy. Cardiomyopathies are major causes of heart disease and leading risk factors for heart failure and sudden cardiac death. This study focuses on genetic predispositions, particularly polymorphisms in the *MYBPC3* and *MYH7* genes, and examines correlations between clinical and genetic data.

Aim: The dissertation aims to analyze the expression of genes related to apoptosis, redox status, and hypertrophic cardiomyopathy pathogenesis using artificial intelligence to integrate clinical and genetic data for precise diagnosis and personalized treatment. It also investigates polymorphisms associated with hypertrophic cardiomyopathy.

Materials and Methods: Molecular biology techniques, such as qRT-PCR, were used to analyze gene expression and polymorphisms. Advanced statistical analysis and machine learning algorithms, including Random Forest, were applied to classify patients and evaluate the significance of genetic factors in cardiac risk.

Results: Patients with hypertrophic cardiomyopathy showed stable clinical profiles between visits. Genotyping revealed genotype distributions consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. Gene expression analysis indicated a general decrease in expression, highlighting their role in pathogenesis. A classification model combining clinical and genetic data achieved 92% accuracy, demonstrating the value of a multidimensional approach in analysis.

Conclusion: The study highlights the need for larger samples to enhance statistical significance and supports the development of biomarkers and personalized therapies.

Key words: cardiomyopathy, gene expression, apoptosis, redox status, gene polymorphism, precision medicine, personalized therapy, machine learning, molecular biology, cardiovascular diseases.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. ПОЈАМ И ТИПОВИ КАРДИОМИОПАТИЈЕ	2
1.1.1. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА – ЕТИОЛОГИЈА И ЕПИДЕМИОЛОГИЈА.....	5
1.1.2. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА – ПАТОФИЗИОЛОГИЈА.....	6
1.1.3. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА – КЛИНИЧКА СЛИКА	8
1.1.4. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА – ДИЈАГНОСТИЧКИ ПРИСТУП	11
1.1.5. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА – ЛЕЧЕЊЕ	15
1.1.6. ХИПЕРТРОФИЧНА КАРДИОМИОПАТИЈА- ГЕНЕТСКА РАЗМАТРАЊА	17
1.1.6.1. Типови мутација код HCM	19
1.1.6.2. Генетско тестирање код HCM	21
1.2. ЂЕЛИЈСКА СМРТ – ОСНОВНИ КОНЦЕПТИ И МЕХАНИЗМИ	21
1.2.1. АПОПТОЗА – МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ	23
1.2.2. АПОПТОЗА И РЕГЕНЕРАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛ КАРДИОМИОЦИТА.....	24
1.3. РЕДОКС СТАТУС, ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И CVD.....	26
1.3.1. КАРДИОПРОТЕКТИВНЕ СТРАТЕГИЈЕ И ПОТЕНЦИЈАЛ АНТИОКСИДАТИВНЕ ТЕРАПИЈЕ 27	
1.4. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА СРЧАНОГ МИШИЋА.....	27
1.5. ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА И ПОЛИМОРФИЗМИ У КОНТЕКСТУ КАРДИОМИОПАТИЈА	28
1.5.1. ЗНАЧАЈ QRT-PCR У ИСТРАЖИВАЊУ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА И SNP-ОВА	30
1.6. УПОТРЕБА ВЕШТАЧКЕ ИНТЕЛИГЕНЦИЈЕ У МЕДИЦИНИ	30
1.6.1. УПОТРЕБА МАШИНСКОГ УЧЕЊА У КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА	30
1.6.2. УПОТРЕБА МАШИНСКОГ УЧЕЊА У ПРОУЧАВАЊУ КАРДИОМИОПАТИЈЕ	32
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	36
3.1 ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ	37
3.2. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ.....	37
3.3. УЗОРКОВАЊЕ КРВИ	37
3.4. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (QRT-PCR).....	38
3.4.1. ИЗОЛАЦИЈА РНК.....	38
3.4.2. РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА (RT-PCR).....	38
3.4.3. КВАНТИФИКАЦИЈА РЕЛАТИВНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА (QPCR)	39
3.5. ДЕТЕКЦИЈА И АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МЕТОДОМ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (ЕНГЛ. RT-PCR).....	41
3.5.1. ИЗОЛАЦИЈА ГЕНОМСКЕ ДНК	41
3.5.2. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ И ЧИСТОЋЕ ГЕНОМСКЕ ДНК.....	41
3.5.3. УТВРЂИВАЊЕ ПОЛИМОРФИЗАМА MYBPC3 И MYH7 ГЕНА.....	41
3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	43
3.7. УПОТРЕБА МАШИНСКОГ УЧЕЊА.....	43
4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	45

4.1.	КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПОПУЛАЦИЈЕ	46
4.2.	АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА.....	47
4.3.	АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗАМА RS3729823 И RS3729986	50
4.4.	КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ГЕНА.....	51
4.5.	КЛАСИФИКАЦИЈА ПАЦИЈЕНАТА КОРИШЋЕЊЕМ RANDOM FOREST АЛГОРИТМА.....	53
4.6.	ЗНАЧАЈ АНАЛИЗИРАНИХ ГЕНА (FEATURE IMPORTANCE).....	55
4.7.	ПРОФИЛ РИЗИКА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА НСМ-ОМ КРОЗ АНАЛИЗУ КЛАСТЕРОВАЊА	56
5.	ДИСКУСИЈА.....	59
5.1.	<i>КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА</i>	<i>60</i>
5.2.	<i>АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА</i>	<i>63</i>
5.3.	<i>АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗАМА У ГЕНИМА МУН7 И МУВРС3.....</i>	<i>71</i>
5.4.	<i>ПРИМЕНА МАШИНСКОГ УЧЕЊА У ПРОЦЕНИ РИЗИКА</i>	<i>73</i>
5.5.	<i>ОГРАНИЧЕЊА И ЗНАЧАЈ РЕЗУЛТАТА ЗА БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА</i>	<i>77</i>
6.	ЗАКЉУЧАК.....	78
	ЛИТЕРАТУРА	80

1. УВОД

УВОД

Водећи узрок смртности широм света представљају кардиоваскуларне болести (енгл. *Cardiovascular diseases*, CVD) (1) и временом постају све већи терет на здравствени систем (2). Ову групу обољења карактерише сужење крвних судова (3) и укључује низ стања од срчаног удара, можданог удара и високог крвног притиска до урођених срчаних болести и срчане инсуфицијенције (4). Када се појаве први симптоми болести то су често бол и стезање у грудима, недостатак даха и отежано дисање, хладан зној, умор, отицање ногу, бол у трбуху, палпитације, хронични умор и несвестица (5,6). Развоју ових болести доприносе екстерни фактори ризика као што су пушење, недостатак физичке активности и нездрава исхрана (7). Поред тога, етиологија болести додатно је повезана са присуством коморбидитета, попут повишеног крвног притиска (хипертензије), повишеног нивоа шећера у крви (лат. *diabetes mellitus*), повишеног нивоа масти у крви (хиперлипидемије), гојазности (лат. *obesitas*), генетске предиспозиције и старења (8,9). Ови фактори ризика могу потенцијално довести до развоја кардиомиопатије, што ће бити предмет детаљне анализе у наставку дисертације (10). Такође, мутације у једном или више гена повећавају ризик за настанак обољења (11). Постоје фактори ризика који доприносе настанку болести и на које не можемо да утичемо и они чијом променом у свакодневном животу можемо да делујемо како бисмо смањили ризик од CVD-а (12). У прву групу спада старост, посебно након 65. године када се повећава ризик од настанка болести (13), као и пол, зато што се CVD везују за мушкарце више него за жене, углавном због другачијих симптома који се јављају код особа женског пола (14,15). Истраживања која су испитивала разлику међу половима код пацијената оболелих од CVD-а, указала су на то да жене чешће оболевају у каснијем периоду живота, након менопаузе, што се повезује са заштитном улогом полних стероидних хормона (естрогена) (16,17). Такође, лоши међуљудски односи и други психосоцијални фактори на радном месту утичу на пораст оболелих од CVD-а (18). Фактори ризика који се сврставају у бихевиоралне, као што су пушење, употреба алкохола, LDL-холестерол, дијабетес, гојазност и друге, могу се држати под контролом променом животних навика (19).

Иако CVD обухватају различита стања срца и крвних судова, као што су коронарна болест, мождани удар, периферна артеријска болест и болести аорте (20), посебна пажња у овој дисертацији биће посвећена кардиомиопатијама, које директно утичу на промену структуре и функције срчаног мишића (21). Разумевање и идентификација свих узрочних фактора и механизма који доводе до промена на нивоу гена и настанка кардиомиопатија представља основу за унапређење персонализоване терапије.

1.1. Појам и типови кардиомиопатије

Кардиомиопатија представља патолошко стање које се карактерише морфолошким и функционалним оштећење срчаног мишића (21,22). Дели се на

примарне, која захватају срчани мишић и секундарне кардиомиопатије, где је оштећење срчаног мишића резултат систематских или мултиорганских болести (23). Примарне кардиомиопатије код којих узрок често није у потпуности познат могу бити генетске, мешовите или стечене (24). Код секундарних кардиомиопатија узрок је познат и често се повезује са другим стањима, а дели се на инфламаторне, токсичне и инфилтративне. Ово је подела коју је дефинисало Америчко удружење за срце (енгл. *American Heart Association*, АНА) (25), док је Европско кардиолошко друштво (енгл. *European Society of Cardiology*, ESC) проширило класификацију Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization*, WHO) (26) и поделило кардиомиопатије у четири основна фенотипа: дилатациона (мешовита), хипертрофична (генетска), рестриктивна (мешовита) и аритмогена кардиомиопатија (**Табела 1**). Некласификоване кардиомиопатије укључују стања попут ендокардијалне фиброеластозе, некомпактног миокарда и систолне дисфункције са минималном дилатацијом (27,28). Ова обољења представљају водећи узрок изненадне срчане смрти (енгл. *Sudden cardiac death*, SCD), као и трансплантације срца глобално (29). Бројна истраживања у области клиничке и геномске медицине омогућила су лакше откривање и разумевање болести. Ова истраживања допринела су бољем разумевању молекуларне основе болести, што је довело до напретка у дијагностици (30).

Табела 1. Класификација кардиомиопатија према етиологији и типу

Примарне кардиомиопатије	Секундарне кардиомиопатије
Генетске	Инфламаторне
Аритмогена дисплазија десне коморе Хипертрофична Поремећаји јонских канала Митохондријалне миопатије	Дерматомиозитис <i>Polyarteritis nodosa</i> Реуматoidни артритис Саркоидоза Склеродерма Системски еритемски лупус Ендокрине Акромегалија Шећерна болест Хиперпаратироидизам Хипертиреоза Хипотиреоза Гојазност
Мешовите	Токсичне
Дилатациона Рестриктивна	Алкохол Анаболички стероиди Хемотерапеутски агенси Хлорокин Тешки метали (арсен, кобалт, олово, жива) Вишак гвожђа Радијација Стимуланси (кокаин, метилфенидат)
Стечене	Инфилтративне
Миокардитис Перипартум Индукована тахикардија Такотсубо (стресом изазван)	Амилоидоза Гауцхерова болест Хунтер синдром Хурлеров синдром

Дилатациона кардиомиопатија (енгл. *Dilated Cardiomyopathy*, DCM) је хронично обољење срца, које карактерише повећање срчаних шупљина, посебно леве коморе, док је могуће да и десна комора постане проширена и дисфункционална (21). Истежање срчаног мишића доводи до смањене контрактилне функције, што резултира нагомилавањем течности у организму и настанком срчане инсуфицијенције (енгл. *Heart failure*) (31,32). Тачни узроци ове болести не могу се прецизно утврдити, па се често назива идиопатском болешћу. Фактори који могу допринети развоју болести укључују генетску предиспозицију, инфекције (вируси, лајмска болест), конзумирање алкохола и одређених лекова (33). Болест се најчешће манифестује у средњим годинама, али може проћи дуг временски период без симптома. Јавља се чешће код мушкараца и то са учесталошћу која је три пута већа него код жена (34,35).

Следећи тип, рестриктивна кардиомиопатија (енгл. *Restrictive cardiomyopathy*, RCM) је ретка форма кардиомиопатије која доводи до морфолошких промена у срцу. Срчани мишић у овом стању губи еластичност и постаје ригидан што доводи до стварања чврстог и нефлексибилног зида. Последица ових промена је смањена контрактилна способност срца, што може довести до озбиљних здравствених проблема (36,37). RCM може бити идиопатска у ретким случајевима или се може јавити као последица формирања ожиљака на срцу, таложења протеина (амилоидоза), хемотерапије, накупљања гвожђа у срцу (хемохроматоза) и других узрока (38).

Хипертрофичну кардиомиопатију (енгл. *Hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) карактерише асиметрично повећање дебљине срчаног мишића, најчешће леве коморе (39). Због овог задебљања, срце пумпа крв спорије и може изазвати потпуну блокаду дотока крви у аорту, што резултира смрћу (40). Хипертрофија најчешће захвата зид између леве и десне коморе срца и интравентрикуларни септум (41). Узрок његовог настанка може бити непознат, али се сматра да може бити и наследна, узоркована мутацијама гена, а наслеђује се аутозомно-доминантно (42). Симптоми укључују диспнеју, бол у грудима, несвестицу, замор и повећан ризик од неправилног срчаног ритма (43). За лечење болести примењује се медикаментозна терапија која укључује бета-блокаторе, антагонисте калцијума, као и антиаритмике, а код пацијената који имају тежу клиничку слику ради се и септална миомектомија ради смањења задебљања миокарда (44). У овој дисертацији шире ћемо објаснити овај тип кардиомиопатије.

Аритмогена кардиомиопатија (енгл. *Arrhythmogenic cardiomyopathy*, ACM) је озбиљно срчано обољење које се манифестује неправилним срчаним ритмом услед промена у структури срчаног мишића. Ово је најчешћи тип кардиомиопатије и обично захвата десну комору па се назива аритмогена кардиомиопатија десне коморе (енгл. *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*, ARVC). Међутим, новија истраживања показују да ове промене захватају леву комору паралелно са десном (45). То је прогресивно обољење које се наслеђује аутозомно-доминантно (46) и карактерише га замена нормалног ткива миокарда везивним и масним наслагама (47).

Услед те трансформације ткива може доћи до дилатације или анеуризме (48). Ова болест је једна од узрока SCD-а код спортиста и младих људи (47). Ћелије срчаних мишића (кардиомиоците) држе заједно бројни протеини, који су код оболелих од ARVC неправилно развијени и не могу да вежу кардиомиоците. Услед тога ћелије се распадају, а празне просторе попуњавају масне насlage (49).

1.1.1. Хипертрофична кардиомиопатија – Етиологија и епидемиологија

HCM представља наследну болест коју карактерише патолошко задебљање срчаног мишића, које најчешће захвата леву комору. Ово стање може довести до срчаних аритмија, срчане инсуфицијенције и SCD-а (50). Повећање дебљине зидова леве коморе отежава проток крви кроз срце и нарушава нормалан срчани циклус. Сматра се једним од најћешћих облика кардиомиопатије широм света која изазива SCD нарочито код спортиста зато што већи део пацијената нема симптоме (51). Учесталост болести зависи од популације и регије, а процене указују на то да се болест јавља код једне особе на сваких 200 до 500 људи (52). Ова процентуална заступљеност је коришћена у истраживањима која су описала да одређене мутације у генима који кодирају протеине саркомере могу бити повезане са развојем HCM-а (53,54).

У настанку болести важну улогу имају генетски и фактори средине што указују и разлике у популацији и етничким групама. Разлике међу етничким групама су запажене и у кардиоваскуларним обележјима попут оних кључних у манифестацији HCM-а као што су хипертрофија леве коморе и срчана инсуфицијенција (55). Упркос великом броју радова и расветљавању клиничке слике и прецизне дијагнозе пацијената оболелих од HCM-а, данас је тежња усмерена на разумевање основних механизма који доводе до развоја ове болести. Циљ анализа великих база података јесте откривање сложене патогенезе овог стања.

Будућа истраживања биће усмерена на детаљно испитивање улоге генетских и негенетских фактора, као и молекуларних процеса, који се дешавају након синтезе протеина, како би се боље разумели основни узроци настанка HCM-а. Резултати ових истраживања биће кључни за напредак у области прецизне медицине и развоја персонализованих терапија које могу успорити или чак спречити прогресију HCM-а. Различити генетски фактори доводе до сличних клиничких фенотипова, што отежава идентификацију специфичних гена одговорних за HCM. Такође, генски фактори не изазивају симптоме код свих особа које носе мутације, што значи да се клинички ефекти не испољавају увек. Особе са истом генском мутацијом чак из исте породице, могу показивати разлике у манифестацији симптома или бити потпуно асимптоматски (56). Зато је идентификација и дијагноза ове болести доста отежана, управо због симптома који се често не манифестирају све до каснијих фаза живота (57). Епидемиолошка истраживања континуирано прате учесталост и расподелу HCM-а, како би се формирале што боље стратегије и смањило утицај на јавно здравље (58).

1.1.2. Хипертрофична кардиомиопатија – Патофизиологија

Клиничке карактеристике пацијената са HCM-ом разликују се међу пацијентима, што се манифестује кроз различите морфолошке и функционалне промене. Морфолошке промене обухватају различити степен хипертрофије, структурну ирегуларност и дезорганизацију мишићних влакана, као и присуство интерстицијалне фиброзе између влакана. Миоцити у ткиву који је захваћен хипертрофијом имају атипичан облик, бизарну структуру једара, као и повећан број митохондрија и рибозома. Овакав распоред органа нарушава њихову слојевиту организацију и доводи до дезорганизације ткива. Присуство абнормалних једара резултат је поремећаја у синтези ДНК и регулацији ћелијског циклуса услед оштећења. Такође, повећан број митохондрија је резултат веће енергетске потребе миоцита, али с обзиром на то да митохондрије често нису функционалне долази до нарушавања равнотеже између производње и потрошње енергије. Услед оваквих промена, миоцити губе своју примарну способност контракције миокарда и доводе постепено до слабљења срчане функције, а то повећава ризик од вентрикуларних аритмија и SCD-а. Хипертрофију миокарда карактерише задебљање које је углавном асиметрично и захвата интервентрикуларни септум и латерални зид леве коморе. Десна комора ретко је захваћена хипертрофијом. У неким случајевима, хипертрофија може бити уочена на врху срца (апикална хипертрофија), док ретко кад захвата задњи или бочни зид леве коморе. Дебљина миокарда је у већини случајева преко 20 mm. Код старијих пацијената, хипертрофија је мање изражена и локализована, док млађи пацијенти чешће имају израженије задебљање зида (59,60).

Пацијенти са HCM-ом су често асимптоматски, али када се симптоми појаве, они су најчешће резултат четири главна патофизиолошка механизма: опструкције излазног тракта леве коморе, дијастолне вентрикуларне дисфункције, исхемије миокарда и срчане аритмије.

1. **Опструкција излазног тракта леве коморе** (енгл. *Left Ventricular Outflow Tract Obstruction, LVOTO*) јавља се код трећине пацијената у стању мировања, а симптоми се погоршавају током физичке активности. Систолни притисак је променљив и углавном износи 30 mmHg или више, што указује на значајан степен опструкције. Два главна узрока LVOTO код HCM-а су повећање дебљине септума, што доводи до сужавања LVOT-а и отежава проток крви. У току систоле, предњи лист митралног залистка (енгл. *Systolic anterior motion, SAM*) се помера и што погоршава LVOT. SAM је праћен променама у структури митралног залистка попут издужених листића или неправилни положај папиларних мишића. Овај тип опструкције, који се најчешће јавља уз SAM, представља најзаступљенији облик LVOTO-а код HCM-а. Иако су неки пацијенти са LVOTO асимптоматски, остали могу имати симптоме као што су отежано дисање, бол у грудима при напору, пресинкопа или синкопа током физичке активности, са или без вентрикуларне аритмије, а неки пацијенти развијају срчану инсуфицијенцију (50,61).

2. **Дијастолна дисфункција** представља један од честих проблема пацијената са HCM-ом и присутна је код више од 80% пацијената. Она утиче на низ симптома као што су диспнеја и умор. Крутост зидова леве коморе ограничава њену способност да се опусти током дијастоле, што доводи до повећања дијастолног притиска и смањења запремине крви која се избацује из срца. То значи да мања количина крви напусти срце током контракција. Повећан дијастолни притисак у левој комори преноси се на плућне вене и капиларе, узрокујући нагомилавање течности у плућима, што доводи до отежаног дисања, нарочито током физичке активности. Код тежих пацијената јавља се и ортопнеја (отежано дисање у мировању). Услед мање количине крви, смањена је и концентрација кисеоника и то доводи до замора пацијената. Услед покушаја организма да надокнади смањену ефикасност срца убрзањем срчаног ритма како би одржао правилан проток крви, јављају се тахикардије (62,63). Ограничена способност срца да се опусти у току дијастоле резултат је и других фактора, као што су дезорганизација миоцита, енергетски дефицит у ћелијама и промене у концентрацији калцијума услед мутација у генима протеина укључених у регулацију контракције срца.
3. **Исхемија миокарда** је честа појава код пацијената са HCM-ом и може се јавити чак и у одсуству клиничких симптома. Настаје због недовољног снабдевања ткива кисеоником у односу на веће потребе миокарда. Коронарне артерије које снабдевају миокард крвљу могу имати абнормалну структуру, а смањене густине капилара доводи до неадекватног снабдевања кисеоником. Оштећено ткиво миокарда се услед исхемије замњује фиброзним. Фиброзно ткиво је нефункционално везивно ткиво које замењује оштећени миокард, смањује еластичност миокарда и доводи до дијастолне дисфункције. Самим тим нарушена је и електрична проводљивост срца, што може довести до вентрикуларних аритмија и SCD-а. Пацијенти често осећају бол у грудима, нарочито након физичке активности, који је узрокован миокардном хипоперфузијом (смањеним протоком крви у миокарду) због сужавања лумена коронарних артерија и повећане потребе задебљалог миокарда за кисеоником (64).
4. **Аритмије** представљају чест проблем код пацијената са HCM-ом и доприносе ризику од компликација. Услед замене оштећеног ткива фиброзним, дезорганизације миоцита, исхемије и LVOTO-а долази до поремећаја у провођењу електричног импулса и до настанка аритмија. Преткоморска фибрилација (енгл. *Atrial fibrillation*) је најчешћи облик аритмија, присутан код 25-30% пацијената са HCM-ом. Њена учесталост расте с годинама живота, што се повезује са повећаним оптерећењем леве преткоморе и структурним промена зидова преткомора. Исхемија, фиброза и механички стрес могу изазвати вентрикуларне тахикардије (енгл. *Ventricular tachycardia*) или вентрикуларну фибрилацију. Ове аритмије су опасне по живот и представљају узрок SCD-а. SCD је најтежи исход HCM-а и често представља једину компликацију, која настаје код пацијената са или без симптома, без обзира на степен хипертрофије или старосну доб. Представља губитак функције срца,

који доводи до смрти у одређеном временском интервалу. SCD је најчешћи узрок смрти код спортиста, посебно током или након интензивне физичке активности (65). Узрок могу бити брзи и нерегуларни откуцаји из срчаних комора (вентрикуларне тахикардије) или лоша електрична активност која спречава срце да пумпа крв (вентрикуларне фибрилације) (66,67). Фактори ризика за настанак SCD-а јесу дебљина зида леве коморе већа од 30 mm, мутације гена и породична историја болести SCD.

У закључку, патофизиологија HCM је сложена и укључује бројне механизме, укључујући опструкцију LVOTO, дијастолну дисфункцију, исхемију миокарда и повећан ризик од вентрикуларних аритмија. Разумевање ових механизма кључно је за рано откривање фактора ризика и адекватан третман пацијената са HCM-ом.

1.1.3. Хипертрофична кардиомиопатија – Клиничка слика

HCM се одликује клиничком сликом која је хетерогена и пацијентима који воде нормалан живот без потребе за значајним терапијским интервенцијама. С друге стране болест може довести до озбиљнијих компликација као што су SCD (68). У раним фазама болести, већина пацијената са HCM-ом могу бити асимптоматски или имати благе симптоме (69,70). HCM се често открива случајно, током рутинског прегледа услед откривања шума, приликом тестирања или након што је члану породице дијагностификована ова болест (**Слика 1**) (69). Појава симптома се везује за присуство LVOTO-а, који омета нормалан проток крви кроз срце. Бол у грудима, умор, вртоглавица и аритмије су симптоми који се најчешће јављају код особа старости између 20. и 40. година (71).



Слика 1. Шематски приказ клиничке слике и дијагностичких метода

Најчешћи симптоми HCM-а су умор, бол у грудима током напора и отежано дисање (**Табела 2**). Отежано дисање (диспнеја) је чест симптом HCM-а, посебно код пацијената са узнапредовалом болешћу (22,27). То може бити последица смањеног капацитета срца да ефикасно пумпа крв (дијастолна функција) због задебљања миокарда, док је способност срца да се контрахује (сistolна функција) очувана. Још један чест симптом је ангиозни бол у грудима који се јавља код приближно половине пацијената оболелих од HCM-а услед смањеног протока (перфузије) крви кроз крвне судове миокарда због повећаног стреса зида LVOTO (64).

Губитак свести (синкопа) може се јавити, посебно код млађих пацијената са HCM-ом, услед аритмија које смањују доток крви у мозак, што доводи до несвестица (72). Такође, разлог може бити присуство LVOTO-а, која доводи до повећане контракције леве коморе током физичког напора, која може погоршати опструкцију и смањити проток крви (72,73). Овај симптом је веома важан маркер повећаног ризика од SCD-а, што захтева додатна испитивања (43).

Симптоми хроничне срчане слабости често су повезани са дијастолном дисфункцијом уз очувану ејекциону фракцију (енгл. *Ejection Fraction*) што доводи до задржавања течности и смањеног волумена крви у левој комори. Код пацијената са лошијом прогнозом узрок може бити и систолна дисфункција леве коморе. Присуство LVOTO-а, доприноси такође смањеном дотоку крви. Атријална фибрилација може настати услед повећаног волумена леве преткоморе и додатно погоршати симптоме.

Неправилан или убрзан рад срца (палпитације) може се јавити код неких пацијената као последица аритмија као што су атријална фибрилација или вентрикуларне аритмије, које значајно утичу на срчану функцију (74). Палпитације су извор нелагодности и могу бити показатељ ризика од компликација. Ово је разлог зашто благовремена дијагностика и третман поремећаја ритма код НСМ-а играју важну улогу у смањењу ризика од напредовања болести.

Поред наведених симптома знаци болести укључују шум на срцу, пуцкетање у плућима, плеурални излив, претибијални едем и венска конгестија. Пуцкетање у плућима је звук који може да се чује помоћу стетоскопа. Ова комбинација симптома и знакова је од великог значаја у дијагностичком процесу и процени тежине болести код пацијената са НСМ-ом.

Табела 2. Примарни симптоми и знаци код пацијената са НСМ-ом

Симптоми	Знаци
Умор	Шум на срцу
Бол у грудима	Пуцкетање у плућима
Диспнеја	Плеурални излив
Синкопа	Претибијални едем
Палпитација	Венска конгестија

Што се тиче лабораторијских испитивања код пацијената са сумњом на присуство болести, неопходно је урадити анализе ензима и кардиоваскуларних маркера (тропонина и N-терминалног про-Б типа натриуретичког пептида (енгл. *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*, NT-proBNP)). Повишена вредност тропонина указују на присуство оштећења миокарда, док су повишене вредности NT-proBNP показатељ лошије прогнозе пацијената. Додатно треба испитати електролите и метаболите, који су битни за проводљивост, као и функцију бубрега у циљу добијања одговарајуће терапије. Протеини и липиди, који су приказани у **Табели 3**, такође се анализирају код пацијената оболелих од НСМ-а. Оваква анализа стања пацијената омогућава детаљну процену стања срца и процену тежине болести, што помаже у даљој дијагностици за индивидуални терапијски приступ.

Табела 3. Лабораторијски налаз пацијената код пацијената са HCM-ом

Лабораторијски налази		
Ензими и кардиоваскуларни маркери	Електролити и метаболити	Протеини и липиди
ALT u/l	Натријум (mmol/L)	Укупни протеини
Аспартат трансаминаза АСТ u/l	Калијум (mmol/L)	Албумин (g/l)
Креатин киназа (U/l)	Калцијум (mmol/L)	LDL mmol/l
СК - MB u/l	Глукоза (mmol/L)	HDL mmol/l
Тропонин (ng/l)	Уреа (mmol/L)	Укупни холестерол mmol/l
NT-proBNP (ng/L)	Креатинин (umol/L)	Триглицериди mmol/l
LDH (U/l)	Мокраћна киселина (umol/L)	

1.1.4. Хипертрофична кардиомиопатија – Дијагностички приступ

У случају да се сумња да пацијент болује од HCM-а, примњују се различите дијагностичке методе како би се потврдила дијагноза и одредила озбиљност стања. Уколико су присутни типични шумови и поменути симптоми поставља се дијагноза пацијенту да има HCM (75,76). Поред тога, у идентификацији генетских предиспозиција за развој болести помаже испитивање породичне анамнезе (Табела 4). Поред породичне анамнезе, имиџинг методе играју кључну улогу у морфолошкој процени. Ако пацијент има блиског рођака који болује или је преминуо од ове болести, то повећава ризик на присуство болести (77). Код аортне стенозе и коронарне артеријске болести (енгл. *Coronary heart disease*, CAD) симптоми могу бити слични онима код HCM-а, с тим што се болести детектују на два различита начина (76).

Табела 4. Породична историја болести код пацијената са HCM-ом

Породична историја болести	Хипертрофична кардиомиопатија
	Дилатациона кардиомиопатија
	Изненадна срчана смрт старости < 40 година
	Изненадна срчана смрт старости 40-59 година
	Изненадна срчана смрт старости ≥ 60 година
	Необјашњива срчана инсуфицијенција
	Трансплантација срца
	Пејсмејкер/дефибрилатор имплантати
	Доказ системске болести

Дијагностички приступ HCM-а обухвата интеграцију клиничких симптома, физичког прегледа, анамнезе и савремених дијагностичких метода. Овај свеобухватни приступ омогућава прецизну дијагнозу и процену тежине стања на основу присуства типичних симптома и истраживања породичне историје болести. Морфолошка дијагноза користи различите имидинг методе за детекцију повећања дебљине зида миокарда (78). Показатељем HCM-а сматра се дебљина миокарда од 15 mm или више у једном или више сегмената леве коморе, измерена било којом техником снимања (ехокардиографија, магнетна резонанца срца или компјутерска томографија (енгл. *Computed tomography scan*, CT)). Међутим, чак и дебљина зида од 13-14 mm може указивати на присуство HCM-а, нарочито ако је праћена другим факторима као што су породична историја, симптоми, електрокардиографске абнормалности или лабораторијски налази. Дијагноза болести код деце поставља се према дебљини зида леве коморе у односу на просечне вредности за одговарајући узраст (79,80).

Анамнеза и клиничка слика могу упутити на постојање кардиомиопатије, али нису довољне за постављање тачне дијагнозе. За прецизно дијагностификовање HCM-а, неопходно је користити следеће методе:

1. Електрокардиографија (ЕКГ) представља основну методу за рану дијагнозу болести код асимптоматских пацијената и препоручује се током прве посете пацијентима. Патолошки ЕКГ налази, попут знакова хипертрофије леве коморе, су први индикатори присуства HCM-а, запажени код чак 80% пацијената. Промене могу укључивати поремећаје у срчаном ритму, поремећаје провођења електричних импулса, промене у ST сегменту, као и присуство аритмија. ЕКГ налази могу бити нормални код одређених пацијената, односно да показују мању дебљину миокарда. Овакви пацијенти имају спорији ток болести и бољу прогнозу (81).
2. Ултразвучни преглед срца (ехокардиографија) представља златни стандард за откривање и процену морфологије хипертрофије, јер приказује облик, запремину и функцију срца. Асиметрична хипертрофија септума, систолни антериорни покрет митралног залиска (SAM) и смањена шупљина леве коморе могу да се детектују овом методом. Критеријуми који се користе за дијагнозу су максимална дебљина зида ≥ 15 mm у било ком сегменту миокарда, однос дебљине септума и задњег зида $> 1,3$ (код нормотензивних пацијената) или $> 1,5$ (код хипертензивних пацијената). Ехокардиографија може бити дводимензионална (2D), једнодимензионална (1D) и тродимензионална (3D), а користе се и различита доплерска мерења. Доплерска ехокардиографија мери проток крви и процењује функционалност срчаних залистака и комора (**Табела 5**) (82,83).
3. Холтер мониторинг користи се за континуирано праћење срчаног ритма у трајању од 24 до 48 сати, омогућава детекцију аритмија или поремећаје срчаног ритма код пацијената. Препоручује се за идентификацију пацијената који би могли бити кандидати за имплантацију дефибрилатора (84).
4. Магнетна резонанца (енгл. *Cardiac magnetic resonance imaging*, MRI) и CT су напредне имидинг методе које омогућавају прецизно мерење дебљине

миокарда и процену морфологије срца. MRI користи магнетно поље и радио таласе за креирање детаљних слика срчане структуре и о функцији срчаних залистака. Ова метода помаже у процени апикалних и латералних сегмената миокарда, детекцији вишка везивног ткива и процени одговора на терапију. Поред тога, може бити корисна у одлучивању о инвазивним терапијама, као што су септална миоектомија или алкохолна септална аблација. Када MRI није доступан, користи се СТ за морфолошку процену срца (85).

Табела 5. Параметри ехокардиограма и ЕКГ-а код пацијената са HCM-ом

Ехокардиограм параметри	Јединице	ЕКГ параметри	Јединице
LA	[mm]	срчани ритам	[bpm]
LAV	[ml]	синусни ритам	
LAV index	[ml/m ²]	атријална фибрилација	
MR		треперење атрија	
systolic anterior motion		пароксизмална суправентрикуларна тахикардија	
IVSd	[mm]	неодржива вентрикуларна тахикардија	
PLWd	[mm]	откуцаји срца	[bpm]
LVIDs	[mm]	проводљивост	
LVIDd	[mm]	AV block I	
EDVLV	[ml]	AV block II (Mobitz 1)	
ESVLV	[ml]	AV block II (Mobitz 2)	
SVLV	[ml]	LBBB	
EFLV	[%]	RBBB	
LVOT maxPG	[mmHg]	предњи леви хемиблок	
E/E'		предњи десни хемиблок	
TR		PR интервал	[ms]
TAPSE	[cm]	QRS трајање	[ms]
RVSP	[mmHg]	Sokolow индекс	[mm]

Ехокардиограм параметри: LA – Лева преткомора, LAV - Запремина леве преткоморе, LAV index - Индекс запремине леве преткоморе, MR - Митрална регургитација, Systolic anterior motion - Систолни предњи покрет митралног записка, IVSd - Дебљина интервентрикуларног септума у дијастоли, PLWd - Дебљина задњег зида леве коморе у дијастоли, LVIDs - Унутрашњи пречник леве коморе у систоли, LVIDd - Унутрашњи пречник леве коморе у дијастоли, EDVLV - Крај-дијастолна запремина леве коморе, ESVLV - Крај-систолна запремина леве коморе, SVLV - Запремина удара леве коморе, EFLV - Ејекциона фракција леве коморе, LVOT maxPG - Максимални градијент притиска у излазном тракту леве коморе, E/E' - Однос пикова брзина раног дијастолног пуњења леве коморе, TR - Трикуспидална регургитација, TAPSE - Амплитуда померања трикуспидалног анулуса у систоли, RVSP - Процењени систолни притисак у десној комори; *ЕКГ параметри:* ритам - AV block I - Атриовентрикуларни блок I степена, AV block II (Mobitz 1), LBBB - Леви блок гране, RBBB - Десни блок гране.

ESC калкулатор процењује ризик од SCD-а у наредних 10 година код пацијената са HCM-ом старијих од 16 година. Резултати се користе за разумевање ниво ризика и за прилагођавање терапије сваког пацијената. Калкулатор ризика укључује неколико параметара:

- Године старости: старији пацијенти имају већи ризик.
- Максимална дебљина зида леве коморе (енгл. *Maximal left ventricular wall thickness*, MLVWT): утврђена ехокардиографски, представља значајан фактор у процени ризика.
- Историја синкопе: присуство несвестица у последњих 6 месеци указује на повећан ризик.
- Максимални градијент леве коморе (Max LVOT Gradient): мери притисак у левој комори који указује на LVOTO.
- Атријална фибрилација: присуство поремећаја срчаног ритма повећава ризик.
- Породична историја SCD-а: наследни фактори играју важну улогу (86).

Ако је добијени проценат ризика изнад одређеног прага, препоручује се уградња уређаја за кардиоверзију-дефибрилацију (енгл. *Implantable cardioverter-defibrillator*, ICD) (87). Овај свеобухватан дијагностички приступ омогућава прецизно утврђивање присуства и тежине HCM-а, што је од кључног значаја за оптимално лечење и праћење пацијената.

Класификација за срчану инсуфицијенцију ACC/AHA допуњује класификацију Њујоршке кардиолошке асоцијације (NYHA) и укључује пацијенте који још увек немају срчану инсуфицијенцију, али показују повећан ризик од добијања. Према ACC/AHA класификацији пацијенти са срчаном слабошћу сврставају се у четири стадијума:

Степен А: Пацијенти са повећаним ризиком од срчане инсуфицијенције, али без уочљивих структурних промена на срцу.

Степен В: Пацијенти са утврђеним структурним променама на срцу, али без знакова и симптома срчане инсуфицијенције.

Степен С: Пацијенти са структурним променама на срцу и присутним симптомима срчане инсуфицијенције.

Степен D: Пацијенти са унапредовалом срчаном инсуфицијенцијом и тежим симптомима, који не реагују на стандардну терапију (88).

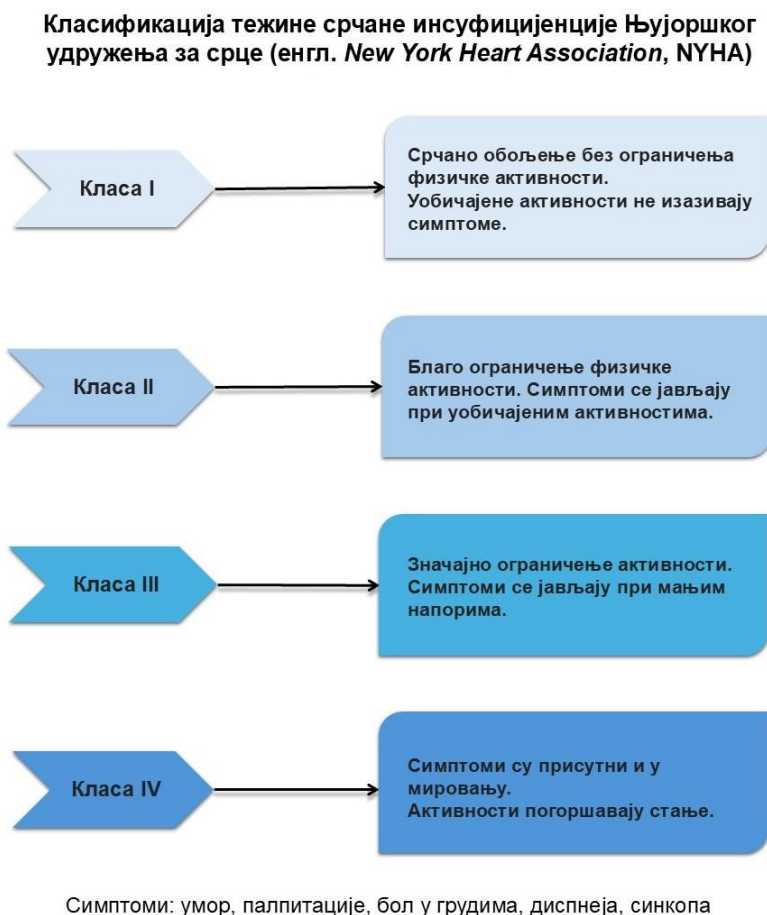
С друге стране, NYHA функционална класификација помаже у разврставању пацијената са срчаном инсуфицијенцијом у један од четири класа према тежини симптома у току активности и мировања. NYHA класификација сврстава пацијенте у следеће класе (**Слика 2**):

Класа I: Присутно је срчано обољење, без функционалних ограничења и у току мировања и у току физичке активности.

Класа II: Благо ограничење физичке активности и пацијент почиње да испољава благе клиничке знаке и симптоме у току активности (изазива замор, палпитације или диспнеју).

Класа III: Пацијент почиње да испољава клиничке знаке и симптоме срчане инсуфицијенције при мањим напорима.

Класа IV: Немогућност извођења било какве физичке активности без нелагодности. Симптоми срчане инсуфицијенције су присутни чак и у мировању, а било каква активност погоршава симптоме (89).



Слика 2. Класификација тежине срчане инсуфицијенције према NYHA

ACC/АНА систем се фокусира на превенцију и идентификацију раних фаза ризика, док NYHA систем процењује функционалну способност и тежину симптома код пацијената са већ постојећом срчаном инсуфицијенцијом. Оба система имају важну улогу у клиничкој пракси, пружајући допунске информације о прогнозирању и управљању болешћу. Овај свеобухватан дијагностички приступ омогућава прецизно утврђивање присуства и тежине HCM-а, што је кључно за одређивање адекватне терапије и праћење пацијената

1.1.5. Хипертрофична кардиомиопатија – Лечење

Лечења HCM-а је усмерено на ублажавање симптома и спречавање компликација које доводе до срчане слабости. Млађим пацијентима препоручује се избегавање интензивних физичких активности и конзумирање алкохола, због могућих погоршања

симптома. Свим пацијентима се саветује дијететско-хигијенски режим исхране, који укључује контролу телесне тежине. У овој студији анализирана је група пацијената са HCM-ом која је у својој терапији имала следеће групе лекова:

1. Бета-блокатори су основна терапијска опција за пацијенте са LVOTO. Они делују блокарањем β -адренергичких рецептора, што смањује потребу за кисеоником и продужава дијастолу чиме долази до лакшег пуњења леве коморе. Овакав ефекат доприноси смањењу или уклањању исхемије и LVOTO-а. Из ове групе лекова најчешће се користе метопролол (*Metoprolol*), бисопролол (*Bisoprolol*), соталол (*Sotalol*) и пропранолол (*Propranolol*).
2. Калцијумски антагонисти (Ca-антагонисти) представљају алтернативу за пацијенте који не реагују на бета-блокаторе. Употреба калцијумских антагониста, без комбинације са бета-блокаторима, помаже у смањењу дијастолног притиска леве коморе и побољшању пуњења коморе, уз истовремено успоравање срчаног ритма. Препоручују се лекови као што су амлодипин (*Amlodipine*), лерканидипин (*Lercanidipine*), верапамил (*Verapamil*), нифедипин (*Nifedipine*) и фелодипин (*Felodipine*). Међутим, обе групе лекова су контраиндиковане код пацијената са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом, због погоршања стања.
3. Антихипертензивни лекови се користе у терапији HCM-а за контролу крвног притиска и побољшање дијастолне функције срца. Ова терапија треба да буде пажљиво праћена како би се избегло погоршање градијента притиска у LVOTO. Од лекова примењују се АЦЕ инхибитори као што су рамиприл (*Ramipril*), периндоприл (*Perindopril*) и зофеноприл (*Zofenopril*), као и антагонисти ангиотензина II као што су телмисартан (*Telmisartan*), валсартан (*Valsartan*) и лосартан (*Losartan*). Комбиновани лекови, попут сакубитрил/валсартан (*Sacubitril/valsartan*) могу бити корисни за додатну контролу притиска и побољшање срчане функције. Ова комбинација побољшава срчану функцију, смањује симптоме и смањује ризик од хоспитализације.
4. Антитромбоцитни и антикоагулантни лекови се препоручују за све пацијенте са HCM-ом и атријалном фибрилацијом ради превенције артеријских емболија. Употребљавају се антикоагулантни лекови попут варфарин (*Warfarine*), дабигатран (*Pradaxa*), ривароксабан (*Xarelto*) или апиксабан (*Eliquis*) за спречавање настанка крвних угрушака код пацијената са атријалном фибрилацијом или апикалним типом HCM-а.
5. Дигиталис, диуретици и нитрати су лекови које треба избегавати код пацијената са HCM-ом, осим у случајевима срчане инсуфицијенције, јер могу различитим механизмима изазвати или повећати градијент притиска у LVOTO и погоршати симптоме.
6. Антиаритмички лекови се користе за регулисање неправилног срчаног ритма и спречавање компликација, као што је мождани удар. Најчешће коришћени антиаритмици укључују дигоксин (*Digoxin*), соталол (*Sotalol*) и дизопирамид (*Disopyramide*), који такође смањује LVOTO (Табела 6). Дизопирамид, се

препоручује као трећа опција када нема адекватног одговора на терапију бета-блокаторима или верапамилом, јер његово негативно инотропно дејство помаже у смањењу притисног градијента (90–92).

Табела 6. Групе лекова коришћене код пацијената са HCM-ом

Категорија лекова	Примери лекова
Бета-блокатори	Metoprolol, Bisoprolol, Sotalol
Калцијумски антагонисти	Amlodipine, Verapamil, Nifedipine
Антихипертензивни лекови	Ramipril, Perindopril, Telmisartan, Valsartan
Антитромбоцитни лекови	ASA (Acetylsalicylic Acid), Clopidogrel, Ticagrelor
Диуретици	Indapamide, Furosemide, Spironolactone
Антиаритмици	Digoxin, Sotalol, Dizopiramid

Ако изостане реакција на медикаментозни третман, даља терапија зависи од тога да ли је у питању не-опструктивна или опструктивна форма HCM-а. Код пацијената са не-опструктивном HCM-ом у завршној фази болести једино решење је трансплантација срца, јер не реагују на терапију. С друге стране, пацијенти са опструктивном HCM могу имати користи од хируршких и минимално инвазивних процедура, као што су септална миектомија, септална алкохолна аблација и би-вентрикуларна пејсинг терапија. Миектомија представља хируршко уклањање задебљалог дела интервентрикуларног септума, чиме се смањује LVOTO и побољшава проток крви. Минимално инвазивана метода, септална алкохолна аблација, користи ињекцију алкохола у коронарне артерије које снабдевају задебљали септум. Уградња пејсмејкера се користи код старијих пацијената, али се показала мање ефикасном процедуром у поређењу са хируршким захватом. Имплантациона ICD-а препоручује се пацијентима са доказаним срчаним застојем или високим ризиком од SCD-а, чиме се значајно побољшава преживљавање (93).

1.1.6. Хипертрофична кардиомиопатија- Генетска разматрања

CVD попут аритмија, кардиомиопатија, атеросклерозе, артериосклерозе, коарктације и анеуризме аорте и различите конгениталне аномалије, често су условљене генетским факторима. Генске мутације, које могу бити наслеђене или стечене током живота, доводе до настанка обољења. Када интерагују заједно са факторима животне средине (стрес, физичка неактивност) повећава се ризик за настанак болести. На пример, мутације у гену који кодира протеине одговорне за формирање јамица на ендотелним ћелијама кључни су за развој породичне хиперхолестеролемије. Оштећени рецептори спречавају ћелије да преузму холестерол и доводе до његових повишених вредности у крви, што доводи до његовог таложења у крвним судовима и повећаног ризика од развоја атеросклерозе (94,95).

Пошто се HCM наслеђује аутозомно-доминантно, значи да је довољно присуство мутације у једном генском алелу да би се болест испољила. Код оваквог облика наслеђивања, особе са једним мутираним алелом могу испољити симптоме болести или имати мутацију а не испољити симптоме (96). Истраживања су базирана на испитивању мутација гена и то најчешће оних који кодирају саркомерне протеине (97). Код већине пацијената са HCM-ом идентификоване су промене у генима који кодирају β -тешки ланац миозина (*MYH7* на хромозому 14) и миозин-везујући протеин C3 (*MYBPC3* на хромозому 11) (50).

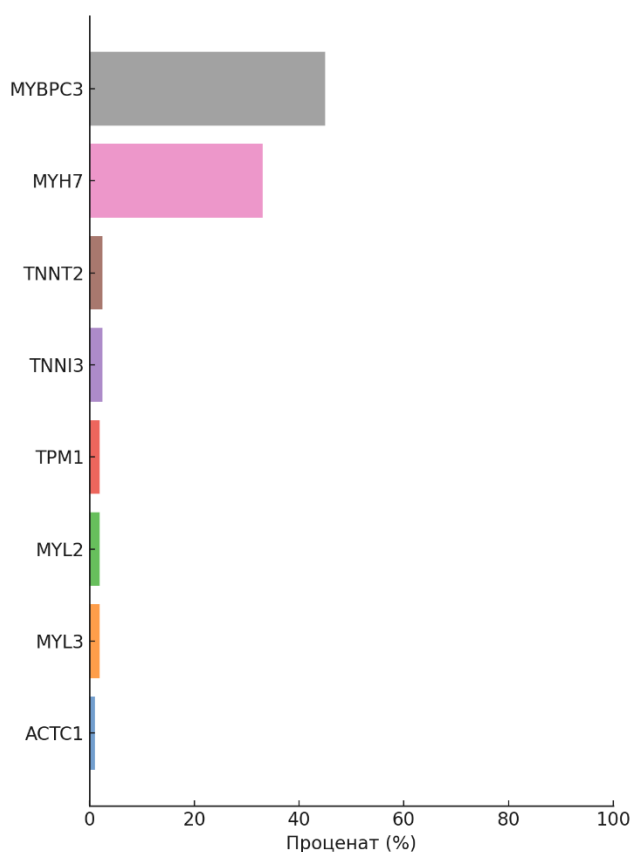
Поред мутација у генима *MYH7* и *MYBPC3*, код мањег броја пацијената са HCM-ом идентификоване су и мутације у гену *TNNT2* који кодира срчано-мишићни тропонин T2, *TNNI3* који кодира срчано-мишићни тропонин I, затим *TPM1* који кодира срчано-мишићни α -ланац тропомиозина, гени који кодирају лаке ланце срчано-мишићног миозина 2 и 3 (*MYL2* и *MYL3*) и *ACTC* који кодира лаки ланац α -срчано-мишићног актина (**Табела 7**) (98). HCM је комплексно обољење где је идентификовано више од 20 гена повезаних са овим обољењем. За покретање и регулацију контракција срца од великог значаја су гени који утичу на функцију калцијума и структуру саркомере (50).

Прецизни механизми развоја HCM-а нису у потпуности разјашњени, нарочито на који начин мутације гена саркомерних протеина проузрокују карактеристичне симптоме. Промене у овим генима доводе до хипертрофије кардиомиоцита односно задебљања леве коморе што субсеквентно доводи до смањења способности контракције и релаксације. Мутације у саркомерним протеинима повећавају активност миозинске АТРаза, ензима који омогућава неопходну енергију за покретање мишићне контракције. Повећана активност АТРаза доводи до веће потрошње енергије и повећаних контракција срчаног мишића. Овакав поремећај у енергетској равнотежи и контракцији миокарда може довести до потпуног одсуства релаксације миокарда (99).

Табела 7. Преглед најчешће мутираних гена и њихових функција код HCM-а

Ген	Протенин	Функција
<i>MYH7 Thick myofilament</i>	β -тешки ланац миозина	АТПазна активност, генерисање силе
<i>MYBPC3 Thick myofilament</i>	Протенин C који се везује за миозин	Срчана контракција
<i>TNNT2 Thin myofilament</i>	Срчани тропонин T	Регулатор интеракције актомиозина
<i>TNNI3</i>	Срчани тропонин I	Инхибитор интеракције актомиозина
<i>TPM1 Thin myofilament</i>	α -тропомиозин	Постављање тропонинског комплекса на срчани актин
<i>MYL2 Thick myofilament</i>	Регулаторни лаки ланац миозина	Протенин који се везује за тешки ланац миозина ⁷
<i>MYL3</i>	Есенцијални лаки ланац миозина	Протенин који се везује за тешки ланац миозина ⁷
<i>ACTC1</i>	Срчани α -актин	Интеракција актомиозина

На **слици 3.** је приказана процентуална заступљеност мутација гена код пацијената са НСМ-ом. Највећи број случајева обухвата мутације гена дебелих филамената, који учествују у регулацији контракције срчаног мишића, при чему је најзаступљенија мутација гена *MYBPC3*, са учесталошћу од 40-50%. Овај ген такође кодира протеин укључен у мишићну контракцију. Затим, следе мутације гена *MYH7*, који кодира β -тешки ланац миозина и представља саставни део дебелих филамената у саркомери. Овај протеин игра кључну улогу у генерисању силе током мишићне контракције, са учесталошћу од 33%. Гени са мањом заступљеношћу од 2-5% су пре свега мутације гена *TNNT2*, *TPM1*, *TNNI3*, *MYL3*, *MYL2* и *ACTC1*. Ретки случајеви мутација у генима *MYH6* и *TNNC1*, ређе се повезују са овим стањем, али могу допринети развоју болести (100).



Слика 3. Процентуална заступљеност гена код НСМ-а

1.1.6.1. Типови мутација код НСМ

Мисенс (енгл. *missense*) мутације, као најчешћи облик мутација присутних код пацијената са НСМ-ом. Ове мутације настају заменом једне базе ДНК другом у датом егзону, што доводи до промене једне аминокиселине које улазе у састав протеина. Овакве промене могу утицати на структуру и функцију протеина, нарочито протеина

саркомера који су кључни у контракцији (101). Ове мутације спадају у тачкасте (енгл. *Point Mutation*) које обухватају промене у једном пару нуклеотида (102). ДНК је организована у триплете нуклеотида који се зову кодони. Сваки кодон кодира одређену аминокиселину, што омогућава синтезу протеина. Промене кодона услед мутација могу довести до промене аминокиселина или до преране појаве стоп кодона (нонсенс мутације). Мисенс мутације најчешће погађају *MYH7*, које могу довести до замене аминокиселине и конформационих промена структуре протеина. Ове промене услед слабљења контрактилне функције срчаног мишића доводе до хипертрофије. Мутације у *MYBPC3* гену, често укључују инсерције (енгл. *insertion*) или додавање једног или више нуклеотида у ланац ДНК, али и делеције (енгл. *deletion*) које уклањају један или више нуклеотида у ДНК. Ови механизми доводе до промена оквира читања и до стварања нефункционалног протеина (103). Овако настао протеин се разграђује механизмима деградације бесмислених кодона (енгл. *nonsense-mediated decay*). У случају када су протеини нефункционални буду обележени молекулима убиквитина и разграђују се у протеинском комплексу протеасому, који разлаже овакве протеине. Резултат ових процеса је смањена количина функционалног протеина (104). Поменуте мутације попут делеција у генима *MYH7* и *TNNT2*, утичу на контрактилну способност срчаног мишића нарушавајући интегритет и функционалност саркомера (105).

Аутозомно-доминантни поремећаји могу довести до испољавања болести чак иако је пристуан један нормалан алел, кроз три главна молекуларна механизма:

1. Хаплоинсуфицијенција је стање где један функционални алел није довољан да произведе довољну количину протеина за одржавање нормалног фенотипа, док је други алел мутиран и нефункционалан.
2. Мутације могу довести до нове, токсичне функције протеина која нарушава интегритет ћелије (енгл. *gain-of-function*). Може се јавити као резултат мутација у одређеним протеинима који повећавају њихову активност или продужавају њихов функционални животни век, што може довести до хипертрофије.
3. Доминантни негативан ефекат представља ефекат протеина који је нефункционалан и доводи до нарушавања функције нормалног протеина који је настао немутираним алелом. Мисенс мутација у *MYH7* доводи до формирања протеина који се неправилно повезује са другим компонентама саркомера, нарушавајући целокупну функцију (106).

Поред мутација у генима који кодирају саркомерне протеине, код пацијената са HCM-ом су идентификоване и мутације у генима који кодирају протеине Z-диска и другим генима који нису директно повезани са саркомером. Мутације у овим генима могу допринети развоју болести кроз утицај на структуру и функцију других делова ћелија миокарда, чинећи патогенезу HCM-а још сложенијом. Истраживање ових различитих типова мутација и њиховог утицаја на протеине и функцију срца је од суштинског значаја за разумевање генетске основе HCM-а и потенцијално може довести до развоја нових дијагностичких и терапијских приступа.

1.1.6.2. Генетско тестирање код HCM

У дијагнози, лечењу и процени ризика код чланова породице пацијената са HCM-ом, главну улогу игра генетско тестирање (100). Оно укључује различите методе за детекцију промена у ДНК, хромозомима и протеинима, у циљу откривања абнормалности које могу изазвати болести. Методе које се користе за генетско тестирање јесу молекуларно, цитогенетско и биохемијско тестирање. За визуализацију хромозома и идентификацију структурне абнормалности користи се цитогенетско тестирање, док се за испитивање активности протеина користи биохемијско тестирање, што је значајно код метаболичких поремећаја. Течна хроматографија (енгл. *High-performance liquid chromatography*, HPLC), гасна хроматографија/масена спектрометрија (енгл. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC/MS), и тандем масена спектрометрија (енгл. *Tandem mass spectrometry*, MS/MS) су методе које се примњују у тестирању. Прецизна анализа гена и амплификација специфичних сегмената ДНК добија се молекуларним испитивањима која укључују секвенцирање (Сангера метода или секвенцирање нове генерације) и ланчану реакцију полимеразе (PCR). Ове методе се фокусирају на идентификацију специфичних мутација у ДНК и коришћене су у овој студији.

Генетска тестирања омогућавају свеобухватну анализу пет основних гена за HCM (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*), а панел може обухватити и друге гене попут *MYL2*, *MYL3* и *ACTC1*. Секвенцирање кодирајућих региона гена детектује мутације код 30% до 50% пацијената са HCM-ом, али је интерпретација налаза изазовна због присуства великог броја генетских варијанти (107).

1.2. Ћелијска смрт – основни концепти и механизми

У току свог живота, ћелија пролази кроз четири главна биолошка процеса: преживљавање, деобу, диференцијацију и смрт (108). Процес ћелијске смрти игра кључну улогу у елиминацији оштећених ћелија и одржавању хомеостазе организма, посебно током ембрионалног формирања ткива (109). Овај процес означава крај ћелијских функција, било као део природног циклуса замене старих ћелија новима, или као резултат патолошких стања попут болести или повреда. Класификација ћелијске смрти може се извршити на основу њених морфолошких, ензимолошких, функционалних или имунолошких карактеристика (110).

Комитет за номенклатуру ћелијске смрти (енгл. *Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) развио је смернице које дефинишу различите типове ћелијске смрти, што је значајно убрзало основна и примењена истраживања. Иако су критеријуми за класификацију променљиви, ћелијска смрт се генерално дели на два главна типа: случајну ћелијску смрт (енгл. *Accidental cell death*, ACD) и регулисану ћелијску смрт (енгл. *Regulated cell death*, RCD). Случајна ћелијска смрт је неконтролисан биолошки процес, који настаје услед екстремних физичких или хемијских оштећења. Насупрот томе, регулисана ћелијска смрт подразумева укључивање сложених сигналних путева и ефекторских молекула, чије активности могу бити модификоване манипулацијом

гена или употребом лекова. RCD се активира као реакција на продужене поремећаје унутар ћелије или екстрацелуларном окружењу, када адаптивни механизми не могу да се изборе са стресом и да успоставе хомеостазу. Иако RCD елиминира оштећене или потенцијално опасне ћелије, умируће ћелије такође ослобађају сигналне молекуле повезане са оштећењем (енгл. *Damage-associated molecular patterns*, DAMPs), који упозоравају организам на потенцијалну претњу. RCD обухвата неколико подтипова, укључујући програмирану ћелијску смрт (енгл. *Programmed cell death*, PCD), која обухвата апоптозу, пироптозу, некроптозу и аутофагију. Ови процеси се одвијају под физиолошким условима и играју кључну улогу у одржавању хомеостазе и заштити организма од оштећених или дисфункционалних ћелија (111,112).

Ћелијска смрт се према морфолошким карактеристикама традиционално дели на три главна типа: апоптозу (тип I), аутофагију (тип II) и некрозу (тип III).

Апоптозу су први описали *Kerr, Wyllie* и *Currie* 1972. године наглашавајући њену важност у заустављању ћелијске пролиферације. У процесу разградње током апоптозе учествују ензими *caspase*, који могу бити иницијаторски или извршни у зависности од функције коју обављају. Када се ови ензими активирају ћелија пролази кроз низ морфолошких промена ћелија, као што су заобљавање, смањење запремине (пикноза), кондензација хроматина и разградња језгра (кариорексис). За разлику од других облика програмиране ћелијске смрти она је пожељан облик јер не долази до распадања ћелијског садржаја и изливања у околни простор. Процес је под контролом регулаторних молекула, који се активирају у случају абнормалности ћелија. Дисрегулација ових сигналних каскада доводи до настанка различитих обољења, па су зато предмет истраживања (113–115).

Аутофагија је кључни механизам преживљавања ћелија у условима стреса, као што су гладовање, оксидативни стрес или оштећење органела. Она игра кључну улогу у уклањању оштећених органела и акумулираних протеина који могу бити токсични. На овај начин, аутофагија доприноси одржавању ћелијске хомеостазе и спречава развој болести. На пример, у случају неуродегенеративних болести као што је Алцхајмерова болест, аутофагија може уклонити токсичне агрегате протеина, смањујући њихов утицај на неуроне и продужавајући њихову функционалност. Слично томе, у одређеним врстама карцинома, аутофагија може инхибирати раст туморских ћелија елиминисањем оштећења која подстичу канцерогенезу. Међутим, као и код апоптозе, ако су њени регулаторни механизми оштећени може довести до настанка различитих обољења, попут неуродегенеративних болести. У каснијим стадијумима болести, прекомерна аутофагија може узроковати деградацију виталних ћелијских компоненти, чиме се убрзава губитак неурона. Код карцинома, одређени типови тумора користе аутофагију за обезбеђивање енергије и преживљавање у условима недостатка хранљивих материја, што омогућава њихову прогресију и отпорност на терапије. Такође, нерегулисана аутофагија може допринети пропадању здравих ткива, што је примећено у одређеним облицима миопатија (110,116,117).

Некроза представља неконтролисан процес ћелијске смрти који доводи до оштећења ткива услед излагања јаким физичким, хемијским или механичким факторима. За разлику од апоптозе, која је регулисана и строго контролисана, некроза је неконтролисана смрт. Овај процес најчешће настаје услед неких токсичних супстанци, повреда или поремећаја перфузије. Током некрозе долази до пуцања ћелијске мембране и ослобађања цитоплазматског садржаја у околно ткиво, што изазива упалне реакције. Ослобођене компоненте ћелије активирају имуне ћелије, што доводи до запаљенских реакција. Резултат тога може бити оштећење околних ткива и могу изазвати озбиљне последице по функцију органа и система (111,118).

Поред апоптозе, аутофагије и некрозе, постоје и неки специфични типови ћелијске смрти који имају улогу у различитим патолошким и физиолошким стањима. Ови процеси укључују фероптозу, некроптозу, пироптозу и имуногену ћелијску смрт, који могу довести до запаљенских реакција и представљају предмет бројних истраживања у области циљане терапије (111,119).

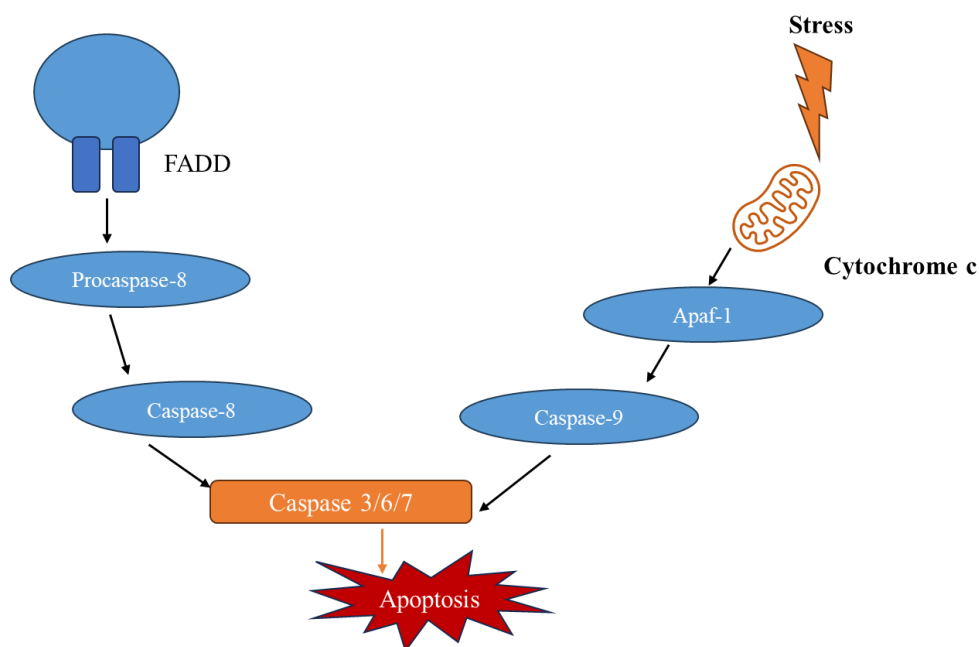
1.2.1. Апоптоза – молекуларни механизми

Апоптоза је процес који је одговоран за одржавање хомеостазе у организму. Уколико дође до оштећења ДНК, механизми поправке ћелија, попут p53 протеина, откривају и исправљају оштећење или улазе у апоптозу, тако да се генска мутација не преноси. Ако су ови путеви на неки начин нерегулисани, могу се појавити различита патолошка стања као што су карциноми. Такође, имунолошки систем може покренути апоптозу у ћелијама услед присуства неких вируса или других патогена и разних стресора као што су оксидативни стрес или зрачење. Постоје ензими који су присутни у неактивном облику ћелија (проензими) и активирају се као одговор на спољашње или унутрашње оштећење ДНК. Ови ензими припадају породици протеолитичких ензима (*Caspase*) и играју кључну улогу у регулацији и извршавању апоптозе. Њихова активација доводи до разградње протеина и смрти ћелија. У зависности од механизма деловања постоје иницијаторске *caspase* (2,8,9 и 10), које покрећу апоптозу и ефекторске *caspase* (3,6 и 7), које су одговорне за завршну фазу апоптозе (120–123).

Активација апоптозе може бити спољашња и унутрашња (124). Спољашњи пут активације започиње везивањем лиганда са рецепторима из породице TNF/Fas на површини ћелије. Везивањем за Fas рецептор (познат и као CD95) доводи до формирања сигналног комплекса (*Death-inducing signaling complex*, DISC) који се састоји од различитих протеина, међу којима caspase-8 постаје активна претварањем из проензима у активни ензим. Каскадна активација каспаза затим доводи до карактеристичних морфолошких промена у ћелијама, укључујући фрагментацију једра и ћелијске мембране, што је кључно за елиминацију оштећених ћелија (125,126).

Унутрашњи (интризични) пут активације започиње као одговор на различите стимулсе из околне средине попут унутрашњег ћелијског стреса (оштећења ДНК или оксидативног стреса). С обзиром да овај процес зависи од пропустљивости мембране

митохондрије за поједине протеине назива се и митохондријским путем. Услед сигнала који доводе до пропустљивости митохондрија ослобађа се цитохром с у цитоплазму, што иницира формирање апоптотског комплекса, који се састоји од цитохром-а с, АПАФ-1 и проензима caspase-9. Овај комплекс, познат као апоптозом, активира caspase-9, која затим покреће каскаду реакција које доводе до активације caspase-3, што доводи до разградње ћелијских протеина и ДНК (Слика 4) (127–129).



Слика 4. Сигнални путеви који доводе до активације апоптозе

У процесу апоптозе учествује и читав низ регулаторних протеина који могу утицати на овај процес. BAX је проапоптотски протеин из породице BCL-2 протеина. Његова основна улога јесте да промовише апоптозу повећањем пропустљивости митохондријалне мембране, што доводи до ослобађања цитохрома с и активације каскаде *caspase*. Супротно томе, BCL2 је антиапоптотски протеин који спречава апоптозу везујући и инхибирајући проапоптотске протеине, као што је BAX, чиме се спречава пропустљивост митохондријалне мембране и инхибира апоптоза (130). Сматра се да равнотежа између активности BAX-а и BCL2-а, игра кључну улогу у одређивању вероватноће да ће ћелија проћи кроз процес апоптозе (131). У овој дисертацији ћемо анализирати експресију *caspase* 3, 8 и 9, као и однос *BAX/BCL2*, који су кључни за процес ћелијске смрти.

1.2.2. Апоптоза и регенеративни потенцијал кариомиоцита

Развоју и прогресији CVD-а доприноси у великој мери и губитак терминално диференцираних кардиомиоцита процесом апоптозе (132). Срчани мишић услед повећаног ћелијског стреса и запаљенских реакција постаје подложнији апоптози, нарочито током раних фаза болести, када се јављају структурне и функционалне промене у срцу и крвним судовима (133). Овај механизам апоптозе од суштинског је

значаја за нормалан развој срца током ембриогенезе, где прецизно уклањање ћелија омогућава правилну хистогенезу ткива и органа. Већина кардиомиоцита има дуг животни век, и у нормалним условима апоптоза је у здравом миокарду ретка, али је битна за уклањање оштећених ћелија. Зато ћелија покушава да различитим механизмима поправи оштећења настала услед старења, оксидативног стреса или токсина, како би смањила активацију апоптозе (134).

Стања као што су хипертензија, инфаркт миокарда, срчана инсуфицијенција и атеросклероза често доводе до ћелијског стреса и запаљенске реакције у срчаном ткиву (135). Током ових стања јављају се различити облици ћелијске смрти у кардиомиоцитима. Апоптоза се активира везивањем рецептора смрти на површини ћелије, које активира спољашњи пут апоптозе, као и посредством механизма митохондријалног пута. Процес се покреће услед различитих стресора, као што су повећани нивои цитокина, оксидативни стрес и оштећење ДНК. Повећан ниво цитокина стимулише спољашњи пут апоптозе. Истраживања су показала да инхибиција апоптозе и апоптопских путева може значајно смањити оштећења срчаног ткива и спречити прогресију болести. Ова сазнања сугеришу могућност за развој терапијских стратегија које би инхибирале апоптозу у кардиомиоцитима, чувајући функцију осталих ћелија (136,137).

Фетални и неонатални кардиомиоцити имају способност деобе, што омогућава репарацију оштећеног ткива у случају повреде или стреса. Ограничени регенеративни капацитет миокарда код одраслих често доводи до трајних оштећења срчаног мишића након губитка кардиомиоцита. Губитак кардиомиоцита утиче на способност срца да одржи нормалан проток крви. Због тога што срце не може нормално да пумпа крв, долази до слабљења контрактилне функције срца и до настанка хроничних обољења попут срчане инсуфицијенције. Иновативне методе лечења примењују плурипотентне матичне ћелије, које имају способност диференцијације у било који тип ћелија, како би смањили оштећења срчаног мишића. То су пре свега ембрионалне матичне ћелије и индуковане плурипотентне матичне ћелије добијене из зрелих диференцираних ћелија (138,139). Трансплантација ћелија диференцираних у ћелије које личе на ћелије срчаног ткива, у комбинацији са другим типовима матичних ћелија, може довести до обнове оштећеног ткива миокарда. Циљ овог приступа је спречавање брзог одумирања трансплантираних ћелија, промовисање формирања нових крвних судова и смањење запаљења, како би очувале нове ћелије. Овај приступ омогућава замену нефункционалног дела ткива, али, услед потенцијалних ризика неопходно је спровести додатна истраживања (140).

Иако је апоптоза у здравом миокарду механизам процес који захтева додатна истраживања, наводи се да игра улогу у одржавању хомеостазе срчаног мишића елиминацијом кардиомиоцита оштећених због генотоксичних агенаса или неправилно савијених протеина. Овај механизам спречава накупљање оштећених ћелија, одржавајући функционалност миокарда. Додатна истраживања су неопходна,

нарочито о механизмима сигналних путева и како се они разликују у физиолошким и патолошким условима.

1.3. Редокс статус, оксидативни стрес и CVD

Срце троши највећи проценат доступног кисеоника и због тога захтева повећање метаболичког капацитета у условима екстремних физиолошких оптерећења, као што су хипоксија или исхемија. Постоје ситуације када су захтеви метаболизма повећани, а доступност кисеоника је ограничена, па се активира анаеробни метаболизам (141). Такви процеси утичу на промене у структури и функцији кардиомиоцита кроз регулацију гена и активности протеина. Срце је способно да се прилагоди умереној количини стреса различитим механизмима одбране, али када стрес пређе у хроничан, адаптација се може претворити у патолошко ремоделовање миокарда и да поремети нормалну функцију срца (142,143).

Редокс статус одржава равнотежу између процеса оксидације и редукције, и игра кључну улогу у очувању нормалне функције кардиомиоцита. У нормалним условима, ћелије су изложене одређеним нивоима ROS-а, који представљају нуспродукте метаболизма, нарочито након процеса попут ћелијског дисања. Током појединих процеса као што су хипоксија, исхемија, УВ или јонизујуће зрачење, продукција ROS-а се значајно повећава. Када овај пораст премаше капацитет антиоксидативне заштите, долази до оксидативног стреса. Да би се ћелија изборила са повишеним нивоима ROS-а, она користи антиоксидативне системе, који одржавају редокс хомеостазу и штите ћелијске структуре од оштећења (144,145).

Када је оксидативни стрес повишен он представља потенцијални фактор ризика од развоја CVD-а, као што су HCM, срчана инсуфицијенција и атеросклероза. Ензимске антиоксиданте чине супероксид дисмутаза (SOD), каталаза и глутатион-пероксидаза (GPx), док неензимске антиоксиданте чине глутатион, витамини и флаваноиди. Пошто један од најопаснијих облика ROS-а чини супероксид анјон ($O_2^{\bullet-}$), ензим SOD претвара овај анјон у водоник-пероксид (H_2O_2). Они су прва линија одбране ћелије од оксидативног стреса. Каталаза разлаже водоник-пероксид у воду и молекуларни кисеоник, док GPx разлаже водоник-пероксида уз употребу глутатиона као ко-фактора. Глутатион има важну улогу да неутралише слободне радикале. Ови антиоксидативни системи заједно делују како би контролисали ниво ROS-а, спречавајући настанак оштећења ћелија и развој оксидативног стреса. Када су нивои ROS-а ниски, они учествују у нормалној ћелијској сигнализацији и одговору на стрес, док њихово прекомерно присуство често доводи до патолошких стања, као што су хипертрофија, фиброза и срчана инсуфицијенција (142,145).

На крају, редокс сигнализација има двојаку улогу у кардиоваскуларном здрављу и настанку болести. У почетним фазама оксидативног стреса ROS делују као сигнални молекули који активирају адаптивне одговоре и покретање патолошких процеса када антиоксидативни капацитети постану недовољни, што наглашава важност балансирања редокс стања за очување срчане функције.

1.3.1. Кардиопротективне стратегије и потенцијал антиоксидативне терапије

Савремене стратегије и тераписјки приступи усмерени су све више на очување функције срца и смањење оштећења изазваних оксидативним стресом. Главни циљ ових стратегија је смањење нивоа ROS-а, чиме се спречава оштећење липида, протеина и ДНК. Ћелија користи механизме за детекцију повишених нивоа ROS-а, што активира нуклеарни фактор Nrf2, који регулише експресију антиоксидативних гена. Активацијом овог сигналног пута са Nrf2 повећава експресију ензима који штите ћелију од оксидативног оштећења ткива (7).

Природни извори антиоксиданса из воћа и поврћа, као и витамини С и Е, играју значајну улогу у уклањању оксидативног стреса и на тај начин одржава нивое слободних радикала. Поред природних антиоксиданса који су присутни у храни, синтетички облици, попут коензима Q10, ресвератрола и омега-3 масних киселина, показали су се ефикасним у заштити срчаног мишића. Њихова потенцијална употреба у терапијама које комбинују антиоксидативна својства са иновативним техникама, као што су генска терапија и наноносачи, у превенцији и лечењу CVD-а, захтева додатна истраживања. Савремени приступи, као што је употреба наноносача за антиоксидансе, омогућавају усмеравање терапијских агенаса ка срчаном ткиву, чиме се повећава ефикасност и смањују нежељени ефекти (86,146–148).

Истраживања у овој области могу значајно утицати на побољшање квалитета живота пацијената са кардиоваскуларним обољењима, омогућавајући не само лечење већ и превенцију потенцијалних компликација.

1.4. Структура и функција срчаног мишића

Кардиомиоцити, ћелије које чине миокард су краће и тање од скелетних миоцита, са централно постављеним једром. Ћелије су цилиндричног облика, надовезују се једна на другу посредством *discus intercalatus*-а. Интеркалатни дискови, јединствени за кардиомиоците, чине међућелијске спојеве који садрже *fascia adherens*, *macula adherens* и *nexus*-а. Кардиомиоцити повезани интеркалатним дискусима и бочним спојницама, формирају тродимензионалну мрежу која омогућава делимично успоравање импулса, али и пропагацију кроз миокард. Оваква спрецифична грађа омогућава да талас деполаризације преплављује од базе ка врху срца, односно омогућава постојање срчаног циклуса. На уздужном пресеку кардиомиоцита запажа се њихова попречна испруганост и једно или два централно постављена једра. На површини ћелије налази се сарколема, а унутрашњост је испуњена миофибрилима.

Кардиомиоцити су испуњени миофибрилима, протеинским комплексима који представљају главни контрактилни елемент мишићног ткива. Миофибрили се састоје од танких (актинских) и дебелих (миозинских) филамената. Њихова уређеност у простору даје карактеристичну попречну испруганост видљиву на дужним пресецима

под светлосним микроскопом. Саркомера је дефинисана као растојање између две Z-линије и представља основну контрактилну јединицу кардиомиоцита. Актински филаменти причвршћени су за Z-линију, а дебели миозински за централну M-линију. Светла I пруга обухвата танке филаменте, док се кроз њен центар пружа танка Z-линија. Средишњи део тамне A-пруге, познат као H-пруга, садржи искључиво дебеле филаменте, док се на периферији A-пруге филаменти преклапају, стварајући густу и тамнију зону.

Актински филаменти су изграђени од протеина актина, топомиозина и тропонина. Актин је организован из два ланца F-актина у облику α -хеликс структуре. Оба су настала полимеризацијом глобуларних мономера од G-актина на којима се налазе места за везивање миозинских главица. Поред актина, танки филаменти садрже тропомиозин и тропонин. Тропомиозин је дугачак протеин формиран од два полипептидна ланца, увијена у спиралну структуру. Када је мишић релаксиран, тропомиозин прекрива активна места на G-актину, што онемогућава везивање миозинских главица. Током контракције се завлачи у жлеб између два актинска ланца ослобађајући активна места. Тропонин је комплекс три субјединице (T, C и I): тропонин T је везан за тропомиозин, тропонин C је место везивања калцијумових јона, чиме започиње мишићна контракција, а тропонин I инхибира интеракцију са миозином.

Дебели миозински филаменти садрже 200-350 молекула миозина, чија структура подсећа на палицу за голф. Највећи део миозинског молекула чини реп облика штапа за који је зглобљена главица облика лопте. Миозинске главице, распоређене спирално, образују такозване "попречне мостове" са актинским филаментима током мишићне контракције.

Кардиомиоците карактерише присуство бројних митохондрија које обезбеђују енергију за контракцију. Саркоплазматски ретикулум је организован у цевчице које формирају терминалне цистерне на граници светлих и тамних пруга. Терминалне цистерне престављају депо јона калцијума. Изнад цистерни плазмалема прави уврате T- тубуле који ступају у контакт са терминалним цистернама формирајући дијаде кардиомиоцита. T-тубули доводе импулс до терминалних цистерни, а то доводи до отварања напоном-контролисаних калцијумових канала и ослобађања јона калцијума у цитоплазму кардиомиоцита. Везивање калцијума за тропонин C доводи до промене конфигурације тропонинског комплекса и откривања везујућих места на G-актину. У том тренутку долази до разградње АТФ-а на миозинској главици, при чему се ослобађају ADP и фосфатна група, што обезбеђује енергију за постављање миозинских главица на везујућа места на G-актину, чиме се формирају попречни мостови. Енергија ослобођена разградњом ADP-а у AMP покреће 'завеслај' миозинске главице, што омогућава контракцију мишићног влакна (149–151).

1.5. Експресија гена и полиморфизми у контексту кардиомиопатија

Процес експресије гена укључује трансформацију генетске информације из ДНК у функционални протеин или молекул. Овај процес је строго регулисан и укључује

више биохемијских механизма, укључујући епигенетске и посттранскрипционе модификације. У контексту кардиомиопатија, промене у експресији гена, настале као последица мутација или полиморфизама, могу значајно утицати на функцију срчаних протеина, што доводи до поремећаја у контрактилности, релаксацији и структуралној интеграцији миокарда (152,153).

Полиморфизми у геному, попут SNP-ова, могу утицати на експресију гена и изазвати дисфункцију протеина, што има значајне импликације у развоју и прогресији кардиомиопатија (154). Мерење експресије гена омогућава одређивање да ли је генска активност повећана (*upregulated*) или смањена (*downregulated*). Код кардиомиопатија, мутације у специфичним генима могу значајно утицати на функцију срчаних протеина, што изазива поремећаје у контракцији, релаксацији или нарушавање структурног интегритета срчаног мишића. Ове промене играју кључну улогу у развоју и прогресији болести. Разумевање експресије гена у кардиомиопатији је кључно из неколико разлога. Прво, помаже у идентификацији специфичних гена и молекуларних путева укључених у болест, нудећи потенцијалне мете за терапијске интервенције. Друго, омогућава истраживачима да разликују различите врсте кардиомиопатије и предвиде прогресију болести (153,155,156).

Генски полиморфизми представљају варијације у наследном материјалу, односно присуство различитих алела једног гена у популацији. Ове варијације су значајне јер могу утицати на настанак и развој различитих болести, нарочито оних полигене природе, где утицај више гена доприноси патогенези. Основни типови ДНК полиморфизама укључују полиморфизам појединачних нуклеотида (енгл. *Single nucleotide polymorphisms*, SNP), полиморфизам броја узастопних поновљених секвенци (енгл. *Variable number of tandem repeats*, VNTR) и делеционе/инсерционе полиморфизме (157).

Најчешћи тип генетских полиморфизама представљају SNP-ови, који настају кад се један нуклеотид у молекулу ДНК замени другим. У зависности од њиховог утицаја на протеин, ове супституције могу бити без промене аминокиселине (енгл. *silent*) или довести до замене аминокиселине (*missense*), што утиче на функцију протеина. SNP-ови се могу налазити у кодирајућим (егзонима) и некодирајућим (интронима или промоторским регионима) деловима гена и често се користе као генетски маркери у истраживањима повезаности генома са болестима (енгл. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS).

Истраживања показују да су одређени SNP-ови могу играти важну улогу у предиспозицији за настанак болести, јер утичу на функцију гена. Генске мутације могу да утичу на ензиме укључене у метаболизам лекова, као и на циљне молекуле лекова. Ове мутације такође утичу и на способност организма да се одбрани од патогена. На пример, различити полиморфизми у *Toll-like* рецепторима могу бити повезани са развојем меланома и прогнозом других болести, што показује важност SNP-ова у генетским истраживањима. У контексту кардиомиопатија, SNP-ови могу

утицати на експресију гена који регулишу структуру и функцију срца, чиме доприносе настанку и прогресији болести (158).

1.5.1. Значај qRT-PCR у истраживању експресије гена и SNP-ова

qRT-PCR представља златни стандард за анализу експресије гена и SNP-ова. Ова метода омогућава праћење промене количине нуклеинских киселина у реалном времену, чиме се омогућава тачна и поуздана анализа генетских варијанти. Јачина флуоресценције у qRT-PCR-у је пропорционална количини насталог PCR производа, што омогућава како апсолутну, тако и релативну квантификацију циљаних секвенци. Ова метода је драгоцену у истраживању јер омогућава прецизну, брзу и поуздану анализу експресије гена и генетских варијанти, што је од изузетног значаја у генетским и биомедицинским истраживањима (159). Идентификација и анализа генетских полиморфизама играју виталну улогу у напретку персонализоване медицине. На пример, полиморфизми у генима *CYP450* и *GST* могу утицати на метаболизам лекова, док SNP-ови у генима *NRF2* и *GSTP1* играју улогу у регулацији редокс статуса и оксидативног стреса.

Анализа генетских полиморфизама доприноси дубљем разумевању механизма који узрокују развој болести. Крајњи циљ ових истраживања је развој прецизнијих терапијских приступа и побољшање квалитета живота пацијената.

1.6. Употреба вештачке интелигенције у медицини

Вештачка интелигенција (енгл. *Artificial intelligence*, AI) постала је кључни алат који доприноси побољшању дијагностике и развоју нових терапијских приступа захваљујући својој способности за обраду и анализу великих скупова података, као и својим предиктивним могућностима (160). Једна од главних предности AI јесте способност обраде и анализе сложених генетских и клиничких података, што омогућава персонализовани приступ лечењу пацијената.

AI се ефикасно примењује у процени ризика од CVD-а путем напредних алгоритама, који идентификују генске варијације и процењују утицај животних фактора (161). Користи се у фармакогенетици за предвиђање индивидуалног одговора пацијената на одређене лекове путем анализе генетских профила пацијената. Поред тога, употреба алата из области AI доприноси идентификацији специфичних гена и биомаркера који указују на присуство одређених болести, што унапређује рану дијагнозу и омогућава правовремено реаговање терапије (162).

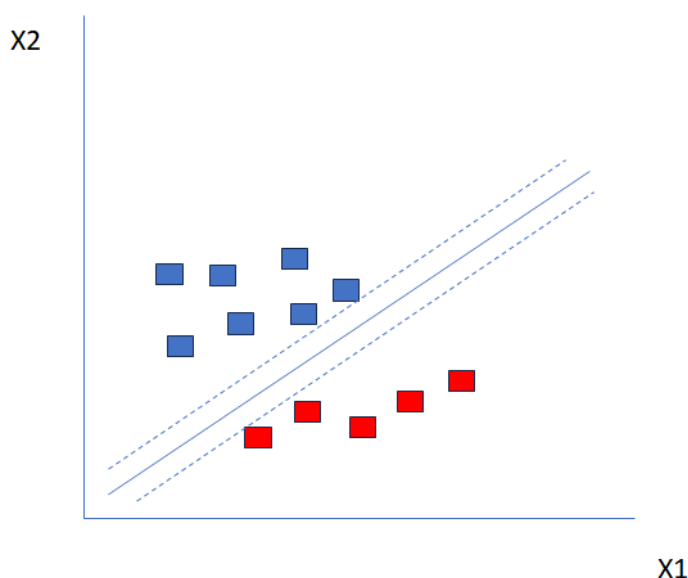
1.6.1. Употреба машинског учења у кардиоваскуларним болестима

Машинско учење (*Machine learning*, ML), као подобласт AI, омогућава анализу великих скупова података и идентификацију специфичних образаца који указују на присуство CVD. Коришћењем напредних алгоритама анализирају се генетски

профили и клинички подаци пацијената, што омогућава прецизније предвиђање ризика и ток болести. Постоје три основна типа ML који се примењују у медицинским истраживањима:

1. **Надгледано учење** се широко примењује у кардиологији за обуку алгорита на означеним скуповима података са познатим улазним и излазним параметрима. Користи се за класификацију пацијената и дијагноза или за предикцију нумеричких вредности (163). Надгледано учење је од великог значаја, нарочито у генетици, јер се користи за предвиђање болести, одговора на терапије и идентификацију генетских варијација повезаних са специфичним обољењима. Главни изазов овог приступа је то што за достизање успешности овог учења захтева велики сет података.
2. **Ненадгледано учење** користи алгорита који анализира скуп улазних података без унапред дефинисаних излаза. Његова улога је да открије скривене структуре и обрасце у подацима, што је корисно код анализе генске експресије, идентификације нових механизма болести и класификације пацијената на подгрупе према сличности (164).
3. **Учење уз подстицаје** мање је заступљено у медицини, али се примењује за оптимизацију различитих медицинских процедура.

У медицини се ML ослања на примену различитих алгорита, међу којима су *Support Vector Machines* (SVM) (Слика 5), вештачке неуронске мреже (енгл. *Artificial Neural Networks*, ANN) и *Random Forest* (165).



Слика 5. Репрезентација методе потпорних вектора у R2 простору

Кардиоваскуларна генетика се бави идентификацијом генетских варијанти које учествују на развој и ток болести (166). Савремени приступи, који укључују анализу експресије гена, омогућавају откривање биомаркера и генетских варијација које корелирају са специфичним болестима (167). Повећана доступност технологија за секвенцирања генома омогућила је истраживачима да анализирају цео геном пацијената и идентификују честе и ретке генске варијације које нису присутне код здравих особа (168). Комбиновање генетских података са еколошким и клиничким факторима игра кључну улогу у превенцији болести и креирању нових терапијских стратегија (169).

ML може помоћи у идентификацији образаца експресије гена повезаних са специфичним биомаркерима, предикцији ризика од болести анализом комбинације генетских и клиничких података и идентификацијом специфичних мутација код пацијената са ретким обољењима (167). На пример, машинско учење је корисно за откривање генетских основа кардиомиопатија и за боље разумевање њихове патогенезе (170). Уз помоћ ових метода могуће је утврдити које генетске варијације доприносе већем ризику од развоја кардиоваскуларних болести, као и које биолошке функције су највише погођене (171). Овакав приступ омогућава идентификацију ретких и честих генетских варијација, што олакшава проналажење мутација повезаних са ризиком од развоја кардиоваскуларних болести (172,173).

Gene Expression Omnibus (GEO) и сличне јавне базе података представљају важан ресурс за анализу генске експресије и функционалних механизма кардиомиопатије. Ове базе садрже податке о експресији гена из великог броја експеримената и студија. Она нуди истраживачима алате за претрагу, анализу и визуелизацију података релевантних података што истраживачима омогућава поређење профила експресије гена у различитим условима (174).

Истраживачи имају могућност приступа обимним скуповима података, што GEO чини вредним ресурсом за спровођење свеобухватних студија и мета-анализа. Коришћењем ове базе могу се упоредити профили експресије гена у различитим физиолошким и патолошким условима или типовима узорака, што олакшава идентификацију гена који имају смањену или повећану експресију. Прегледни радови који се ослањају на анализу података из GEO базе омогућавају идентификацију нових образаца који нису били уочљиви у изолованим студијама. Овакав приступ може значајно унапредити откривање нових биомаркера и циљаних терапијских стратегија (175).

1.6.2. Употреба машинског учења у проучавању кардиомиопатије

AI уз примену ML, игра кључну улогу у анализи експресије гена код кардиомиопатија, омогућавајући идентификацију образаца карактеристичних за одређене подтипове болести. На пример, истраживање *Alimadadi* и сар., демонстрирало је употребу ML за класификацију кардиомиопатије на основу транскриптомских података. Овакви алгоритми такође могу открити биомаркере који

указују на ток болести и одговор на терапију, омогућавајући рану дијагнозу и персонализовани приступ лечењу.

Комбиновање мултиомских података са AI алгоритмима додатно унапређује негу пацијената идентификацијом специфичних биомаркера и развој прецизне медицине (176). На пример, алгоритми могу предвидети ризик од развоја кардиомиопатије или прогресивни ток болести анализом генетских и клиничких података пацијената (162,177). Према истраживању које су спровели *Pičulina* и сар., предиктивни модели могу тачно проценити клиничке параметре код пацијената са НСМ-ом (178). AI омогућава и истовремену анализу експресије гена и других параметара, што доприноси персонализованом терапијском приступу пацијентима (179).

2.ЦИЉ СТУДИЈЕ

ЦИЉ СТУДИЈЕ

Главни циљ ове дисертације је испитивање експресије гена повезаних са апоптозом, редокс статусом и патогенезом кардиомиопатије, у циљу бољег разумевања сложених молекуларних механизма ове болести. Поред тога, истраживање примењује вештачку интелигенцију за анализу клиничких и генетских података, у циљу прецизније дијагнозе и персонализованог приступа лечењу пацијената. Такође, један од циљева истраживања јесте испитивање полиморфизама у генима чије су мутације одговорне за настанак HCM-а.

На основу дефинисаних циљева ове студије постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитати експресију гена повезаних са апоптозом, редокс статусом и патогенезом кардиомиопатије употребом методе qRT-PCR.
2. Класификовати пацијенте са HCM-ом на основу експресије гена и анализе клиничких података.
3. Анализирати присуство и учесталост мутација у генима укљученим у патогенезу болести.
4. Применити алгоритме вештачке интелигенције за анализу скупа клиничких и генетских података у циљу идентификације потенцијалних биомаркера.

а. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

1. Експресија специфичних гена укључених у апоптозу, редокс статус и патогенезу кардиомиопатије значајно варира код пацијената са HCM-ом.
2. Постоји корелација између степена експресије одређених гена и тежине клиничких симптома код пацијената са HCM.
3. Одређени полиморфизми у генима укљученим у патогенезу болести утичу на ризик од развоја HCM-а и њен клинички ток.
4. Алгоритми вештачке интелигенције могу успешно идентификовати обрасце у експресији гена и клиничким подацима, чиме омогућавају прецизну класификацију пацијената и прогнозу болести.
5. Одређени обрасци у експресији гена и учесталости мутација могу служити као биомаркери за рано откривање и прогнозу кардиомиопатије.

3.МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део истраживања у оквиру ове дисертације спроведен је у Лабораторији за биоинформатику и примењену биологију, Института за информационе технологије Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу. Истраживање је спроведено у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (пројекат број III41007). Дисертација је додатно финансирана из програма Horizon Europe Европске уније (грант број 101080905). Прикупљање узорка крви обављено је у сарадњи са Институтом за кардиоваскуларне болести Војводине у Сремској Каменици и Клинике за васкуларну хирургију и Клинике за кардиохирургију Универзитетског клиничког центра Србије.

3.1 Хемикалије и реагенси

У извођењу експеримента коришћено је више различитих реагенаса: тризол за изолацију РНК (*TRI Reagent*, Sigma-Aldrich, Штајнхајм, Немачка), фосфатни пуфер (*Phosphate-Buffered Saline – PBS*, Capricorn Scientific, Немачка), изопропанол PCR чистоће, етанол (Thermo Fisher, САД) и хлороформ (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, САД). У експерименту су коришћени прајмери за PCR реакцију (Thermo Fisher, САД), кит за реверзну транскрипцију (*EurX NG dART RT kit*, eurX Genetics EUROPE, Пољска) и кит за PCR који је коришћен за одређивање релативне експресије гена (*GoTaq™ qPCR Master Mix*, Promega, САД). За одређивање полиморфизма коришћен је кит за изолацију геномске ДНК (*Purelink™ genomic DNA kit*, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, САД) и кит за PCR реакцију (*TaqMan SNPs Genotyping Assay*, Applied Biosystems, САД).

3.2. Етичко одобрење

Прикупљање узорака је реализовано у сарадњи са Универзитетским клиничким центром Србије и Институтом за кардиоваскуларне болести Војводине у Сремској Каменици уз претходно добијену сагласност и одобрење етичких комитета обе установе: Института за кардиоваскуларне болести Војводине у Сремској Каменици (решење бр: 1813-1/4) и Универзитетског клиничког центра Србије, Клинике за кардиологију (решење бр: 2551-01/11). Узорци су прикупљени у оквиру пројекта SILICOFCM (пројекат број 777204).

3.3. Узорковање крви

Овом студијом били су обухваћени узорци добијени од укупно 93 пацијената (57 мушкараца (м) и 36 жена (ж)) са дијагнозом HCM-а (**Табела 8**). Узорци пуне крви запремине 2 mL од сваког пацијената прикупљени су у вакутајнерима без антикоагуланса (*BD Vacutainer®*, САД). Од сваког пацијента претходно је прибављен писмени пристанак за учешће у истраживању у складу са принципима Хелсиншке

декларације. Аликвоти са узорцима чувани су на температури од -20°C, да би по завршетку прикупљања узорака, била изолована укупна РНК из сваког од њих.

Табела 8. Клиничке карактеристике пацијената по групама

Локација	Пацијенти	Пол Ж/М	Године	NYHA класа (I/II/III)
Прва група	43	13/30	60.4±10.3	19/20/4
Друга група	50	22/28	53.5±13.1	30/18/2

3.4. Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qRT-PCR)

3.4.1. Изолација РНК

Изолација РНК из пуне крви пацијената са HCM-ом извршена је коришћењем Тризол реагенса уз примену модификованог протокола (180). Аликвоти замрзнутих узорака крви одмрзавани су у воденом купатилу 20 минута. Након потпуног одмрзавања, узорцима је додато 1 mL крви и 2 mL PBS-а, након чега су центрифугирани на 10,000 g (RCF) у трајању од 5 минута. Супернатант је одбачен, а пелет је ресуспендован у 500 µL Тризола. После инкубације на собној температури, узорци су центрифугирани на 1,000 g (RCF) током 5 минута. Након тога у супернатант је додато 100 µL хлороформа и микротубе су добро вортексоване 15 секунди. Након држања на собној температури 2-3 минута, узорци су центрифугирани на 15,000 g (RCF) током 15 минута на 4 °C. Последњи корак је примењен у циљу издвајања 3 фазе узорка: горња бистра водена фаза са РНК, средња фаза са ДНК и доња органска фаза са липидима.

У нашем експерименту средња фаза, која садржи ДНК, задржана је за даља испитивања и генетска тестирања складиштењем на -80 °C. Водена фаза је пажљиво пребачена у нову микротубу, а РНК је преципитирана додавањем 250 µL изопропанола и инкубирана 10 минута на собној температури. Преципитирана РНК је затим центрифугирана на 12,000 g (RCF) током 10 минута на 4 °C. Супернатант је одливен, а пелет је испран два пута са 80% етанолом, уз центрифугирање на 7,500 g (RCF) током 5 минута на 4 °C. Након уклањања супернатанта пелет је остављен да се осуши у сувом купатилу (*DLABHB120-S Dry Bath*, САД), а затим ресуспендован у 30 µL воде без рибонуклеазе. Овако припремљена РНК држана је на -80 °C до извођења наредног корака.

3.4.2. Реверзна транскрипција (RT-PCR)

Пре претварања РНК у комплементарну ДНК (*енгл. Complementary DNA - cDNA*), концентрација РНК и оцена чистоће узорака мерени су за сваког пацијента, при чему је чистоћа узорака била у опсегу од 1,6 до 2. Укупна РНК претворена је у cDNA коришћењем кита за реверзну транскрипцију *NG dart Reverse Transcription Kit* у запремини од 20 µL по реакцији према упутствима произвођача. Реакциона смеша је

садржала мешавину *NG dART RT Mix*, 5 x *NG cDNA* пуфера, *Oligo(dT)* и *Random hexamers*. Термални циклус спроведен је на следећим температурама: 30-60 минута на 50 °C, затим 10 минута на 25 °C и коначно 5 минута на 85 °C. Након реакције, концентрација cDNA за сваки узорак измерена је коришћењем *Thermo Scientific™ μDrop™ and μDrop Duo Plates* (Thermo Fisher, САД). Аликвоти cDNA чувани су на -80 °C до извођења квантитативне ланчане реакције полимеразе.

3.4.3. Квантификација релативне експресије гена (qPCR)

PCR анализа обављена је коришћењем *Mic qPCR Cyclor* према MIQE смерницама (181). Реакција је изведена у запремини од 20 μL користећи реакциону смешу која садржи *GoTaq® qPCR Master Mix (2X)*, *Forward Primer*, *Reverse Primer* (200nM–1 μM) и воду без нуклеаза. Реакциона смеша садржала је компоненте приказане у табели (Табела 9). Негативна контрола (енг. *No Template Control*, NTC) садржала је све компоненте осим узорка. Услови амплификације су били следећи: почетни корак денатурације дволанчане ДНК на температури од 95 °C у трајању од 2 минута, након чега следи везивање специфичних олигонуклеотида - прајмера (енгл. *annealing*) и екстензија прајмера на температури од 60 °C у трајању од 60 секунди (енгл. *extension*). Након 40 циклуса, анализирана је крива топљења (енгл. *melting curve*) продукта PCR реакције.

Табела 9. Компоненте реакционе смеше кита

Компоненте	Концентрација	Запремина
GoTaq® qPCR Master Mix	2X	10 μL
Forward Primer	200nM–1μM	1 μL
Reverse Primer	200nM–1μM	1 μL
цДНК	200 ng	x μL *
вода		x μL **
Укупна запремина		20 μL

* На основу измерене концентрације изоловане ДНК одређује се запремина потребна за реакцију у датом опсегу

** На основу запремине израчунате ДНК, заједно са осталим компонентама реакције одређују запремину воде тако да коначни волумен реакције буде 20 μL.

За реакцију су коришћени следећи прајмери (Табела 10):

- За апоптозу: *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX*, *BCL2*, *FAS*
- За редокс статус: *HIF1A*, *NFE2L2*, *NFKB1*, *TXNRD1*, *GSTA1*
- За патогенезу: *MYH6*, *MYH7*, *MYH2*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TPM1*, *TNNT2*, *AVP*, *DBH*, *LBP*, *CTSS*.

Табела 10. Прајмери коришћени у qRT-PCR анализи

Назив прајмера	Скраћеница	Секвенца прајмера
<i>Caspase-8</i>	CASP8	F 5' GATAACGGAGGCTGGGATGC 3'
		R 5' GACTTCACTTGTGGCCCAAGAT 3'
<i>Caspase-9</i>	CASP9	F 5' TGGAAATAAACTGCACCCCGGA 3'
		R 5' TCCTTTCTCTTCACCCAAACA 3'
<i>Caspase-3</i>	CASP3	F 5' GCTTCAGGGTTTCATCCAGGA 3'

<i>Bcl-2 Associated X-protein</i>	BAX	R 5' CAATCATCCTCTGCAGCTCCA 3' F 5' GCTTCAGGGTTTCATCCAGGA 3'
<i>B-cell lymphoma 2</i>	BCL2	R 5' CAATCATCCTCTGCAGCTCCA 3' F 5' GATAACGGAGGCTGGGATGC 3'
<i>Fas receptor</i>	FAS	R 5' GACTTCACTTGTGGCCAGAT 3' F 5' TGGAAATAAACTGCACCCGGA 3'
<i>Hypoxia-inducible factor</i>	HIF1A	R 5' TCCTTTCTCTTCACCCAAACA 3' F 5' ACCCATTTTCTACTCAGGACACA 3'
<i>Nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>	NFE2L2	R 5' TGCTGGAATACTGTAACTGTGCT 3' F 5' TGACAATGAGGTTTCTTCGGCT 3'
<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit</i>	NFKB1	R 5' AATGTCCTGTTGCATACCGTCT 3' F 5' CACAAGGCAGCAAATAGACGAG 3'
<i>Thioredoxin Reductase</i>	TXNRD1	R 5' TGGGAAATTGTCAGCAGGCTAA 3' F 5' ATATGGCAAGAAGGTGATGGTCC 3'
<i>Glutathione S-Transferase</i>	GSTA1	R 5' GGGCTTGTCTTAACAAAGCTG 3' F 5' TCTTTTGCATAGAGACCATGACCAG 3'
<i>myosin heavy chain 6</i>	MYH6	R 5' CTCCCTACTCCAGTAACTCCCGACT 3' F 5' 3' AGCTCTGCATCAACTTCACCA
<i>myosin heavy chain 7</i>	MYH7	R 5' 3' GGAACATGCACTCCTCCTCC F 5' 3' TCTTCAAACCTCAAGAACGCCT
<i>myosin heavy chain 2</i>	MYH2	R 5' 3' AGCTGCTTTCGGACCTTCTC F 5' 3' GCCAGCATCGATGATCAGGA
<i>myosin light chain 2</i>	MYL2	R 5' 3' TTGCTCCTCACGCTGCTTTT F 5' 3' TTGGGCGAGTGAACGTGAAAA
<i>myosin binding protein C3</i>	MYBPC3	R 5' 3' CCGAACGTAATCAGCCTTCAG F 5' 3' CACACATCGATACTGGTGAAGG
<i>tropomyosin 1</i>	TPM1	R 5' 3' GCTCCGTGGTGGTAACAG F 5' 3' TCTAGACTCTCAACGATATGACTTCCA
<i>troponin T2, cardiac type</i>	TNNT2	R 5' 3' TCTAGATTTTTTTAGCTTACACAGTGTT F 5' 3' GCAGGAAGAAGCAGCTGTTG
<i>arginine vasopressin</i>	AVP	R 5' 3' CCTCCATTGGGCCATCTTCA F 5' 3' TGTGTGCACCAGGATGCCT
<i>dopamine beta-hydroxylase</i>	DBH	R 5' 3' TCAGCTCCAGGTCGGACAT F 5' 3' GTGCTACATTAAGGAGCTTCCAAAG
<i>lipopolysaccharide binding protein</i>	LBP	R 5' 3' GGCCTCATTGCCCTTGGT F 5' 3' AGGGCCTGAGTCTCAGCATCT
<i>cathepsin S</i>	CTSS	R 5' 3' CAGGCTGGCCGTGTTGAAGAC F 5' 3' TGACAACGGCTTTCCAGTACA
<i>Beta-actin</i>	ACTB	R 5' 3' GGCAGCACGATATTTTGAGTCAT F 5' GAGCGCGGCTACAGCTT 3'
	<i>(housekeeping)</i>	R 5' GCCCAATACGACCAAATCCG 3'

F – forward; R – reverse.

Анализа резултата је обављена софтвером *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR* и вредности прага циклуса (ΔC_t) су очитане и израчунате коришћењем формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$ за изражавање разлика између циљаних гена и гена *ACTB* („housekeeping“ ген) описаних у доступној литератури (182,183). Резултати су приказани као средње вредности дупликата сваког узорка, а нивои релативне експресије информационе РНК за сваки од узорака представљени су као однос експресије гена од интереса и „housekeeping“ гена, који је коришћен за нормализацију.

За израчунавање релативне генске експресије из узорака крви коришћена је следећа формула:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

ΔCt_1 – Ct вредност гена од интереса у узорку

ΔCt_2 = Ct вредност *ACTB*-а у узорку.

3.5. Детекција и анализа полиморфизма гена методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *RT-PCR*)

3.5.1. Изолација геномске ДНК

Геномска ДНК је изолована из узорака пуне крви уз коришћење *PureLink® Genomic* ДНК кита (*Invitrogen™*, Thermo Fisher Scientific). У стерилну микротубу додато је 200 μ L замрзнутог узорка крви који је претходно одмрзнут у воденом купатилу на 55 °C. Затим је додато 20 μ L протеиназе К и 20 μ L рибонуклеаза α , након чега је узорак вортексован и инкубиран на собној температури 2 минута. За хомогенизацију раствора, додато је 200 μ L *PureLink® Genomic Lysis* пуфера, а узорак је инкубиран на 55 °C током 10 минута. Након лизирања, у узорак је додато 200 μ L етанола, а затим је смеша пренета на спин колону. Колона је центрифугирана на 10,000 g (RCF) у трајању од једног минута на собној температури. Након тога, додато је 500 μ L пуфера за испирање 1, колекциона туба је замењена и додато је 500 μ L пуфера за испирање 2. После центрифугирања извршено је испирање ДНК (енгл. *Eluting DNA*). Након инкубације на собној температури и центрифугирања, геномска ДНК је сакупљена у микротубу.

3.5.2. Одређивање концентрације и чистоће геномске ДНК

Након изолације ДНК, узорци су нанети на плочу *Thermo Scientific™ μ Drop™ and μ Drop Duo Plates* како би се одредила концентрација и чистоћа. Вредности апсорбанце се читавају на таласним дужинама 230, 260, 280 и 320 nm. Процена чистоће ДНК врши се на основу количника апсорбанце на 260/280 и апсорбанце на 260/230. Вредности чистоће које су биле прихватљиве за даљу анализу јесу 1,65 и 1,85 (260/280) што је било и у складу са нашим узорцима. Након мерења узорци су залеђени на -80 °C и израчунато је за сваки узорак која разблажења се праве за наредни корак експеримента.

1.5.3. Утврђивање полиморфизама *MYBPC3* и *MYH7* гена

Генотипизација је извршена за SNP-ове који су одабрани на основу претходних асоцијативних студија, функционалних ефеката, учесталости алела и преваленције. За потврду присуства мутација, истражени су следећи SNP-ови: *rs3729986* и *rs3729823* (Табела 11).

Табела 11. Анализирани генетски полиморфизми

Тип есеја	
<i>rs3729986</i>	C/T, Transition Substitution
<i>rs3729823</i>	G/C, Transversion Substitution

Полиморфизми *МУВРС3* и *МУН7* су одабрани на основу њихове повезаности са HCM-ом. Претходне студије сугеришу да ови полиморфизми значајно утичу на структуру и функцију срчаног мишића, доприносећи предиспозицији за развој HCM-а (184,185). У овом истраживању, генотипизација ових SNP-а је изведена применом *TaqMan SNP Assay-a*, користећи *Mic qPCR Cyclер* апарат. Коришћени су комерцијално доступни есеји *TaqMan SNPs Genotyping Assay* (Applied Biosystems, Foster City, САД) у концентрацији 2x *Universal TaqMan MasterMix* (Applied Biosystems, Foster city, САД). Реакциона смеша је садржала следеће компоненте: 10 μ L *Master Mix-a*, 0.5 μ L *TaqMan genotyping assay mix* и зависно од концентрације изоловане ДНК додати су вода и узорак ДНК, а услови реакције су приказани у **Табели 12**.

Табела 12. Температурни и временски кораци PCR реакције

Кораци	Температура	Време	Циклуси
Иницијална денатурација	95 °C	10 минута	1
Амплификација	95 °C	15 секунди	40 циклуса
Екстензија	60 °C	1 минут	

TaqMan анализа у овој студији укључила је две флуоресцентно означене пробе, специфично дизајниране за детекцију специфичног SNP-а у геномској ДНК. Ове пробе садрже прајмере, који су комлементарни циљним секвенцама и разликују се у једној бази. Како би се детектовала ова разлика обележени су различитим флуорофорима. На 5' крају *TaqMan* пробе налази се репортер (*VIC* и *FAM*), док је на 3' крају постављен пригушивач (Q). Док је сонда везана за ДНК, пригушивач блокира емисију светлости репортера. Током PCR амплификације, Таq полимераза синтетише нови ДНК ланац. Она има активност 5'-3' екзонуклеазе, што значи да уклања сонду док копира циљну ДНК. Уклањањем сонде, репортер се ослобађа и почиње да емитује флуоресценцију. Уређај за PCR у реалном времену детектује флуоресценцију која је пропорционална количини амплификоване ДНК. Сигнал од једног репортера указује на хомозиготност, било да је реч о wild-type или мутираном алелу. Присуство сигнала од оба репортера указује на хетерозиготност (оба алела су присутна) (**Слика 6**) (186).

Genotypes			
Genotype +	NC_000014.9:g.23417200G	NC_000014.9:g. 23417200C	
Homozygous 1	☒	☐	×
Homozygous 2	☐	☒	×
Heterozygous	☒	☒	×

Слика 6. Хомозиготни и хетерозиготни генотипови

Реална PCR реакција мери промену интензитета флуоресценције у експоненцијалној фази амплификације, а *Ct* вредност указује на број циклуса потребних за достизање одређеног прага флуоресценције (*threshold*), који је обрнуто пропорционалан почетној концентрацији циљане ДНК (187).

3.6. Статистичка обрада података

Анализа експресије гена изведена је у дупликату и подаци су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. За утврђивање статистичке значајности коришћен је једносмерни ANOVA тест за вишеструка поређења уз накнадну анализу *Dunnett*-овим тестом, који је примењен за поређење сваке експерименталне групе са контролном групом. Разлика је сматрана статистички значајном ако је *p* вредност била мања од 0.05 ($p < 0.05$). Статистичка обрада резултата генске експресије изведена је коришћењем SPSS софтвера за Windows (вер. 17, 2008, SPSS Inc., Chicago, IL). Поред анализе експресије, израчунате су учесталости алела за генотипове GG, GC и CC у складу са Харди-Вајнберговом равнотежом, ради поређења са експериментално добијеним вредностима. За утврђивање статистичке значајности одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже коришћен је χ^2 (хи-квадрат) тест.

3.7. Употреба машинског учења

У оквиру ове студије, машинско учење је коришћено како би се испитала повезаност између различитих биолошких и генетских параметара код НСМ пацијената. Циљ је био идентификација најзначајнијих фактора који доприносе развоју болести и процени ризика код пацијената, као и да се обезбеди предиктивни модел за идентификацију високо ризичних пацијената. За боље означавање података коришћена су упутства медицинских професионалаца, која су обухватила девет критеријума ризика. Ако пацијент испуњава најмање четири од ових услова, сматра се високо ризичним. Ови услови укључују:

- претходну дијагнозу синкопе,
- класификацију срчане инсуфицијенције (NYHA) изнад 3,
- породичну историју изненадне срчане смрти за пацијенте млађе од 40 година,
- дебљину интервентрикуларног септума или задњег зида мању од 30 mm,
- пречник леве преткоморе већи од 40 mm,

- ејекциону фракцију мању од 50%,
- градијент притиска у излазном тракту леве коморе у стању мировања већи од 30 mmHg,
- вредност N-терминалног про-хормона BNP (NT-proBNP) већу од 900 pg/ml и
- постојање атријалне фибрилације у било ком облику (188).

У оквиру ове студије коришћен је интердисциплинарни приступ односно сарадња научника из различитих области као што су доктори медицине, молекуларни биолози и машински инжењери. Предикциони модел је базиран на клиничким и демографским подацима пацијената са HCM, тако да је ова студија комбинација клиничког и лабораторијског истраживања. На основу литературних података изабрали смо параметре који су најзначајнији у дијагностици и терапијском приступу ових пацијената и креиран је модел. За креирање базе података коришћени параметри укључују године, пол, NYHA класификацију, симптоме, ехокардиографске налазе, крвну слику и податке о генској експресији. Модел за предикцију ризика пацијената је развијен са посебним фокусом на високо ризичне пацијенте. У овој студији коришћене су две базе података. Прва се састојала од 43 пацијената са HCM, а друга база је обухватала 50 пацијената који су били подвргнути рутинским дијагностичким процедурама. Друга база података обухватила је анализу релевантних гена и њихове експресије. Ове анализе нису утицале на ток и исход лечења пацијената.

Поред тога, спроведена је корелациона анализа како би се испитала повезаност нивоа експресије гена, користећи библиотеке Python 3.8, Pandas (верзија 2.2) и NumPy (верзија 1.21) за рачунање линеарних и нелинеарних корелација. Значајност карактеристика процењена је коришћењем библиотеке *scikit-learn*, применом модела случајних шума (енгл. *Random Forest*) и *Extreme Gradient Boosted Trees*, омогућавајући идентификацију најзначајнијих гена који доприносе развоју болести. За несупервизовану анализу примењен је модел кластеровања *K-means* омогућавајући груписање узорака на основу профила експресије гена. Пре кластеровања је извршено уклањање екстрема и скалирање података како би сви гени били на истој скали, а те скале нису биле под утицајем малог броја екстремних случајева. Такође, спроведена је анализа главних компоненти (енгл. *Principal component analysis*, PCA) ради смањења димензионалности података, како би се резултати могли приказати у дводимензионалном простору и визуелизовати на начин погодан за анализу.

За визуелизацију резултата анализе експресије гена коришћене су библиотеке за визуелизацију података, *matplotlib* и *seaborn*. Python скрипта је генерисала кластеризовану топлотну мапу уз коришћење хијерархијског кластеровања. Подаци су били представљени у облику табеле у којој редови представљају гене, а колоне узорке, док је интензитет боје визуелизовао нивое експресије гена у опсегу ($v_{min} = 0$, $v_{max} = 3$). Ова визуелизација је омогућила идентификацију образаца експресије гена у односу на различите категорије пацијената.

4.РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

4.1. Клиничке карактеристике популације

У студију је укупно било укључено 93 пацијената са дијагнозом НСМ-а. Њихови основни клинички параметри добијени током првог и другог (контролног) прегледа приказани су у **Табели 13**. У популацији од 93 пацијента, 58 (62,4%) су били мушкарци, а 35 (37,6%) жене. Просечна старост пацијената износила је 56,7 година, са распоном од 26 до 80 година. Генетска анализа спроведена је коришћењем узорака крви који су од пацијената узети на првом прегледу, док су клинички параметри евидентирани на првом, а затим и на другом прегледу како би се пратила њихова промена током времена.

Табеларни приказ клиничких параметара приказује да је просечна дебљина интервентрикуларног септума била $18,5 \pm 3,5$ mm на првом прегледу, а $18,9 \pm 3,6$ mm на другом прегледу, док је дебљина задњег зида (енгл. *Posterior wall thickness*) у просеку износила $12,7 \pm 3,8$ mm на првом прегледу, а $12,4 \pm 3$ mm на другом прегледу. Пречник леве преткоморе (енгл. *Left atrium diameter*) остао је релативно стабилан између два прегледа и његове вредности износили су $42,2 \pm 5,1$ mm на првом прегледу, а $42,6 \pm 5,1$ mm на другом прегледу. Ејекциона фракција, иако благо смањена, није показала значајну варијацију између два прегледа, на првом прегледу просечно је износила $65 \pm 7,6\%$, а на другом прегледу $64,8 \pm 6,8\%$. Значајно је да су нивои NT-проBNP снижени између два прегледа, при првом прегледу био је 2240 ± 1398 pg/mL, а при контролном прегледу 1702 ± 1329 pg/mL. Концентрације тропонина такође су биле снижене између два прегледа, са просечном вредношћу $30 \pm 66,8$ ng/L при првом прегледу, а $33,5 \pm 90,8$ ng/L на другом прегледу. Инциденција атријалне фибрилације благо је повећана између прегледа, при првом прегледу пристуна је била код 10 пацијената, а на другом прегледу код 12 пацијената. Синкопа је била присутна код 8 пацијената на првом прегледу, док је на другом прегледу забележена код 2 пацијента.

NYHA класификација показала је сличну расподелу између прегледа, при чему је већина пацијената била сврстана у NYHA класу I или II. Максимални притисак у левом вентрикуларном излазном тракту (LVOT maxPG) показао је благи пораст између прегледа и то $15,6 \pm 23,3$ mmHg на првом прегледу, а $16,6 \pm 22,6$ mmHg на другом прегледу.

Табела 13. Клинички параметри пацијената на првом и другом прегледу

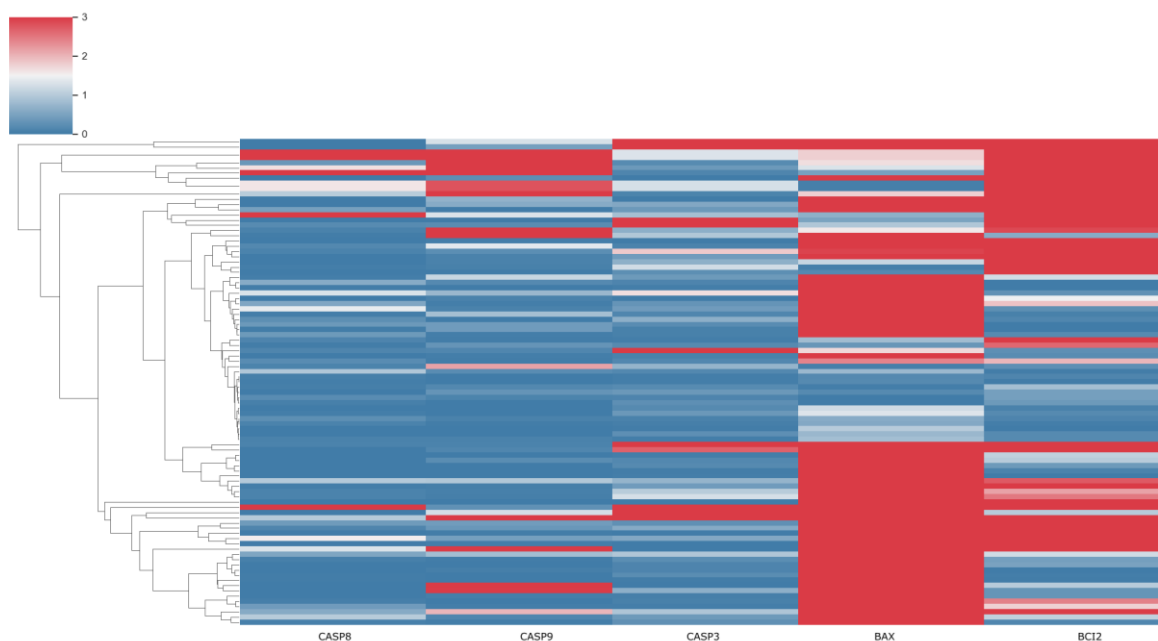
Клинички параметри	Први преглед	Други преглед
Синкопа (присутна/одсутна)	8/85	2/91
NYHA класа (I/II/III)	49/38/6	50/40/3
Дебљина интервентрикуларног септума	18.5 ± 3.5	18.9 ± 3.6
Дебљина задњег зида	12.7 ± 3.8	12.4 ± 3
Пречник леве преткоморе	42.2 ± 5.1	42.6 ± 5.1
Ејекциона фракција	65 ± 7.6	64.8 ± 6.8

LVOT maxPG	15.6±23.3	16.6±22.6
NT-BNP	2240±1398	1702±1329
Тропонин	33.5±90.8	30±66.8
Атријална фибрилација (присутна/одсут на)	10/83	12/81
LVIDs	29.1±5.9	28.7±5.7
LVIDd	46.9±5.5	47.3±5.3

NYHA класа - њујоршка кардиолошка асоцијација, класификација функционалног статуса пацијената са срчаном слабошћу; LVOT maxPG - максимални притисак у левом вентрикуларном изливном тракту; NT-BNP - N-терминални про-B тип натриуретичког пептида, биомаркер који указује на стрес и оптерећење срца; LVIDs - унутрашњи пречник леве коморе у крајњој систоли; LVIDd - унутрашњи пречник леве коморе у крајњој дијастоли

4.2. Анализа експресије гена

Резултати анализе експресије гена укључених у процес апоптозе (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX* и *BCL2*) из узорака пуне крви пацијената добијени помоћу PCR методе унети су у програм Python (*matplotlib*, *seaborn*), који је визуелизовао податке у облику приложене топлотне мапе (Слика 7).



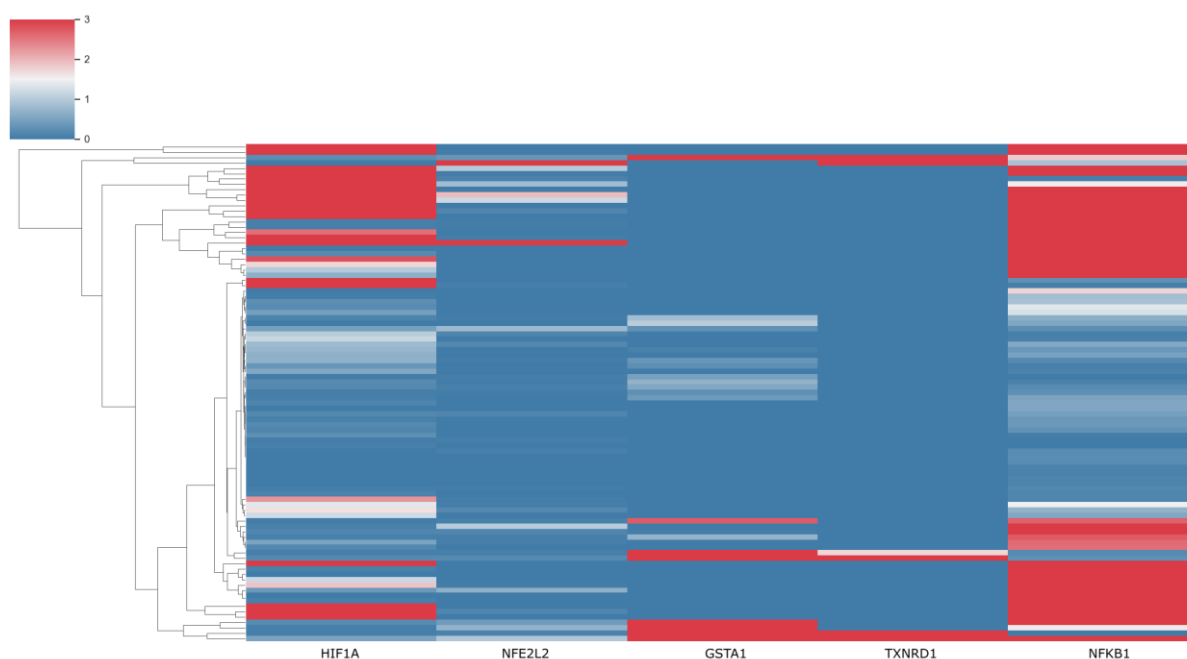
Слика 7. Топлотна мапа која приказује експресију одабраних гена у узорцима пацијената. Интензитет боје представља ниво експресије гена: светло црвена боја означава високу експресију, бела боја означава просечну експресију, а светло плава боја означава ниску експресију. Редови представљају појединачне узорке, док колоне представљају специфичне гене (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX* и *BCL2*).

На основу топлотне мапе и резултата PCR-а, код већине узорка за ген *CASP8* преовлађује плава боја, што указује на нижи ниво експресије у односу на контролу при извођењу PCR методе. Конкретно, 79/93 узорка показало је смањену експресију гена *CASP8*. Слично томе, 72/93 узорка показало је смањену експресију гена *CASP9*,

док је 74/93 узорака демонстрирало нижу експресију гена *CASP3*, што указује на конзистентно смањење експресије ових апоптотских гена у целој групи пацијената.

Ген *BAX* показао је повећану експресију код већине узорака (71/93), док је *BCL2* показао повећану експресију код скоро половине узорака (55/93), као што је приказано на топлотној мапи. Код 10/93 узорака однос *BAX/BCL2* био је релативно низак, што може указивати на доминантну анти-апоптотску активност (тј. више *BCL2* него *BAX*), док је код 27/93 узорака однос *BAX/BCL2* висок (тј. више *BAX* него *BCL2*). Добијени резултати ће бити даље анализирани у одељку Дискусија.

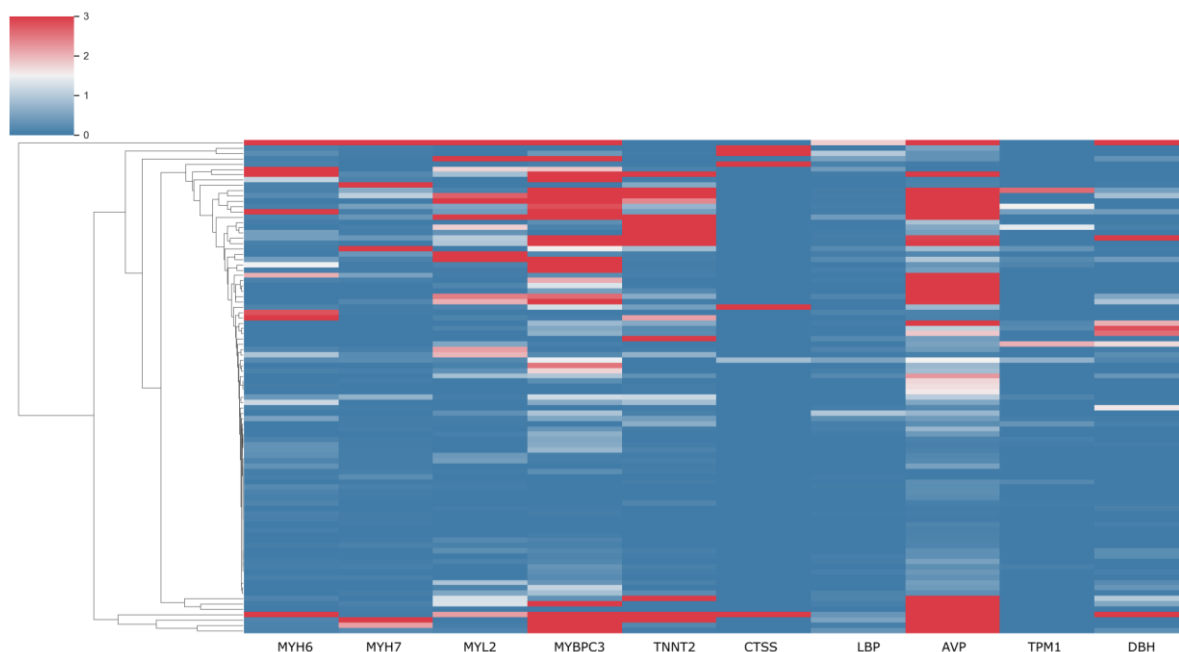
Резултати анализе експресије гена укључених у процес оксидативног стреса (*HIF1A*, *NFE2L2*, *GSTA1*, *TXNRD1* и *NFKB1*) из узорака пуне крви пацијената добијени помоћу PCR методе такође су унети програм Python (*matplotlib*, *seaborn*), који је ове резултате визуелизовао у облику приложене топлотне мапе (Слика 8).



Слика 8. Топлотна мапа која приказује експресију одабраних гена у узорцима пацијената. Интензитет боје представља ниво експресије гена: светло црвена боја означава високу експресију, бела боја означава просечну експресију, а светло плава боја означава ниску експресију. Редови представљају појединачне пацијенте, док колоне представљају специфичне гене (*HIF1A*, *NFE2L2*, *GSTA1*, *TXNRD1*, и *NFKB1*)

На основу PCR анализе приказане на топлотној мапи можемо закључити да је већина узорака обојена плавом бојом, што указује на нижи ниво експресије у односу на референтне услове. Конкретно резултати наших истраживања показују да је ниво експресије *HIF1A* снижена код 62/93 узорака, док је експресије *NFE2L2* снижена код 88/93 узорака. Експресија гена *GSTA1* изостаје код 72/93 узорака, а код 87/93 узорака изостаје експресија *TXNRD1* гена. Такође, експресија гена *NFKB1* је смањена код 46/93 узорака.

Резултати анализе експресије гена који кодирају саркомерне протеине кардиомиоцита (*MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TNNT2* и *TPM1*) и других гена повезаних са физиологијом срчаног мишића (*CTSS*, *LBP*, *AVP* и *DBH*) из узорак пуне крви пацијената такође добијени помоћу PCR методе визуелизовани су помоћу топлотне мапе (Слика 9).

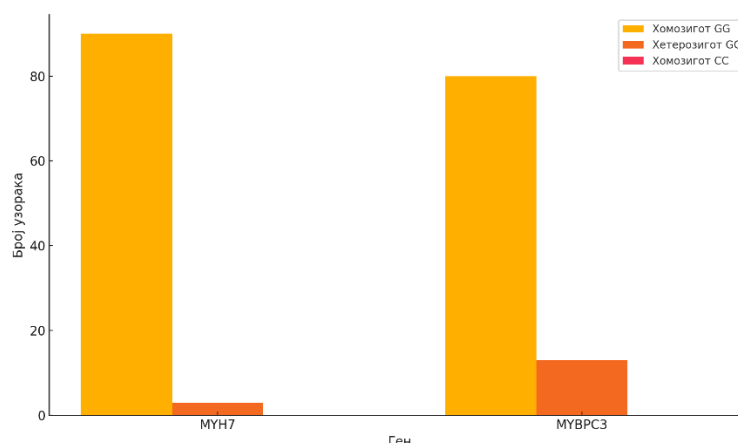


Слика 9. Топлотна мапа која приказује експресију одабраних гена у узорцима пацијената. Интензитет боје представља ниво експресије гена: светло црвена боја означава високу експресију, бела боја означава просечну експресију, а светло плава боја означава ниску експресију. Редови представљају појединачне пацијенте, док колоне представљају специфичне гене (*MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *CTSS*, *LBP*, *AVP*, *TPM1* и *DBH*).

На основу PCR анализе, приказане на топлотној мапи, можемо закључити да је експресија већине гена који кодирају саркомерне протеине кардиомиоцита у анализираним узорцима пацијената снижена у односу на референтне услове. Превладавајућа плава боја на топлотној мапи указује на општи тренд смањене експресије. Анализом резултата појединачних гена запажамо да је експресија гена *MYH6* снижена код 82/93 узорака. Слично томе, ген *MYH7* показује снижену експресију код 87/93 узорака. Што се тиче других гена, забележена је снижена експресија *MYL2* код 82/93 узорака и *LBP* код 92/93 узорака. Ген *MYBPC3* показује нижи ниво експресије код 61/93 узорака, док је експресија *TNNT2* снижена код 77/93 узорака. Код 87/93 узорака изостаје експресија гена *CTSS*. Експресија гена *DBH* снижена је код 43/93 узорака, док код 42/93 узорака у потпуности изостаје. Најзад, експресија гена *AVP* снижена је код 61/93 узорака, а експресија гена *TPM1* снижена је код 72/93 узорака.

4.3. Анализа полиморфизма rs3729823 и rs3729986

ДНК је изолована из узорака периферне крви пацијената применом стандардних метода за екстракцију геномске ДНК. Након изолације, полиморфизми rs3729823 и rs3729986 идентификовани су применом PCR реакције и одговарајућих SNP есеја, који су омогућили прецизну детекцију генотипова за гене *МУН7* и *МУВРС3*. Генотипови **rs3729823** и **rs3729986** могу бити хомозиготни референтни (GG), хетерозиготни (GC) или хомозиготни (CC). Пацијенти са генотипом GG имају два идентична референтна алела, а овај генотип се сматра референтним. У нашем истраживању утврђено је да 90 пацијената има GG генотип за ген *МУН7*, док је 80 пацијената имало исти генотип за ген *МУВРС3*. Пацијенти са генотипом GC имају један референтни и један алтернативни алел, што указује на присуство варијанте без потпуне хомозиготности. У нашем истраживању утврђено је да је код три пацијената присутан GC генотип за ген *МУН7* и код 13 пацијената присутан је GC генотип за ген *МУВРС3*. Пацијенти са генотипом CC указују на пуну експресију алтернативне варијанте C, али у нашем истраживању анализирани пацијенти нису испољили овај генотип.



Слика 10. Дистрибуција генотипова за гене *МУН7* и *МУВРС3*

Учесталост полиморфизма *МУН7* и *МУВРС3*

У нашем истраживању анализиране су учесталости генотипова за SNP варијанте које се налазе у генима *МУН7* и *МУВРС3*. Резултат ове статистичке анализе показао је да су дистрибуције генотипова за оба гена у складу са Харди-Вајнберговом равнотежом. (rs3729823: $\chi^2(1) = 0.025$, $p = 0.988$; rs3729986: $\chi^2(1) = 0.525$, $p = 0.769$) (Табела 14). Ген *МУН7* има ниску χ^2 вредност од 0.025 и високу p -вредност од 0.988, што значи да нема статистички значајног одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже. Слично, за ген *МУВРС3*, ниска χ^2 вредност од 0.525 и висока p -вредност од 0.769 показују да не постоји статистички значајно одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже.

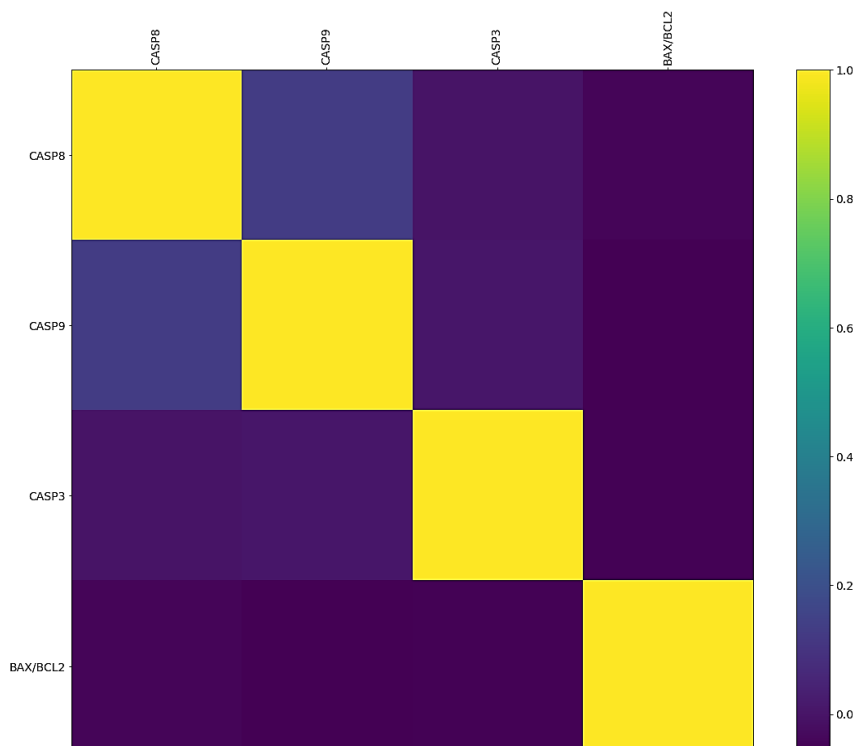
Табела 14. Учесталост генотипова и алела за гене *MYH7* и *MYBPC3*

Ген	GG	GC	CC	Учест. алела G	Учест. алела C	Хи- квадрат	Р вредност
<i>MYH7</i>	90	3	0	0.984	0.016	0.025	0.988
<i>MYBPC3</i>	80	13	0	0.93	0.07	0.525	0.769

Учесталост носилаца хомозиготних варијанти за испитиване полиморфизме износила је између 0% и 10%. Алелске фреквенције у нашем узорку, показале су да је за ген *MYH7* учесталост алела G износила 0.984 док је учесталост алела C била 0.016. За ген *MYBPC3* учесталост алела G износила је 0.93, је учесталост алела C 0.07.

4.4. Корелација између гена

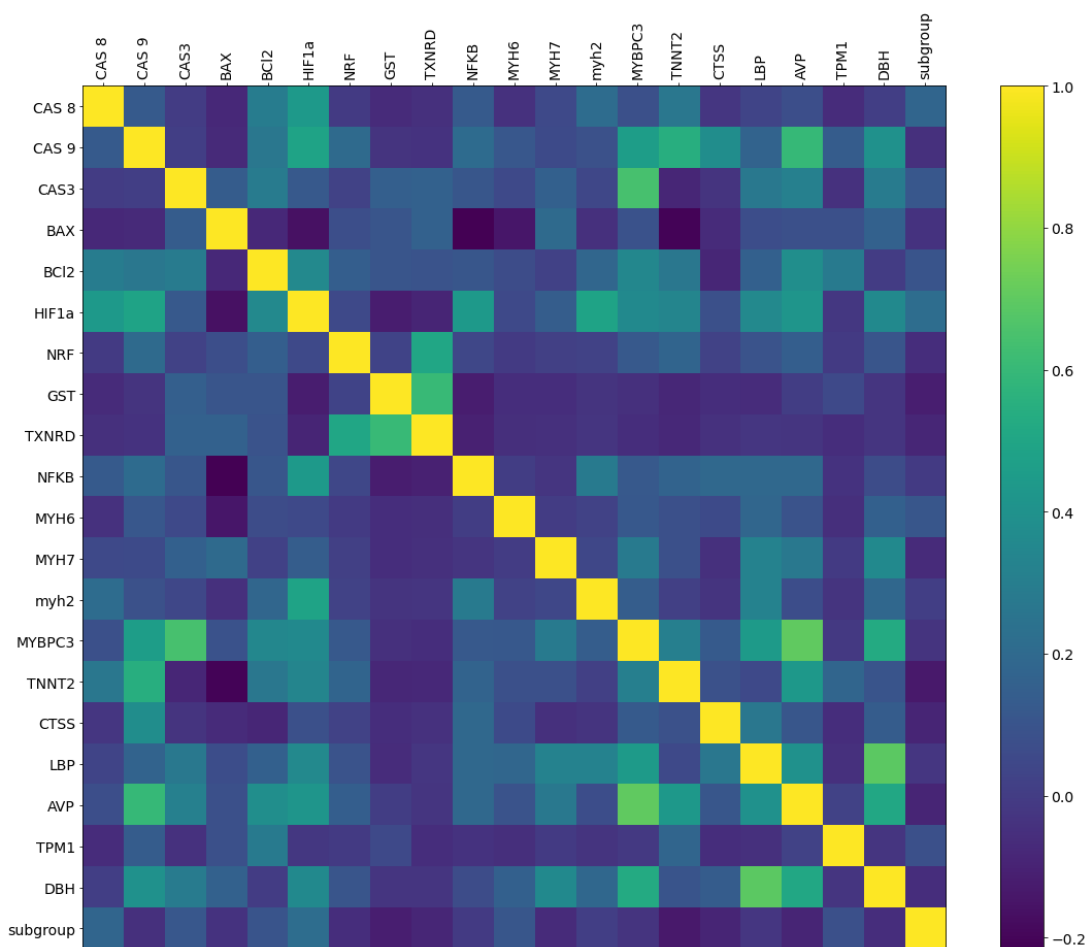
У нашем истраживању коришћени су софтверски алати и програмски језик Python за израчунавање линеарних и нелинеарних корелација између експресије гена у циљу идентификације пацијената који су најризичнији на основу резултата генске експресије и SNP анализа. Прва анализа била је усмерена на испитивање корелације између гена укључених у процес апоптозе, с циљем утврђивања потенцијалних повезаности које би могле указати на специфичне обрасце експресије. У оквиру ове анализе, испитивана је корелација између односа *BAX/BCL2* и експресије гена *CASP8*, *CASP9* и *CASP3* (Слика 11).



Слика 11. Корелација између *BAX/BCL2* односа и *CASP*s гена

Анализа повезаности између *BAX/BCL2* односа и експресије гена *CASP8*, *CASP9* и *CASP3* показала је веома слабу и негативну корелацију. Прецизније, корелација између *BAX/BCL2* односа и експресије гена *CASP8* износила је -0.041 . Затим, корелација између *BAX/BCL2* и *CASP9* износила је -0.057 , док је корелација између *BAX/BCL2* и *CASP3* износила -0.049 .

Додатна анализа је обухватила испитивање корелације између свих анализираних гена, с циљем испитивања свих добијених резултата PCR методе како би се идентификовали могући обрасци у експресији у узорцима пацијената оболелих од HCM. (Слика 12).



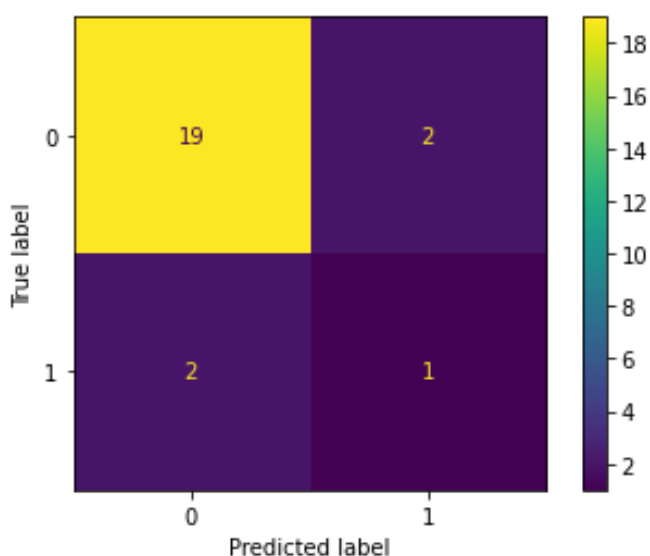
Слика 12. Корелација између гена и подгрупа

Топлотна мапа приказује подгрупе пацијената дефинисане на основу полиморфизма гена *MYH7* и *MYBPC3*. Ови резултати показују да ове подгрупе не показују значајну корелацију са експресијом осталих гена.

4.5. Класификација пацијената коришћењем Random forest алгоритма

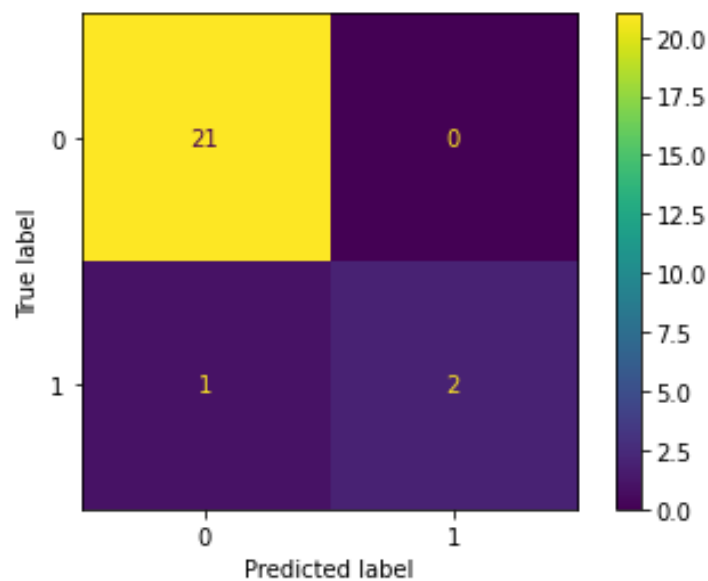
У овом истраживању, алгоритам Random Forest примењен је за класификацију пацијената на основу клиничких и генетских података, са циљем процене ризика од развоја болести. У оквиру класификације, дефинисане су две класе: класа 0 обухвата пацијенте са ниским ризиком (*low risk*), док класа 1 обухвата пацијенте са високим ризиком (*high risk*).

Током експеримента, коришћени су *true labels* (стварна дистрибуција ризика) и *predicted labels* (предикције модела након обраде улазних података). **Слика 13.** приказује резултате класификације засноване на генетским факторима.



Слика 13. Класификација пацијената на основу генетских података

Када се у класификацију укључе и генетски и клинички подаци резултат је бољи перформанс модела у поређењу са класификацијом која је користила само генетске податаке (**Слика 14**). Овај резултат сугерише да су клинички подаци значајнији за прецизну процену ризика и да је потребно комбиновање више извора информација у будућим студијама како би се повећала тачност модела.



Слика 14. Класификација пацијената на основу генетских и клиничких података

Када су генетски подаци комбиновани са клиничким подацима, почетни резултати модела нису били задовољавајући. Међутим, након груписања вредности експресије гена и поновног тестирања, тачност је достигла 92%, што представља значајно побољшање у класификацији пацијената. Ови резултати потврђују да је оптимизација података о експресији гена кључна за побољшање тачности модела и указују на потребу за додатном обрадом података у будућим истраживањима (**Табела 15**).

Табела 15. Груписане вредности експресије гена 93 узорака пацијената са HCM

	Повишена експресија (1)	Снижена експресија (2)	Нема експресије (3)
Гени укључени у процес апоптозе			
Casp8	14	79	0
Casp9	21	72	0
Casp3	19	74	0
BAX	71	22	0
Bcl2	55	38	0
Гени укључени у редокс статус			
HIF1a	31	62	0
NRF	5	88	0
GST	9	12	72
TXNRD	6	0	87
Гени укључени у патогенези			
NFKB	47	46	0
MYH6	11	82	0
MYH7	6	87	0
MYH2	17	74	2
MYBPC3	32	61	0
TNNT2	16	77	0
CTSS	5	1	87
AVP	32	61	0
TPM1	4	17	72
DBH	8	43	42

4.6. Значај анализираних гена (Feature importance)

У овој студији испитан је значај експресије гена 93 узорака пацијената са HCM (*Feature importance*). Анализа је извршена коришћењем метода из библиотеке *scikit-learn*, примењених на моделе *Random Forest*. Ова анализа омогућила је идентификацију гена који највише доприносе уоченим разликама у узорку пацијената. Резултати су показали да гени имају већи значај када су анализирани у комбинацији са клиничким подацима.

Алгоритми као што је *Random Forest*, који се заснивају на бинарним стаблима, функционишу тако што раздвајају податке на основу различитих параметара. На сваком чвору стабла бира се променљива која најбоље раздваја пацијенте у две класе, при чему параметри коришћени у ранијим гранањима добијају већи значај, јер доприносе ефикаснијем раздвајању.

Анализа значаја гена указала је да је највећу важност у поређењу са осталим генима показао *BCL2* (12.0). Анализе значаја гена *CASP8* и *CASP3* су показали идентичан значај (7.0), док је *CASP9* показао нешто нижи значај (6.0). Најнижу вредност значаја имао је *BAX* ген (5.0). Ова расподела значаја гена указује на њихову релативну улогу у процесу апоптозе код узорака пацијената са HCM-ом, што би могло бити од значаја за даља истраживања потенцијалних предиктивних биомаркера (Табела 16).

Табела 16. Резултат значаја анализираних гена методом *Feature importance*

Гени	Feature importance
BCL2	12.0
MYH7	10.0
HIF1A	8.0
CASP8	7.0

Значај сваког параметра се израчунава као учесталост његовог појављивања у раним деловима стабла, где је раздвајање података најоптималније. Дакле, што је параметар чешће коришћен при раним гранањима (када се подаци пацијената најбоље раздвајају), то је његов значај већи. Поред гена, анализирани су и клинички параметри који су такође показали значај у процени ризика (**Табела 17**).

Табела 17. Значај клиничких параметара методом *Feature importance*

Параметри	Feature importance
NT-BNP	9.4
MR	6.0
LVOT maxPG	5.9
LAV index	3.8
LVIDd	3.8
PLWd	3.3
Systolic anterior motion	3.2
ESVLV	3.2
E/E'	2.9
EFLV	2.7
LA	2.6
LAV	2.6
TAPSE	2.2
Atrial fibrillation	2.1
BMI	1.7
Peak VO2	1.7
Weight	1.6
COPD	1.6
Sokolow index	1.6
Age	1.5

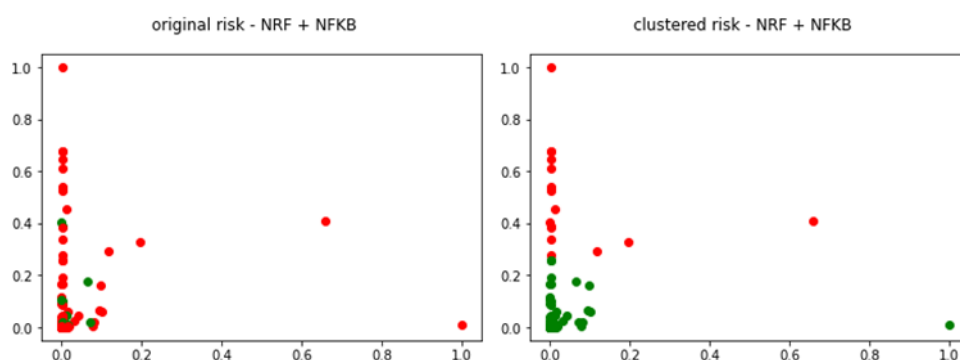
У овом истраживању, када су коришћени клинички подаци пацијената, метод је пролазио кроз све улазне параметре и бирао оне који најбоље раздвајају пацијенте на основу ризика. Међу клиничким параметрима, NT-BNP, маркер функције срца, имао је највећи значај са вредношћу од 9.4, што указује на његову важност у процени ризика од болести.

4.7. Профил ризика код пацијената са HCM-ом кроз анализу кластеровања

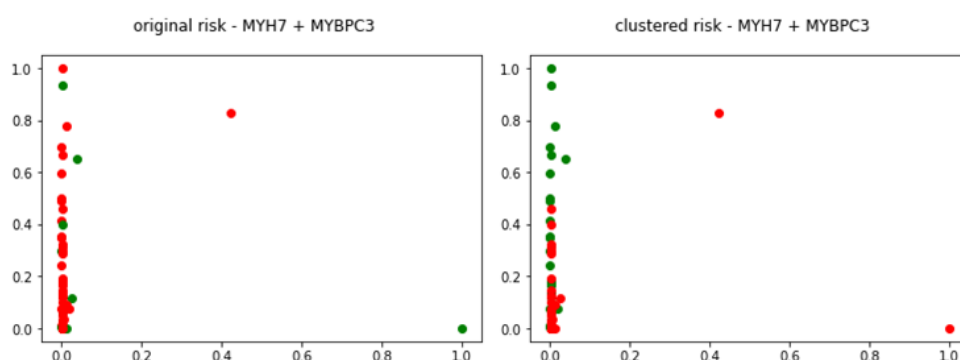
У циљу бољег разумевања утицаја експресије гена на клиничке исходе код пацијената са HCM-ом, спроведена је ненадгледана анализа кластеровања

коришћењем модела *k-means*. Овај приступ омогућио је испитивање образаца у подацима без ослањања на претходно знање или постојеће класификације ризика. Поређење између стварних класа ризика и резултата несупервизованог кластеровања, заснованог на експресији апоптотских гена, показало је одређену сличност у идентификацији пацијената са високим ризиком. Модел *k-means* је успео да групише 63,1% пацијената са високим ризиком у исти кластер, користећи само експресију апоптотских гена (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX* и *BCL2*).

Када је иста анализа спроведена на генима повезаним са оксидативним стресом (*NFE2L2* и *NFKB1*) (Слика 15) и патогенезом HCM (*MYH7* и *MYBPC3*) (Слика 16), коначни кластери нису показали довољну хомогеност у погледу повезаности са класама ризика. Овај недостатак хомогености ограничава њихову корисност за предвиђање ризика у овој популацији



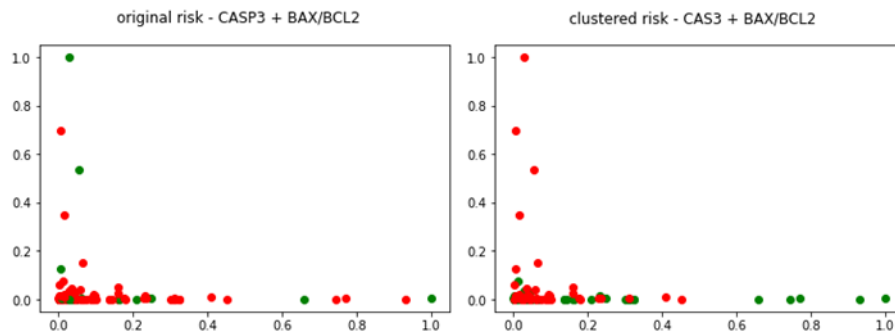
Слика 15. Поређење оригиналног и кластерованог ризика заснованог на експресији *NFE2L2* и *NFKB* гена



Слика 16. Поређење оригиналног и кластерованог ризика заснованог на експресији *MYH7* и *MYBPC3* гена

Најбољи резултат је постигнут анализом комбинације *CASP3* и односа *BAX/BCL2*, која је показала јасну разлику између пацијената са различитим нивоима ризика. На **Слици 17**, приметна је раздвојеност између пацијената са ниским ризиком (у доњем левом делу графика) и пацијената са високим ризиком (у горњем делу графика). Овај образац је у складу са оригиналном сликом ризика за исту

комбинацију гена, што потврђује значај односа *CASP3* и *BAX/BCL2* у разликовању ризичних група.



Слика 17. Поређење оригиналног и кластерованог ризика заснованог на експресији *CASP3* и *BAX/BCL2* гена

Резултати за остале комбинације гена показују сличне обрасце као кластеризовани графици, али не пружају јасну сепарацију као комбинација *CASP3* и односа *BAX/BCL2*. Ова комбинација се издваја као најзначајнија, пружајући јасну разлику између група пацијената са различитим нивоима ризика. Њихова улога у апоптози потенцијално има важне импликације за процену ризика и доношење клиничких одлука.

Иако гени као што су *MYH7* и *MYBPC3*, који су повезани са срчаним обољењима, не показују значајну корелацију са ризиком на основу кластер анализе, они и даље могу бити од клиничке важности и захтевају даља истраживања.

5. ДИСКУСИЈА

ДИСКУСИЈА

5.1. Клиничке карактеристике пацијената

Резултати наших истраживања засновани су на клиничким подацима добијеним са Института за кардиоваскуларне болести Војводине у Сремској Каменици и Клинике за васкуларну хирургију и Клинике за кардиохирургију Универзитетског клиничког центра Србије. Анализом добијених података утврђено је да већину пацијената са HCM-ом чине мушкарци (62,4%) у односу на жене. Ово сугерише да је присуство HCM-а чешће код мушке популације, што је и у складу са претходним студијама које су показале већу учесталост болести код особа мушког пола (189–191). Према литератури, заштитни ефекат полних хормона код жена може допринети каснијем настанку симптома, који се чешће јављају након менопаузе (192).

Иако се HCM углавном сматра болешћу младих, према литературним подацима јавља се и код старијих пацијената у познијим годинама живота, али се често не препозна на време услед занемаривања симптома (193,194). У нашој студији, просечна старост пацијената била је 56,7 година, што указује да се симптоми HCM-а најчешће јављају у овом животном добу, како сугеришу и друга истраживања (82). У овој студији укључени су пацијенти шире старосне групе с обзиром да најмлађи пацијент има 26 година, а најстарији 80 година. Овакав приступ истраживању омогућио је да анализирамо и разлике у клиничким карактеристикама између млађих и старијих пацијената, што пружа увиде о прогресији болести у различитим животним добрима (195).

На почетку истраживања утврђени су основни клинички параметри који су се показали као релевантни и кључни за дијагнозу и праћење пацијената. Ови параметри су детаљно анализирани како би се проценио ризик и класификовали пацијенти према степену болести. Утврђено је да дебљина интервентрикуларног септума благо расте између два прегледа, али без статистички значајних промена, што може бити последица релативно кратког периода између прегледа. Слично је наведено и у истраживању које су спровели *Louie* и сар. где је клиничко стање већине пацијената остало непромењено и након годину дана од првог прегледа (196).

Резултати нашег истраживања показују да дебљина задњег зида леве коморе (енгл. *posterior wall thickness*) се није значајно разликовала између два прегледа, што указује на могућност спорије прогресије хипертрофије у овом делу миокарда. У једном истраживању утврђено је да пацијенти са дебљином зида већом од 13 mm имају лошију прогнозу. Ово сугерише да дебљина задњег зида представља важан фактор ризика за дугорочни исход пацијената са опструктивном HCM (197). С обзиром да су вредности дебљине зида у нашем истраживању ниже, ово указује да већина анализираних пацијената нема повећан ризик од прогресије болести.

Пречник леве преткоморе није се значајније мењао између два прегледа, што указује на одсуство прогресије дијастолне дисфункције. Ово је у складу са резултатима студије *Bouzas-Mosquera* и сар., која је показала да је увећање леве преткоморе повезано са лошијом прогнозом, укључујући већи ризик од морталитета и исхемијског možданог удара (198). У нашем истраживању, вредности пречника леве преткоморе сугеришу повољнији дугорочни исход и бољу прогнозу анализираних пацијената.

Резултати нашег истраживања добијени мерењем процента крви коју срце избаци у току контракције (ејекционе фракције), указују да већина пацијената има смањену ејекциону фракцију, али вредности нису значајније варирале између два прегледа. У складу са резултатом претходне студије ово сугерише на присуство срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом фракцијом (енгл. *Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*). Резултати исте студије сугеришу да стабилна ејекциона фракција може бити повезана са мање прогресивним облицима срчане инсуфицијенције. У овим случајевима, терапија се углавном фокусира на контролу симптома и коморбидитета, чиме се спречава погоршање стања и смањује ризик од SCD-a, а самим тим и оптерећење на здравствени систем (199).

Нивои NT-proBNP су у овој студији били снижени на другом прегледу, што може указивати на смањен ризик од погоршања клиничког стања пацијената. Натриуретски пептиди попут NT-proBNP имају протективну улогу у кардиоваскуларном систему и помажу у регулацији крвног притиска. Они су важни биомаркери који показују ниво оптерећења срца запремином крви и силом потребном за савладавање отпора у крвним судовима. Према литератури, повишени нивои NT-proBNP, повезани су са већим ризиком од срчане инсуфицијенције, кардиоваскуларних догађаја и смрти. Такође, резултати сугеришу да су NT-proBNP вредности у директној корелацији са тежином и прогресијом болести срчаних залистака (200,201).

Смањење нивоа NT-proBNP између два прегледа уочено током нашег истраживања сугерише позитиван ефекат примењене терапије (диуретици, АЦЕ инхибитори, блокатори ангиотензинских рецептора и бета-блокатори). Примена ових лекова довела је до побољшања срчане функције и смањења хемодинамичког оптерећења. Ови резултати сугеришу да терапија делује на акутне симптоме и има дугорочни ефекат на целокупно стање пацијената.

Такође, уочено је смањење концентрације тропонина између два прегледа, што је било у складу са сниженим нивоима NT-proBNP у истој групи пацијената. Ово сугерише смањено оптерећење срца и бољу прогнозу. Иако смањење тропонина није статистички значајно због велике варијабилности вредности, оно може указивати на мањи степен оштећења миокарда код одређеног броја пацијената.

Тропонин, као биомаркер оштећења миокарда, има значајну дијагностичку вредност, с обзиром да његове повишене концентрације у крви могу указивати на повећан ризик од кардиоваскуларних компликација. Истраживање које је спровео *Hamada* и сар. са пацијентима оболелих од HCM-а на дужи временски период, показало је да је повећан ниво тропонина Т примећен само код три пацијента, што указује да овај биомаркер не мора бити повишен у раним фазама болести (202).

Насупрот томе, друге студије су утврдиле да повишени нивои тропонина Т представљају факторе који самостално утичу на вероватноћу настанка кардиоваскуларних компликација код пацијената са HCM-ом. Истраживање које су спровели *Hladij* и сар., показало је корелацију између повишених нивоа високо осетљивог тропонина Т и ехокардиографских параметара као што су максимална дебљина леве коморе и пречник леве преткоморе. Ови параметри су познати као значајни фактори ризика за SCD, што тропонин чини вредним параметром за процену прогнозе код пацијената са HCM-ом (203).

Наши резултати указују на одсуство већег оштећења миокарда током времена. Вредности тропонина се често повећавају у условима миокардног стреса, што указује да је код одређеног броја анализираних пацијената ниво овог биомаркера значајно виши од просека, што може бити повезано са лошијом прогнозом. Такође, велика варијабилност вредности тропонина међу пацијентима указује да овај биомаркер може бити користан за идентификацију оних пацијената који су под већим ризиком од погоршања болести.

У нашој студији, већина пацијената била је сврстана у NYHA класу I или II, што указује на релативно стабилно функционално стање и благе симптоме. Повећање LVOT maxPG између два прегледа указује на благе хемодинамичке промене, не носе значајан ризик од компликација. Ови налази су у складу са прогностичким смерницама за HCM, које наводе да је тежа клиничка слика (NYHA класа III или IV) у комбинацији са повшеним LVOT maxPG често повезана са већим ризиком од компликација (77).

Стабилност ових параметара одражава општи клинички ток болести. На основу анализе клиничких параметара, већина пацијената у овој студији припада стабилној прогностичкој групи, за коју се препоручује стандардни мониторинг и редовне анализе. Такође, смањење нивоа тропонина и NT-proBNP, сугеришу да не постоје значајне промене у миокарду, што смањује вероватноћу да пацијенти спадају у високо ризичне. Стабилни клинички параметри, попут NYHA класификације, LVOT maxPG, тропонина и NT-proBNP, указују на повољну прогнозу већине пацијената у овој студији, што је и у складу са савременим смерницама за управљање HCM-ом.

5.2. *Анализа експресије гена*

Сви клинички подаци коришћени у овом истраживању су од изузетне важности за праћење тока болести, планирање терапије и пружање прецизних информација о тренутном стању пацијента. Међутим, за дубље разумевање природе и механизма болести, неопходна је интегрисати ове податаке са генетским факторима који играју кључну улогу у њеном настанку и прогресији. Истраживање је обухватило експресију двадесет гена (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX*, *BCL2*, *HIF1A*, *NFE2L2*, *GSTA1*, *TXNRD1*, *NFKB1*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *CTSS*, *LBP*, *AVP*, *TPM1* и *DBH*), који учествују у различитим механизмима и биолошким путевима. У циљу боље анализе резултата, гени су подељени у три групе: гени укључени у процес апоптозе, гени укључени у процес редокс равнотеже и гени укључени у структуру кардиомиоцита.

Апоптоза у кардиомиоцитима покреће се различитим факторима стреса, који су често повезани са CVD-ом, као што су повећана продукција цитокина, оксидативни стрес и оштећење ДНК. Овај строго регулисани процес апоптозе може имати заштитну улогу за срце, јер је показано да њена инхибиција под одређеним условима има кардиопротективне ефекте. Ова чињеница је од посебног значаја, с обзиром на то да су кардиомиоцити неповратно постмитотске, терминално диференциране ћелије које не могу бити замењене након губитка (137,204).

Под утицајем стреса, кардиомиоцити излучују инфламаторне цитокине, хемокине, протеине за ћелијску адхезију и молекуле повезане са оштећењем (енгл. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs) (137). Истовремено, долази до промене експресије проапоптотских и антиапоптотских протеина, као што су *BAX* и *BCL2* (205). Ови молекули појачавају имунске одговоре, активирајући моноците и лимфоците, што додатно стимулише инфламаторно микроокружење у срцу. Ове супстанце доспевају у крвоток кроз различите механизме, ослобођене из кардиомиоцита, које су оштећене или су под стресом. Њихово присуство у крвотоку могло би бити значајно за праћење прогресије болести и могло би потенцијално служити као дијагностички биомаркери код срчаних обољења као што је HCM.

У нашој студији анализирани су узорци крви 93 пацијента са HCM-ом како би се испитала експресија гена *CASP8*, *CASP9* и *CASP3*, као и њихова повезаност са односом *BAX/BCL2*. Применом qPCR методе, измерени су нивои експресије ових гена и анализирана је њихова потенцијална повезаност са клиничком прогресијом HCM-а. Резултати PCR анализе показали су смањење експресије апоптотских иницијаторских гена (*CASP8* и *CASP9*), као и извршног гена (*CASP3*) код већине пацијената. Конкретно, смањена експресија *CASP8*, *CASP9* и *CASP3* гена уочена је код већине узорака пацијената, што указује на инхибицију апоптозе у анализираним узорцима. Овај налаз сугерише да су и унутрашњи и спољашњи путеви активације можда неактивни услед активације механизма који спречавају прекомерну ћелијску смрт. Уколико ово смањење експресије гена *CASP8*, *CASP9* и *CASP3* има заштитну улогу, модификација ових путева би требало пажљиво размотрити као потенцијалну терапијску опцију.

Додатно, наша анализа је показала да је проапоптотски ген *BAX* имао повећану експресију код већине пацијената, док је антиапоптотски ген *BCL2* био повећан код половине пацијената. Овај резултат указује на активацију механизма за уклањање оштећених или нефункционалних ћелија, с обзиром на то да *BAX* подстиче апоптозу, док *BCL2* делује супротно, пружајући кардиопротективни ефекат. Однос *BCL2/BAX* делује као важан регулатор ћелијске смрти, а његово повећање инхибицијом апоптозе доприноси преживљавању кардиомиоцита. Студије су показале да повећање овог односа штити срчано ткиво након инфаркта миокарда и реперфузије (MI/RI), смањујући митохондријско оштећење услед хипоксије (206).

Резултати наше студије потврђују значај *BAX* као кључног проапоптотског протеина. Повишени нивои *BAX* повезани су са ослобађањем цитохрома с из митохондрија, активацијом калцијумских канала и индукцијом апоптотских каскада, што је у складу са студијама *Narula* и сарадника (207). Оксидативни стрес додатно повећава транскрипциону активност и акумулацију *P53* протеина, који игра централну улогу у индукцији апоптозе у кардиомиоцитима. Овај процес се одвија путем повећане експресије *BAX*-а или инхибиције експресије *BCL2*, што наглашава важност регулације ових молекула у контексту превенције срчаних оштећења (208).

Сви испитани сигнални путеви у нашој студији, укључујући гене који их регулишу, међусобно су повезани и имају заједнички ефекат на потенцијалну смрт кардиомиоцита. Бројне студије усмерене на откривање нових лекова и побољшање терапијских процедура заснивају су на модулацији ових сигналних путева, са циљем регулације апоптозе и промоције преживљавања кардиомиоцита (209). На пример, доступна литература показује да мелатонин активира *JAK2-STAT3* сигнални пут, што смањује апоптозу кардиомиоцита и штити од миокардне исхемије тако што повећава експресију *BCL2* и смањује експресију *BAX* и *CASP3* (210). Слично томе, триметазидин (TMZ) је утврђен као инхибитор апоптозе кардиомиоцита изазване реперфузијом (I/R), делујући путем активације *Akt* сигналног пута, смањењем односа *BAX/BCL2* и експресије *CASP3* (211).

Резултати наше студије показали су да је *BAX* био повишен код већине пацијената, док је *BCL2* био повишен код половине анализираних пацијената. Ово сугерише да је код пацијената са повећаном експресијом *BCL2* инхибирано ослобађање цитохрома с, чиме је спречена активација *CASP3* и апоптоза. Ови резултати указују на то да кардиомиоцити настоје да преживе, чак и упркос присуству мутација у у генима саркомере, што је потврђено у бројним претходним студијама (69,212–214). Апоптоза кардиомиоцита са троструким мутацијама протеинских гена у саркомерима била би животно угрожавајућа, међутим, њихово преживљавање путем инхибиције апоптозе доводи до хипертрофије леве коморе, повећане контрактилности миокарда, дијастолне дисфункције, дезорганизације миофибрила и фиброзе (99,215,216).

У нашој студији, поред анализе гена укључне у процес апоптозе, анализирани су и гени укључени у оксидативни стрес (*HIF1A*, *NFE2L2*, *GSTA1*, *TXNRD1* и *NFKB1*) у циљу што бољег разумевања њиховог утицаја на прогресију болести.

Ген *HIF1A*, који кодира транскрипциони фактор *Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha* (HIF-1 α) има улогу у прилагођавању на услове хипоксије, али и у одржавању хомеостазе митохондрија, где има улогу да штити од оксидативног стреса и апоптозе (217). У нормалним условима, HIF-1 α је подложен брзој деградацији молекулима убиквитина, али у условима хипоксије избегава убиквитин деградацију и активира експресију бројних гена који стимулишу ангиогенезу, прелазак ћелије на анаеробне метаболичке путеве и отпорност на апоптозу. Међутим, у хроничним стањима попут HCM-а, дуготрајна активација овог гена може имати штетне ефекте, попут прекомерне ангиогенезе и повећане пролиферације ћелија (218).

У нашој студији, PCR анализа показала је снижене нивое експресије гена *HIF1A* код већине узорака пацијената са HCM-ом. Овако снижене вредности експресије могу бити део одбрамбеног система кардиомиоцита од штетног дејства дуготрајне активације овог гена. Истовремено, повишен оксидативни стрес и инфламаторни одговор могу довести до активације p53, који инхибира *HIF1A*, стимулише апоптозу кардиомиоцита и доводи до прогресије CVD-а.

Поред улоге у прилагођавању на услове са мање кисеоника, *HIF1A* утиче на регулацију различитих ћелијских процеса. На пример, поједина истраживања показала су да прекомерна експресија *HIF1A* у епителним ћелијама може довести до повећане апоптозе услед активације сложених апоптотских путева (219). Наша анализа је показала снижену експресију *HIF1A* праћену смањеном експресијом *CASP3*. Ови резултати указују да снижена експресија *HIF1A* може смањити активацију апоптотских путева, што може бити део одбрамбеног механизма кардиомиоцита, услед покушаја да избегне непотребну активацију апоптозе.

Док наша анализа указује на снижену експресију *HIF1A* код већине узорака пацијената са HCM-ом, што може бити повезано са заштитним механизмом против оксидативног стреса и апоптозе, друга истраживања су утврдили повишене нивое *HIF1A* у срчаним узорцима пацијената са завршним стадијумом срчане инсуфицијенције (220). Ово сугерише да наши пацијенти не спадају у ризичну категорију, што је и у складу са резултатима најбитнијих клиничких параметара. Такође, ово указује на то да *HIF1A* може имати дуалну улогу, зависно од стадијума болести, наглашавајући потребу за прецизним регулисањем његове експресије.

NFKB1 је транскрипциони фактор значајан за контролу транскрипције ДНК. Он регулише одговоре ћелија на различите стресне и инфламаторне стимулусе. Овај ген има двојаку улогу у продукцији цитокина и других медијатора имуног одговора и спречава прекоморне инфламаторне реакције. У контексту хроничних CVD-а *NFKB1* учествује у одржавању равнотеже између апоптозе и преживљавања кардиомиоцита (221). У нашем истраживању снижена експресија овог гена код половине узорака пацијената, сугерише смањену способност кардиомиоцита да одговоре на стресне стимулусе. Услед слабљења имуног одговора долази до хроничног оштећења ткива и прогресије болести. Литературни подаци показују да rs28362491 мутација *NFKB1* гена повећава осетљивост ћелија на апоптозу и изазива поремећај у правилном раду митохондрија, што потенцијално погоршава прогресију болести (221).

Ген *NFKB1* има двојаку улогу у срчаним обољењима, пружајући кардиопротективни ефекат супресијом прекомерне ћелијске смрти током стања попут хипоксије и реперфузије. Хронична активација овог пута подстиче инфламацију, ендоплазматични стрес и ћелијску смрт. У контексту смањене експресије *NFKB1*, ова равнотежа је нарушена, што потенцијално доприноси прогресији патолошког ремоделовања срца, укључујући апоптозу, фиброзу и метаболичке дисфункције кардиомиоцита (222). У нашем истраживању, снижена експресија *NFKB1* сугерише да овај транскрипциони фактор не успева адекватно да регулише механизме одбране и хомеостазе у срчаном ткиву. Ово може довести до поремећаја у регулацији апоптотских и антиапоптотских путева, као и до смањења адаптивног имуног одговора, што доприноси прогресији болести. Ова сазнања истичу потребу за даљим истраживањем молекуларних механизма који повезују *NFKB1*, као и потребу за одржавањем баланса његове експресије како би се спречила хронична активација.

Ген *NFE2L2*, који кодира транскрипциони фактор познат као Nrf2, игра кључну улогу у заштити ћелија од оксидативног стреса, запаљења и програмиране ћелијске смрти (апоптозе, некрозе, аутофагије и фероптозе). Његова активација доводи до експресије антиоксидативних гена попут GPx, који штите кардиомиоците од оштећења изазваних ROS-ом. Nrf2 се активира у присуству оксидативног стреса. Једном активиран, Nrf2 се премешта у једро, где се везује за секвенце ARE (*Antioxidant Response Elements*) и активира експресију гена укључених у антиоксидативну заштиту. Оваква његова активација утиче на функцију митохондрија и спречава прекомерну апоптозу. Nrf2 има и кардиопротективну улогу код повећаног нивоа ROS-a, који има штетно дејство на кардиомиоците (223–225).

Снижена експресија код великог броја узорака анализираних пацијената у нашем истраживању може указивати на немогућност ћелија да се адекватно одбране од стреса. Ови резултати указују на то да би терапијске стратегије усмерене на повећање експресије ових гена или на њихову фармаколошку активацију могле бити корисне у враћању редокс равнотеже и смањењу оксидативног оштећења. Активација овог гена или повећана експресија значајно ублажавају оштећења кардиомиоцита, побољшавају митохондријску функцију и успоравају развој срчане инсуфицијенције. Посебну пажњу треба посветити *NFE2L2* и *HIF1A* као потенцијалним терапијским таргетима.

Гени *TXNRD1* и *GSTA1* играју кључну улогу у одржавању редокс равнотеже у ћелијама неутралисањем повишеног нивоа ROS-a, који доводе до акумулације оштећене ДНК, липида и протеина и убрзава прогресију болести. У истраживању, који је анализирао комбинацију алела GSTP1 Val и GSTA1*В алела, утврђено је да ови алели повећавају ризик од развоја срчане инсуфицијенције. Ови полиморфизми су повезани са смањеним антиоксидативним капацитетом у кардиомиоцитима, што доводи до већег оксидативног стреса. Ови налази наглашавају значај GSTP1 полиморфизма у модулацији редокс статуса и инфламације код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (226).

Повећана експресија *TXNRD1* у клиничким узорцима, као што сугерише истраживање других аутора, у позитивној је корелацији са узнатредовалим стадијумом болести и лошијим преживљавањем пацијената (227). Овај налаз указује на то да *TXNRD1* може деловати као биомаркер прогресије болести и исхода у хроничним CVD. Док повећана експресија у каснијим стадијумима може одражавати компензацијски механизам или хроничну активацију редокс пута, смањена експресија код наших пацијената може сугерисати ранију фазу болести, када кардиомиоцити још увек нису развили потпуну компензацију.

У нашој студији, поред анализе гена укључених у процес апоптозе и оксидативног стреса анализирани су и гени који кодирају саркомерне протеине кардиомиоцита (*MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TNNT2* и *TPM1*) и гени укључени у физиологију срчаног мишића (*CTSS*, *LBP*, *AVP* и *DBH*) у циљу што бољег разумевања њиховој утицаја на прогресију болести. Резултати наше студије указују на значајно снижене експресије код већине испитиваних гена у овој групи. Гени који кодирају саркомерне протеине кардиомиоцита, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYBPC3*, *TNNT2* и *TPM1*, показали су снижену експресију код већине узорака. Мутације у *MYH7* и *MYH6* генима могу утицати на коришћење АТФ-а, што доводи до дисфункције митохондрија и поремећаја срчане контракције. Смањена експресија *MYH7* и *MYH6* у нашем истраживању може бити указивати на поремећај у функцији саркомера, јер се ови протеини директно укључују у формирање актин-миозин мостова и у срчани циклус (228).

Претходне студије истичу значај мутације *MYH6* гена које доводе до поремећаја у формирању миофибрила, а ово утиче на структуру и функцију саркомера. Ови резултати указују на то да поремећај експресије *MYH6* може бити важан механизам у патогенези HCM-а, посебно у контексту саркомера. Ово истраживања сугерише да овај ген показује фенотипску хетерогеност, што значи да његова експресија и мутације могу имати различите ефекте у зависности од контекста (229).

Снижена експресија гена *MYH6* у нашем истраживању може бити механизам компензације или довести до прогресије болести, што наглашава потребу за додатним истраживањима. Даље студије су неопходне да би се разјаснили молекуларни механизми који доводе до снижене експресије овог гена, као и његов однос са другим генетским и епигенетским факторима који доприносе развоју болести.

Резултати нашег истраживања указују на смањену експресију гена *MYH7* код пацијената са HCM-ом. Овај налаз је од посебног значаја јер овај ген кодира β -мозин, који представља основну компоненту саркомера и игра кључну улогу у генерисању контракционе силе у кардиомиоцитима. У литератури је већ описана функционална хетерогеност кардиомиоцита код пацијената са HCM, која може бити узрокована варијабилним нивоима експресије мутираног и нормалног алела гена *MYH7*, као што је приказано у раду *Kraft* и сар. Према овом истраживању, функционална неравнотежа између суседних кардиомиоцита, може иницирати кључне карактеристике HCM-а, као што су дезорганизација миофибрила, интерстицијска фиброза и хипертрофија. Аутори су идентификовали значајне разлике у сили контракције између појединачних

кардиомиоцита код пацијената са HCM-ом, што је повезано са различитим нивоима експресије мутираног и нормалног *MYH7* алела. У контексту наших резултата, смањена експресија гена *MYH7* могла би додатно допринети овом функционалном дисбалансу, јер мања доступност β -мозина може утицати на генерацију контракционе силе у погођеним кардиомиоцитима (230).

Овакав механизам може активирати и Tgf- β сигнализацију, која је повезана са развојем фиброзе и хипертрофије. Наши резултати подржавају хипотезу да хетерогеност у експресији гена *MYH7*, било кроз варијабилну експресију мутантног и нормалног алела или кроз опште смањење експресије, игра важну улогу у патогенези HCM-а. Наши резултати, у комбинацији са налазима из литературе, пружају нове увиде у молекуларне механизме ове болести и могу бити од значаја за развој персонализованих терапијских приступа.

Ген *MYL2* игра важну улогу у контракцији срчаног мишића и у везивању Ca^{2+} и фосфорилацији. Сnižена експресија гена *MYL2* у нашој студији сугерише потенцијални механизам губитка функције и прогресији болести. У складу са претходним студијама, овај ген игра важну улогу а његова снижена експресија може указивати на поремећаје контракције. Ранија истраживања су показала да мутације гена *MYL2* могу довести до нестабилности протеина и његов губитка функције. Ово је директно повезано са појавом различитих клиничких фенотипова. Овај налаз подржава резултате наших истраживања да снижена експресија *MYL2* може бити део ремоделације саркомера и прогресије болести (231).

Ген *MYBPC3* игра кључну улогу у регулацији контракција миофибрила. Сnižена експресија *MYBPC3* гена резултира смањеном продукцијом сМуВР-С протеина, који је одговоран за структурну стабилност и прецизну регулацију контрактилних својстава саркомера. Овај недостатак протеина доводи до поремећаја у изградњи и функционисању миофибрила, што може изазвати структурне и морфолошке промене у миокарду, карактеристичне за HCM. Наши резултати који показују снижену експресију гена *MYBPC3* код већине узорака анализираних пацијената са HCM-ом слажу се са налазима претходних студија које указују на хаплоинсуфицијенцију као основни механизам. Сnižена експресија овог гена не само што доприноси структурним и функционалним променама, већ указује и на потребу за развојем специфичних терапијских стратегија које би могле побољшати експресију или стабилизovati функцију сМуВР-С протеина (232,233). У раду *Parbhudayal* и сар. је демонстрирано да пацијенти са мутацијама у *MYBPC3* гену имају значајно снижене нивое сМуВР-С протеина и мРНК, што је последица механизма хаплоинсуфицијенције. Слично томе, наши налази указују да снижена експресија овог гена може имати значајан утицај на развој болести.

Експресија гена *TNNT2*, који игра централну улогу у регулацији интеракције актина и миозина, што је важно за контракцију срчаног мишића. Сnižена експресија овог гена код већине узорака пацијената може довести до поремећаја контракција

миокарда. Претходна истраживања су показала да мутације у *TNNT2* гену могу узроковати значајну фенотипску хетерогеност, чак и у оквиру истих породица. То значи да се клиничке манифестације болести могу значајно разликовати међу појединцима са истом мутацијом, од субклиничких облика до тешких хипертрофија са повећаним ризиком од срчаног застоја. Наше истраживање указује на снижену експресију *TNNT2*, која може бити механизам који доприноси овој варијабилности, посебно у случајевима са минималним структурним променама или раним фазама болести. Овај налаз подржава претпоставку да генетски фактори могу модулисати експресију *TNNT2*, чиме се утиче на фенотипску разноликост (234).

Ген *TPM1* игра кључну улогу у одржавању структуре и стабилности актинских филамената, посебно у ћелијама срчаног мишића. У нашем истраживању, резултати су показали снижене нивое експресије код већине узорака пацијената, што указује на поремећај у структури цитоскелета. *TPM1* и *TNNT2* гени су кључни за регулацију контракције срчаног мишића. Смањена експресија *TPM1* гена може нарушити равнотежу у структури и функцији саркомерних протеина, што је слично ефектима мутација *TNNT2* гена, које доводе до измене контрактилне функције. Претходна истраживања показала су да мутације у *TNNT2* гену доводе до смањења контрактилне способности миокарда, као и до фенотипске хетерогености, која варира од субклиничких облика до тешких хипертрофија. Смањена експресија *TPM1* гена може допринети развоју миокардне фиброзе и повећаном ризику од аритмија, што указује на потребу за додатним истраживањима за боље разумевање међусобних утицаја саркомерних гена у патогенези (234).

Наше истраживање указује на смањену експресију гена *CTSS* код већине узорака пацијената са HCM-ом што пружа нове увиде у патофизиолошке механизме ове болести. *CTSS* је протеаза позната по својој улози у запаљенским процесима, разградњи екстрацелуларног матрикса и активацији цитокинских и имунолошких путева. У контексту HCM-а, где је патогенеза повезана са мутацијама у генима саркомере, одсуство експресије *CTSS* може указивати на алтернативне механизме болести који не укључују класичне упалне путеве посредоване овом протеазом.

У литератури, повишена експресија *CTSS* је потврђена у различитим CVD, укључујући атеросклерозу, срчану инсуфицијенцију и аортну стенозу, где овај ензим учествује у разградњи колагена и еластина, промовишући ремоделовање ткива и упалне процесе (235). Међутим, наши резултати указују да код пацијената са HCM-ом овај механизам није доминантан, што може објаснити зашто се HCM разликује у фенотипу од других CVD.

Ген *LBP* укључен је у имунолошки одговор и регулацију запаљенских процеса. Резултати нашег истраживања указују на смањену експресију гена *LBP* код већине узорака пацијената са HCM-ом, што указује на могући поремећај у имунолошком одговору и регулацији запаљенских процеса у овој популацији пацијената. *LBP* игра кључну улогу у имунолошком систему, односно у препознавању и неутралисању

липополисахарида. Такође, овај ген иницира сигналне путеве повезане са имунолошким одговором. Његова снижена експресија код већине узорака пацијената са HCM-ом могла би указивати на смањену способност срчаног ткива да се избори са запаљенским реакцијама, што би могло допринети патофизиологији болести.

Ранија истраживања, попут студије *Lim* и сар., који су испитивала експресију гена код пацијената са HCM-ом, наглашавају повећану експресију гена укључених у секундарну хипертрофију и адаптивне одговоре на стрес. Ова истраживања доприносе разумевању структурних и функционалних промена у миокарду, док наши резултати сниженог *LBP* гена допуњују ова истраживања тако што указују на специфичну имунолошку дисфункцију. Снижена експресија *LBP* могла би представљати поремећај у могућности срчаног ткива да ефикасно одговори на упалне процесе изазване локалним или системским факторима, што би могло додатно погоршати фиброзу и друге патолошке процесе.

У поменутом раду примећено је да су гени повезани са митохондријалном функцијом, синтезом протеина и цитоскелетом значајно регулисани у HCM. Насупрот томе, наши резултати указују на недостатак експресије једног кључног медијатора упалног одговора, што може указивати на то да су упални путеви код HCM специфично модулисани у правцу супресије. Ова хипотеза може бити у складу са појединим фенотипским аспектима HCM, као што су присуство фиброзе без јаке инфилтрације имуних ћелија, што је често примећено у хистолошким студијама (236).

AVP ген кодира хормон вазопресин, који игра кључну улогу у регулацији осмоларности, крвног притиска и кардиоваскуларне функције. У контексту HCM-а, снижена експресија *AVP* гена у нашем истраживању може указивати на поремећаје у сигналним путевима који регулишу васкуларни тонус и адаптивне одговоре на хемодинамички стрес. *Hautala* је у свом истраживању испитивала механизме регулације транскрипције гена за *BNP* током хемодинамског преоптерећења и нагласила улогу *AVP* у активацији транскрипционих фактора. Њихови резултати су показали да инфузија *AVP* у условима акутног преоптерећења притиском доводи до повећања експресије *BNP* мРНК и пептида у левој комори срца. Ово указује на то да је *AVP* сигнализација кључна за адаптивни одговор срца на механичко оптерећење. У нашем истраживању, снижена експресија *AVP* гена сугерише нарушену функцију овог механизма, што би могло довести до смањене експресије *BNP* као одговора на стрес и ослабљене способности срца да адекватно реагује на хемодинамичке изазове.

Овај поремећај у *AVP* сигналним путевима може да допринесе прогресији болести кроз механизме као што су миокардна фиброза и ремоделовању срца. Наши резултати сугеришу да снижена експресија *AVP* гена може имати значајну улогу у патогенези HCM-а, нарочито у контексту нарушеног адаптивног одговора на механички стрес. Ови налази пружају основу за даља истраживања интеракција између *AVP* и других сигналних молекула у циљу бољег разумевања њихове улоге у прогресији болести (237).

Ген *DBH* катализује конверзију допамина у норадреналин, што је кључно за нормалну функцију симпатичког нервног система. У нашем истраживању, снижена експресија *DBH* гена код половине узорака пацијената, као и потпуни изостанак експресије у другој половини, указују на могућу дисфункцију у симпатичком нервном систему. Овај поремећај може погоршати већ постојеће срчане компликације код пацијената са HCM-ом, који иначе трпе последице хипертрофије срчаног мишића. Дисбаланс неуротрансмитера утиче на регулацију васкуларног тонуса и срчане функције, чиме се додатно погоршавају абнормалности.

У раду Preuss и сар., испитиван је утицај полиморфизма rs1611115 у *DBH* гену на ризик од зависности од алкохола, депресије и суицидалног понашања. Њихови резултати показали су да варијанта rs1611115 значајно утиче на активност *DBH* ензима. Конкретно, носиоци Т алела имају смањену активност *DBH*, што доводи до нижих нивоа норадреналина и дисбаланса у допаминско-норепинефринском систему. Овај ефекат је био посебно изражен код жена, што указује на потенцијалне полне разлике у регулацији активности *DBH* (238).

Снижена експресија *DBH* гена у нашем истраживању може бити повезана са поремећајима у неуротрансмитерским путевима који доприносе прогресији HCM-а. Ови налази су у складу са претходним студијама, укључујући рад Preuss и сар., које наглашавају значај генетских варијанти у модулацији активности *DBH* и њихову улогу у развоју различитих патологија. Додатна истраживања су неопходна како би се боље разумеле последице снижене експресије *DBH* гена на срчану функцију и развој нових терапијских приступа.

5.3. Анализа полиморфизама у генима *МУН7* и *МУВРС3*

У нашем истраживању анализирана је генетска структура популације полиморфизама гена *МУН7* и *МУВРС3*, као и њиховог потенцијалног утицаја на развој и клиничке карактеристике HCM-а. Резултати су показали да је дистрибуција генотипова за испитиване полиморфизме у складу са Харди-Вајнберговом равнотежом. Ова равнотежа указује на генетичку стабилност популације, што представља добру основу за даља истраживања потенцијалног патолошког значаја ових полиморфизама (239). У нашем истраживању резултати показују да дистрибуција генотипова није одступала од очекиваних вредности ($p > 0.05$), што подржава претпоставку о генетичкој равнотежи у популацији.

Резултати су показали ниску учесталост варијантног алела С у обе групе. За *МУН7*, учесталост алела С износила је 0.016, док је за *МУВРС3* била нешто већа и износила 0.07. У оба случаја, хомозиготни генотип за алел С (СС) није уочен, што може указивати на могући селективни притисак који ограничава присуство овог алела у хомозиготном облику. Присуство алела С искључиво у хетерозиготном облику (GC) указује на потребу за већим узорцима ради бољег разумевања његовог потенцијалног патолошког утицаја.

Истраживање о гену *MYH7* спроведено у пакистанској популацији, указало је такође на одсуство хомозиготног варијантног генотипа *CC* код специфичног полиморфизма rs121913642. Они су ово тумачили као могући селективни притисак који ограничава присуство овог алела у хомозиготном стању (240). Слично томе, у нашем истраживању ниска учесталост алела *C* за гене *MYH7* и *MYBPC3*, као и одсуство хомозиготног генотипа, може указивати на постојање сличних еволутивних механизма или биолошких ограничења. Оба истраживања показују да је алел *C* присутан углавном у хетерозиготном облику, што може бити последица селективних притисака који фаворизују хетерозиготне носиоце или елиминишу хомозиготе током ембрионалног развоја. Ово је важан налаз, јер сугерише да ниска учесталост ових алела и њихова ограничена дистрибуција могу имати клинички значај, посебно у контексту болести попут HCM-а.

Претходна истраживања указују да учесталост и тип мутација у гену *MYH7* могу значајно варирати између различитих популација, што може бити одраз различитих еволутивних и селекцијских притисака. Овај налаз је потврђен у истраживању венецуеланске популације, где су пронађени полиморфизми гена *MYH7*, али без присуства патогених или missense мутација код пацијената са HCM-ом. Ово указује на значајну генетску хетерогеност између популација и могућа објашњења сличности и разлика у поређењу са нашим истраживањем.

Једно од ограничења оба истраживања је релативно мали број пацијената, што умањује статистичку моћ за откривање ретких хомозиготних варијанти. Неопходни су већи узорци и додатне анализе како би се боље разумела улога полиморфизма у патогенези HCM. Венецуеланска студија наглашава потребу за проширењем истраживања на друге гене укључене у HCM, што је у складу са нашим плановима за даљу анализу полиморфизма гена *MYH7* и *MYBPC3*, као и њиховог потенцијалног патолошког значаја (241).

Ова запажања кореспондирају са недавним истраживањем *Helms* и сар., које указује на постојање компензационих механизма у кардиомиоцитима код хетерозиготних мутација *MYBPC3*. У тој студији, показано је да хетерозиготи могу одржати нормалне нивое *MyBP-C* протеина кроз успорену деградацију, док хомозиготи трпе значајне функционалне дефиците, што даље подупире хипотезу о селективном притиску који фаворизује хетерозиготе.

Такође, наши налази сугеришу да ниска учесталост и ограничена дистрибуција ових алела могу имати клинички значај. У комбинацији са открићима из рада, који описују молекуларне механизме компензације у раним фазама HCM, можемо претпоставити да је ниска учесталост алела *C* и одсуство хомозигота у популацији део ширег еволутивног механизма заштите од озбиљних облика болести (242).

Ова повезаност између генетичких и функционалних аспеката указује на значај истраживања ових механизма у циљу бољег разумевања HCM-а и могућности развоја нових терапијских стратегија које би циљале очување или обнављање МуВР-С.

PCR анализа полиморфизама гена и генске експресије пружила је вредне податке о специфичним мутацијама и њиховој учесталости међу пацијентима. Ови резултати омогућавају идентификацију потенцијално угрожених пацијената, али такође постављају изазов у контексту њихове примене за генску терапију.

Генска терапија за HCM суочава се са изазовима због сложености генетских механизма и варијабилности клиничке слике. Селекција пацијената за ову терапију морала би да буде изузетно прецизна, јер одређени облици HCM-а дозвољавају нормалну дуговечност и одсуство симптома. Могућност примене генске терапије била би највише од користи за младе пацијенте из породица са високим ризиком, посебно ако су идентификовани пре појаве леве вентрикуларне хипертрофије. Ипак, циљање мутираних гена захтева развој напредних техника које могу селективно утицати на специфичне варијанте без нарушавања нормалних функција протеина.

Ген *MYH7*, који је кључан за контрактилну функцију срчаног мишића, показао је ниску учесталост варијантног алела у нашој студији. Иако је ова варијанта класификована као бенигна, њено присуство у узорку пацијената указује на потребу за додатним функционалним истраживањима како би се боље разумела њена улога у контексту HCM. Чак и суптилне промене у структури овог гена могу утицати на функцију миокарда, што је посебно важно за пацијенте са генетском предиспозицијом за кардиомиопатије.

Закључно, иако анализе полиморфизама пружају значајан допринос у раној идентификацији ризика, њихова примена у оквиру генске терапије тренутно је ограничена на истраживачке услове. Сложеност генетских механизма и велика варијабилност клиничке слике код хипертрофичне кардиомиопатије представљају изазов за прецизно циљање мутираних гена. Даља истраживања су неопходна како би се унапредила оптимизација терапијских стратегија и развила ефикасна селекција.

5.4. Примена машинског учења у процени ризика

У оквиру наше студије, фокусирали смо се на истраживању повезаности између клиничких параметара, експресије одређених гена и процењене тежине болести. Применом метода ML-а, анализирани су подаци како би се идентификовали потенцијални биомаркери који могу указати на специфичност клиничког испољавања болести. Урађена је линеарна статистичка корелација између свих доступних генетских и клиничких података, али и анализа повезаности ових параметара са процењеном тежином болести. Ова анализа представља основу за класификацију пацијената у групе ризика.

У оквиру нашег истраживања испитивана је корелација између односа *BAX/BCL2* и експресије гена *CASP8*, *CASP9* и *CASP3*, који су кључни за процес апоптозе. Добијене вредности показале су веома слабу и негативну корелацију (-0.041 , -0.057 и -0.049). Овакви резултати сугеришу одсуство значајне повезаности између ових гена у анализираној групи пацијената са HCM-ом, што показује сложеност регулације апоптозе у HCM-у.

Додатна анализа корелација између свих анализираних гена, укључујући полиморфизме у генима *MYH7* и *MYBPC3*, такође није открила значајне повезаности са експресијом других гена. Топлотна мапа потврдила је одсуство јасних образаца, што указује на ограничен утицај ових полиморфизама на генетске профиле у анализираној групи пацијената и потенцијалне класификације болесника. Ово указује да *MYH7* и *MYBPC3* полиморфизми немају значајан утицај на опште генетске обрасце код пацијената са HCM-ом у анализираној групи. У истраживању *Tripathi* и сар. аутори анализирана је експресија гена у циљу проналажења повезаности између гена. Ово истраживање показало је да применом нелинеарних метода могу бити откривене скривене корелације међу експресијом гена, што би могло бити од значаја за прецизнију процену тежине болести и ризика (243).

Према постојећој литератури, различите методе се користе за анализу зависности између експресије гена. На пример, *Santos* и сар. упоредили су више статистичких приступа, укључујући *Pearson*-ову, *Spearman*-ову и *Kendall*-ову корелацију, као и методе засноване на информационој теорији, попут мутуалне информације и максималне информационе мере. Њихова анализа показала је да методе као што су *Distance correlation* и информационе мере могу боље открити нелинеарне и нефункционалне односе између сигнала експресије гена, посебно када су подаци сложени или садрже нелинеарне обрасце (244).

Ови резултати сугеришу да постоји потреба за додатним истраживањима у правцу примене напредних статистичких и метода ML-а како би се идентификовали скривени обрасци који могу бити занемарени класичним методама. Применом ових метода могло би се побољшати разумевање сложених биолошких процеса, али и омогућити прецизнија процена тежине болести и класификација пацијената на основу интеграције генетских и клиничких података.

Важно је напоменути да је корелациона анализа спроведена на релативно малом узорку пацијената, што може ограничити статистичку значајност резултата. Мали узорци често доводе до велике варијабилности, што би могло објаснити зашто подгрупе дефинисане на основу полиморфизама нису показале већу повезаност са експресијом осталих гена. Ово наглашава потребу за већим и хомогенијим скуповима података у будућим истраживањима (245).

Резултати наше студије указују на важност оптимизације података и комбиновања различитих извора информација за побољшање перформанси модела за

процену ризика. У примени ML-а, алгоритам KNN коришћен је за класификацију пацијената у групе ризика, користећи клиничке параметре и експресију специфичних гена. Док је класификација заснована искључиво на генетским подацима дала ограничене резултате, интеграција клиничких података значајно је побољшала тачност модела, која је достигла 92%, нарочито након оптимизације података о генској експресији. Овај налаз потврђује важност интегративног приступа који комбинује генетске и клиничке податке за анализу HCM-а, омогућавајући боље разликовање група пацијената на основу њиховог ризика и потенцијалних здравствених исхода.

Ови налази су у складу са претходним студијама које су показале да је оптимизација података и прецизна обрада генетских информација кључна за побољшање модела за процену ризика (162). Будуће студије би требало да се фокусирају на унапређење метода обраде података, као и на интеграцију нових извора информација, како би се обезбедили још прецизнији модели класификације пацијената. Такође, у истраживању *Hassan* и сар. примена метода машинског учења истиче значај интеграције геномских и клиничких података у циљу побољшања прецизности персонализоване медицине, посебно у идентификацији биомаркера и оптимизацији терапијских стратегија (246)

Значај сваке варијабле процењен је као проценат њеног утицаја на модел за класификацију ризика пацијената са HCM-ом. Резултати анализе значаја гена и клиничких параметара показали су да одређени фактори играју кључну улогу у процени ризика и здравствених исхода код пацијената са HCM-ом. Међу генима, највећу значајност је показао *BCL2* са процентуалним доприносом од 12.0 у укупној процени ризика. Ово је у складу са његовом улогом у регулацији апоптозе балансирањем ћелијске смрти и преживљавањем кардиомиоцита. Поред тога, висок значај гена *MYH7* (10.0) потврђује његову повезаност са структурним и функционалним променама у срцу што је у складу са претходним истраживањима која указују на његову улогу у развоју болести (240).

Међу клиничким параметрима, NT-BNP, са процентуалним доприносом од 9.4, показао се као најзначајнији за процену излаза у овом моделу. Овај допринос наглашава његову важност као маркера функције срца, што указује на његову високу важност у процени ризика од болести и здравствених исхода код пацијената са HCM-ом. Значај NT-BNP-а је очекиван, с обзиром на његову клиничку примену у процени срчане функције (247). Поред њега, параметри као што су митрална регургитација (*Mitral regurgitation*, MR) са вредношћу од 6.0 и LVOT maxPG са вредношћу од 5.9, такође су се показали као значајни фактори. LVOT maxPG се сматра показатељем срчане инсуфицијенције, а MR је повезана са лошом прогнозом пацијената. Сви ови параметри заједно указују на важност у процени ризика од HCM-а (248,249).

Добијени резултати наглашавају значај интеграције генетских и клиничких података у анализи пацијената са HCM-ом. Док су генетски подаци значајни за разумевање молекуларних механизма болести, клинички параметри пружају додатну дубину у процени ризика и предикцији исхода. Овај интегративни приступ омогућава

бољу класификацију и индивидуализацију третмана пацијената. Даља истраживања треба да се усмере на валидацију ових налаза на већим узорцима и истраживање додатних параметара како би се побољшала прецизност и применљивост резултата у клиничкој пракси.

Резултати кластеровања заснованог на експресији гена указују на значај апоптотских гена у процени ризика код пацијената са HCM-ом. Модел *k-means* кластеровања успео је да идентификује 63,1% пацијената са високим ризиком, користећи само експресију гена *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX* и *BCL2*. Овај резултат указује на релативно добру предиктивну вредност апоптотских гена у разликовању пацијената са различитим нивоима ризика.

Најјаснија сепарација пацијената добијена је комбинацијом *CASP3* и односа *BAX/BCL2*. Ова комбинација показала је јасно раздвајање између група пацијената са ниским и високим ризиком, што је у складу са оригиналним ризиком дефинисаним на основу клиничких података. Ови резултати сугеришу да апоптотски маркери, посебно *CASP3* и однос *BAX/BCL2*, имају значајну улогу у процени ризика и могу послужити као потенцијални биомаркери за предикцију ризика и клиничке исходе код HCM-а.

С друге стране, гени повезани са оксидативним стресом (*NFE2L2* и *NFKB1*) и патогенозом HCM-а (*MYH7* и *MYBPC3*) нису показали довољну хомогеност у кластерима, што указује на потребу за већим узорцима и интеграцијом додатних извора података. Иако су модели кластеровања засновани на генетским подацима показали нижу тачност у поређењу са моделима који укључују клиничке податке, они и даље пружају значајан увид. Кластеровање које укључује комбинацију генетских и клиничких података могло би додатно побољшати предиктивну вредност и пружити прецизније алате за процену ризика.

Ови налази могу се упоредити са сличним истраживањима, као што је рад Gibbons и Roth-a, који је анализирао различите методе кластеровања за груписање гена на основу експресије. У њиховом раду, истакнута је важност избора одговарајућег алгоритма и метрике удаљености, што је такође било кључно у нашем истраживању. Као што су они показали да кластеровање може открити функционалне повезаности гена, наши резултати сугеришу да комбинација апоптотских гена, посебно *CASP3* и *BAX/BCL2*, може бити корисна за идентификацију пацијената са високим ризиком (250).

Закључно, мултидимензионални приступ који интегрише генетске и клиничке податке показао је велики потенцијал за побољшање процене ризика код пацијената са HCM-ом. Будуће студије требало би да се усмере на проширење узорака, оптимизацију података и интеграцију различитих извора информација како би се развили прецизнији и персонализованији приступи дијагнози и лечењу.

5.5. *Ограничења и значај резултата за будућа истраживања*

Иако гени *MYH7* и *MYBPC3* у нашој студији нису показали директну повезаност са проценом ризика на основу кластер анализе, њихова улога у патогенези HCM-а остаје значајна и захтева даља истраживања. Ови резултати представљају основу за будуће студије, које би могле пружити дубље увиде у генетске механизме који утичу на клиничке исходе.

Упркос значајним предностима које AI пружа у области кардиоваскуларне генетике, наша студија је показала да бројни изазови отежавају примену ових метода у пракси. Један од водећих изазова јесте потреба за великим скуповима података за обуку модела, што је посебно изражено код надгледаних метода учења (251). Поред тога, ови скупови података морају бити пажљиво означени од стране стручњака, како би се омогућило тачно предвиђање познатих исхода. Код истраживања CVD-а, попут HCM-а, добијање великих количина података представља додатну препреку, јер су ове болести хетерогене и недовољно добро дефинисане (164). Недовољан број узорака, као и присуство пристрасних или непотпуних података, може довести до лоше генерализације модела и потенцијално нетачне клиничке интерпретације (252). Додатно ограничење представљају високи трошкови генетских истраживања, укључујући анализу полиморфизама (253). Значајни финансијски ресурси потребни за ове анализе често ограничавају величину скупа података и приступ савременим техникама.

6.ЗАКЉУЧАК

ЗАКЉУЧАК

1. Резултати су показали стабилност клиничких параметара пацијената са НСМ-ом током периода праћења. Ово указује на релативно стабилно стање популације, али је могуће да краћи временски оквир није омогућио детекцију значајних промена. Будућа истраживања са дужим временским оквиром и више тачака праћења могла би пружити дубље увиде у прогресију болести и ризик од компликација.
2. Полиморфизам rs3729823 у гену МУН7 има ниску учесталост и није уочен у хомозиготном облику, што указује на његов могући биолошки значај. Иако се тренутно класификује као бенигни, његов утицај на функцију протеина захтева даља функционална и механистичка истраживања.
3. PCR анализа полиморфизама и експресије гена пружила је корисне увиде у патогенезу НСМ-а, али ограничења генске терапије, као што су сложеност механизма и варијабилност клиничке слике, указују на потребу за унапређењем техника и развојем персонализованих приступа.
4. Примена алгоритама машинског учења показала је високу тачност класификације пацијената када су комбиновани генетски и клинички подаци. Овај мултидимензионални приступ има велики потенцијал за персонализовану медицину и идентификацију пацијената са високим ризиком. Будући радови треба да укључе сложеније моделе и проширене скупове података.
5. Анализа експресије апоптотичких гена (*BCL2*, *BAX*, *CASP3*) указала је на њихову могућу улогу у патогенези и процени ризика код НСМ-а. Показано је да однос *BAX/BCL2* има значајну предиктивну вредност, док је ген *BCL2* идентификован као најважнији у контексту регулације апоптозе. Ови налази указују на потребу за додатним истраживањима како би се утврдила њихова клиничка примена као биомаркера.
6. Потребно је фокусирати се на идентификацију нових биомаркера, укључивање већих и разноврснијих популација пацијената, као и примену напредних техника за анализу података. Овакав приступ ће омогућити боље разумевање патогенезе НСМ-а и довести до оптимизације терапијских стратегија.

ЛИТЕРАТУРА

ЛИТЕРАТУРА

1. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract*. 2019;8:1–11.
2. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health. *J Am Coll Cardiol*. 2022 Dec 20;80(25):2361–71.
3. Paramasivam A, Vijayashree Priyadharsini J. MitomiRs: new emerging microRNAs in mitochondrial dysfunction and cardiovascular disease. *Hypertens Res*. 2020 Aug;43(8):851–3.
4. Rastogi S, Pandey MM, Rawat AKS. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine*. 2016 Oct 15;23(11):1082–9.
5. Jurgens CY, Lee CS, Aycock DM, Masterson Creber R, Denfeld QE, DeVon HA, et al. State of the Science: The Relevance of Symptoms in Cardiovascular Disease and Research: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2022 Sep 20;146(12):e173–84.
6. Rogers J, Collins G, Husain M, Docherty M. Identifying and managing functional cardiac symptoms. *Clin Med (Lond)*. 2021 Jan;21(1):37–43.
7. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020 Jul 2;11:694.
8. Ciumărnean L, Milaciu MV, Negrean V, Orășan OH, Vesa SC, Sălăgean O, et al. Cardiovascular Risk Factors and Physical Activity for the Prevention of Cardiovascular Diseases in the Elderly. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Dec 25;19(1):207.
9. Teo KK, Rafiq T. Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021 May;37(5):733–43.
10. Gu W, Cheng Y, Wang S, Sun T, Li Z. PHD Finger Protein 19 Promotes Cardiac Hypertrophy via Epigenetically Regulating SIRT2. *Cardiovasc Toxicol*. 2021 Jun;21(6):451–61.
11. Hajar R. Genetics in cardiovascular disease. *Heart Views*. 2020;21(1):55.
12. Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr Cardiol Rev*. 2018;14(3):153–63.
13. Dhingra R, Vasan RS. Age As a Risk Factor. *Medical Clinics of North America*. 2012 Jan;96(1):87–91.
14. Haider A, Bengs S, Luu J, Osto E, Siller-Matula JM, Muka T, et al. Sex and gender in cardiovascular medicine: presentation and outcomes of acute coronary syndrome. *European Heart Journal*. 2020 Apr 1;41(13):1328–36.

15. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, Timmis A, Huculeci R, Torbica A, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat Rev Cardiol*. 2022 Feb;19(2):133–43.
16. Ryczkowska K, Adach W, Janikowski K, Banach M, Bielecka-Dabrowa A. Menopause and women's cardiovascular health: is it really an obvious relationship? *Arch Med Sci*. 2023 Mar 1;19(2):458–66.
17. Gao Z, Chen Z, Sun A, Deng X. Gender differences in cardiovascular disease. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2019 Dec;4:100025.
18. Smith TW. Intimate Relationships and Coronary Heart Disease: Implications for Risk, Prevention, and Patient Management. *Curr Cardiol Rep*. 2022 Jun;24(6):761–74.
19. Ghodeswar GK, Dube A, Khobragade D. Impact of Lifestyle Modifications on Cardiovascular Health: A Narrative Review. *Cureus*. 2023 Jul;15(7):e42616.
20. Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Oct 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>
21. Reichart D, Magnussen C, Zeller T, Blankenberg S. Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J Intern Med*. 2019 Oct;286(4):362–72.
22. Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician*. 2009 May 1;79(9):778–84.
23. Salemi VMC, Mohty D, Altavila SLLD, Melo MDTD, Kalil R, Bocchi EA. Insights into the Classification of Cardiomyopathies: Past, Present, and Future Directions. *Clinics*. 2021;76:e2808.
24. Sisakian H. Cardiomyopathies: Evolution of pathogenesis concepts and potential for new therapies. *World J Cardiol*. 2014 Jun 26;6(6):478–94.
25. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006 Apr 11;113(14):1807–16.
26. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):841–2.
27. Brieler J, Breeden MA, Tucker J. Cardiomyopathy: An Overview. *Am Fam Physician*. 2017 Nov 15;96(10):640–6.

28. McCartan C, Mason R, Jayasinghe SR, Griffiths LR. Cardiomyopathy Classification: Ongoing Debate in the Genomics Era. *Biochemistry Research International*. 2012;2012:1–10.
29. El Hadi H, Freund A, Desch S, Thiele H, Majunke N. Hypertrophic, Dilated, and Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Where Are We? *Biomedicines*. 2023 Feb 11;11(2):524.
30. Horton RH, Lucassen AM. Recent developments in genetic/genomic medicine. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Mar 15;133(5):697–708.
31. Nasimova N, Muminov B, Nasimov R, Abdurashidova K, Abdullaev M. Comparative Analysis of the Results of Algorithms for Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy Using Deep Learning. In: 2021 International Conference on Information Science and Communications Technologies (ICISCT) [Internet]. Tashkent, Uzbekistan: IEEE; 2021 [cited 2024 Oct 14]. p. 1–5. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9670134/>
32. Sarohi V, Srivastava S, Basak T. A Comprehensive Outlook on Dilated Cardiomyopathy (DCM): State-Of-The-Art Developments with Special Emphasis on OMICS-Based Approaches. *JCDD*. 2022 Jun 1;9(6):174.
33. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2017 Jul 22;390(10092):400–14.
34. Jain A, Norton N, Bruno KA, Cooper LT, Atwal PS, Fairweather D. Sex Differences, Genetic and Environmental Influences on Dilated Cardiomyopathy. *JCM*. 2021 May 25;10(11):2289.
35. Fairweather D, Beetler DJ, Musigk N, Heidecker B, Lyle MA, Cooper LT, et al. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy: An update. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1129348.
36. Chintanaphol M, Orgil BO, Alberson NR, Towbin JA, Purevjav E. Restrictive cardiomyopathy: from genetics and clinical overview to animal modeling. *Rev Cardiovasc Med*. 2022 Mar 17;23(3):108.
37. Braam RL, Post JG. Restrictive Cardiomyopathy. In: Baars HF, Doevendans PAFM, Houweling AC, Van Tintelen JP, editors. *Clinical Cardiogenetics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2024 Oct 14]. p. 139–49. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-45457-9_8
38. Cordova Sanchez A, Nealy Z, Azhar A, Banerjee S, Bisen M, Kozman H. A Rare Case of Restrictive Cardiomyopathy Presenting With Large, Recurrent Pericardial Effusions. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. 2021 Jan;9:23247096211058487.
39. Makavos G, Kairis C, Tselegkidi ME, Karamitsos T, Rigopoulos AG, Noutsias M, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: an updated review on diagnosis, prognosis, and treatment. *Heart Fail Rev*. 2019 Jul;24(4):439–59.

40. Baenen O, Carreño-Martínez AC, Abraham TP, Rugonyi S. Energetics of Cardiac Blood Flow in Hypertrophic Cardiomyopathy through Individualized Computational Modeling. *JCDD*. 2023 Sep 27;10(10):411.
41. Keramida K, Lazaros G, Nihoyannopoulos P. Right ventricular involvement in hypertrophic cardiomyopathy: Patterns and implications. *Hellenic Journal of Cardiology*. 2020 Jan;61(1):3–8.
42. Roma-Rodrigues C, Fernandes AR. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: advances and pitfalls in molecular diagnosis and therapy. *Appl Clin Genet*. 2014;7:195–208.
43. McKenna WJ, Behr ER. Hypertrophic cardiomyopathy: management, risk stratification, and prevention of sudden death. *Heart*. 2002 Feb;87(2):169–76.
44. Margossian R, Colan SD. Hypertrophic Cardiomyopathy in Children. In: Abdulla R id, Berger S, Backer C, Anderson R, Holzer R, Blom N, et al., editors. *Pediatric Cardiology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2023 [cited 2024 Oct 14]. p. 1–30. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-42937-9_76-1
45. Migliore F, Mattesi G, Zorzi A, Bauce B, Rigato I, Corrado D, et al. Arrhythmogenic Cardiomyopathy-Current Treatment and Future Options. *J Clin Med*. 2021 Jun 22;10(13):2750.
46. James CA, Syrris P, van Tintelen JP, Calkins H. The role of genetics in cardiovascular disease: arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2020 Apr 7;41(14):1393–400.
47. Corrado D, Basso C, Judge DP. Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):784–802.
48. Marrone D, Zampieri F, Basso C, Zanatta A, Thiene G. History of the discovery of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2019 Apr 7;40(14):1100–4.
49. Pilichou K, Bezzina CR, Thiene G, Basso C. Arrhythmogenic cardiomyopathy: transgenic animal models provide novel insights into disease pathobiology. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Jun;4(3):318–26.
50. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):749–70.
51. Kochi AN, Vettor G, Dessanai MA, Pizzamiglio F, Tondo C. Sudden Cardiac Death in Athletes: From the Basics to the Practical Work-Up. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Feb 14;57(2):168.
52. Abdelfattah OM, Martinez M, Sayed A, ElRefaei M, Abushouk AI, Hassan A, et al. Temporal and Global Trends of the Incidence of Sudden Cardiac Death in Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC Clin Electrophysiol*. 2022 Nov;8(11):1417–27.
53. Bick AG, Flannick J, Ito K, Cheng S, Vasan RS, Parfenov MG, et al. Burden of rare sarcomere gene variants in the Framingham and Jackson Heart Study cohorts. *Am J Hum Genet*. 2012 Sep 7;91(3):513–9.

54. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 31;65(12):1249–54.
55. Eberly LA, Day SM, Ashley EA, Jacoby DL, Jefferies JL, Colan SD, et al. Association of Race With Disease Expression and Clinical Outcomes Among Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAMA Cardiol*. 2020 Jan 1;5(1):83–91.
56. Maron BA, Wang RS, Carnethon MR, Rowin EJ, Loscalzo J, Maron BJ, et al. What Causes Hypertrophic Cardiomyopathy? *The American Journal of Cardiology*. 2022 Sep;179:74–82.
57. Muresan ID, Agoston-Coldea L. Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy: genetics, clinics, and modular imaging. *Heart Fail Rev*. 2021 Sep;26(5):1023–36.
58. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure: A Contemporary Perspective. *Circ Res*. 2021 May 14;128(10):1421–34.
59. Hensley N, Dietrich J, Nyhan D, Mitter N, Yee MS, Brady M. Hypertrophic cardiomyopathy: a review. *Anesth Analg*. 2015 Mar;120(3):554–69.
60. Vilcant V, Hai O. Left Ventricular Outflow Tract Obstruction. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Oct 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470446/>
61. Mathai S, Williams L. Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy and the impact of mavacamten. *Ther Adv Chronic Dis*. 2022;13:20406223221136074.
62. Rakowski H, Carasso S. Quantifying Diastolic Function in Hypertrophic Cardiomyopathy: The Ongoing Search for the Holy Grail. *Circulation*. 2007 Dec 4;116(23):2662–5.
63. Nagueh SF. Left Ventricular Diastolic Function: Understanding Pathophysiology, Diagnosis, and Prognosis With Echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020 Jan;13(1 Pt 2):228–44.
64. Raphael CE, Cooper R, Parker KH, Collinson J, Vassiliou V, Pennell DJ, et al. Mechanisms of Myocardial Ischemia in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016 Oct;68(15):1651–60.
65. Stroumpoulis KI, Pantazopoulos IN, Xanthos TT. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *World J Cardiol*. 2010 Sep 26;2(9):289–98.
66. O'Mahony C, Elliott P, McKenna W. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Apr;6(2):443–51.
67. Elliott P. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: time to change the narrative. *European Heart Journal*. 2021 Oct 7;42(38):3945–7.
68. Maron BJ, Ommen SR, Semsarian C, Spirito P, Olivotto I, Maron MS. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 Jul;64(1):83–99.

69. Wolf CM. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics and clinical perspectives. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2019 Oct;9(Suppl 2):S388–415.
70. Geske JB, Ommen SR, Gersh BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC: Heart Failure*. 2018 May;6(5):364–75.
71. Hecht GM, Panza JA, Maron BJ. Clinical course of middle-aged asymptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*. 1992 Apr;69(9):935–40.
72. Villafane J, Miller JR, Glickstein J, Johnson JN, Wagner J, Snyder CS, et al. Loss of Consciousness in the Young Child. *Pediatr Cardiol*. 2021 Feb;42(2):234–54.
73. D’Ascenzi F, Zorzi A, Sciacaluga C, Berrettini U, Mondillo S, Brignole M. Syncope in the Young Adult and in the Athlete: Causes and Clinical Work-up to Exclude a Life-Threatening Cardiac Disease. *J of Cardiovasc Trans Res*. 2020 Jun;13(3):322–30.
74. Baliga RR, Eagle KA, editors. *Practical Cardiology: Evaluation and Treatment of Common Cardiovascular Disorders* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2024 Oct 14]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-28328-5>
75. Nishimura RA, Ommen SR, Tajik AJ. Cardiology patient page. Hypertrophic cardiomyopathy: a patient perspective. *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):e133-135.
76. Maron BJ, Desai MY, Nishimura RA, Spirito P, Rakowski H, Towbin JA, et al. Diagnosis and Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2022 Feb;79(4):372–89.
77. Ommen SR, Mital S, Burke MA, Day SM, Deswal A, Elliott P, et al. 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2020 Dec 22;142(25):e558–631.
78. Mandeş L, Roşca M, Ciupercă D, Popescu BA. The role of echocardiography for diagnosis and prognostic stratification in hypertrophic cardiomyopathy. *J Echocardiogr*. 2020 Sep;18(3):137–48.
79. Hoorman R, Schinkel AFL, Van Der Velde N, Bowen DJ, Menting ME, Van Den Bosch AE, et al. Effect of body surface area and gender on wall thickness thresholds in hypertrophic cardiomyopathy. *Neth Heart J*. 2020 Jan;28(1):37–43.
80. Bakaya K, Paracha W, Schievano S, Bozkurt S. Assessment of cardiac dimensions in children diagnosed with hypertrophic cardiomyopathy. *Echocardiography*. 2022 Sep;39(9):1233–9.
81. Finocchiaro G, Sheikh N, Biagini E, Papadakis M, Maurizi N, Sinagra G, et al. The electrocardiogram in the diagnosis and management of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2020 Jan;17(1):142–51.

82. Farahani NZ, Aguirre MA, Karlinski Vizentin V, Enayati M, Bos JM, Medina AP, et al. Echocardiographic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy by Machine Learning. *Mayo Clinic Proceedings: Digital Health*. 2024 Dec;2(4):564–73.
83. the Working Group of Echocardiography of the Italian Society of Cardiology, Losi MA, Nistri S, Galderisi M, Betocchi S, Cecchi F, et al. Echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy: usefulness of old and new techniques in the diagnosis and pathophysiological assessment. *Cardiovasc Ultrasound*. 2010 Dec;8(1):7.
84. Du D, Li COY, Ong K, Parsa A, Weissler-Snir A, Geske JB, et al. Arrhythmia Monitoring for Risk Stratification in Hypertrophic Cardiomyopathy. *CJC Open*. 2022 Apr;4(4):406–15.
85. Salerno M, Sharif B, Arheden H, Kumar A, Axel L, Li D, et al. Recent Advances in Cardiovascular Magnetic Resonance: Techniques and Applications. *Circ: Cardiovascular Imaging*. 2017 Jun;10(6):e003951.
86. Hong Y, Su WW, Li X. Risk factors of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *Current Opinion in Cardiology*. 2022 Jan;37(1):15–21.
87. Authors/Task Force members, Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014 Oct 14;35(39):2733–79.
88. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* [Internet]. 2022 May 3 [cited 2024 Nov 15];145(18). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000001063>
89. Dekkerlegand J. Congestive Heart Failure. In: *Physical Rehabilitation* [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2024 Nov 17]. p. 669–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780721603612500284>
90. Hutt E, Desai MY. Medical Treatment Strategies for Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*. 2024 Feb;212:S33–41.
91. Maron BJ, Olivotto I, Bellone P, Conte MR, Cecchi F, Flygenring BP, et al. Clinical profile of stroke in 900 patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002 Jan;39(2):301–7.
92. Houston BA, Stevens GR. Hypertrophic cardiomyopathy: a review. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014;8(Suppl 1):53–65.
93. Ammirati E, Contri R, Coppini R, Cecchi F, Frigerio M, Olivotto I. Pharmacological treatment of hypertrophic cardiomyopathy: current practice and novel perspectives. *Eur J Heart Fail*. 2016 Sep;18(9):1106–18.

94. Vrablik M, Dlouha D, Todorovova V, Stefler D, Hubacek JA. Genetics of Cardiovascular Disease: How Far Are We from Personalized CVD Risk Prediction and Management? *IJMS*. 2021 Apr 17;22(8):4182.
95. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *IJMS*. 2018 Nov 1;19(11):3426.
96. Bonaventura J, Polakova E, Vejtasova V, Veselka J. Genetic Testing in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *IJMS*. 2021 Sep 27;22(19):10401.
97. Borrelli F, Losi M, Canciello G, Todde G, Perillo E, Ordine L, et al. Sarcomeric versus Non-Sarcomeric HCM. *Cardiogenetics*. 2023 Jun 2;13(2):92–105.
98. Walsh R, Buchan R, Wilk A, John S, Felkin LE, Thomson KL, et al. Defining the genetic architecture of hypertrophic cardiomyopathy: re-evaluating the role of non-sarcomeric genes. *Eur Heart J*. 2017 Jan 11;ehw603.
99. Tuohy CV, Kaul S, Song HK, Nazer B, Heitner SB. Hypertrophic cardiomyopathy: the future of treatment. *European J of Heart Fail*. 2020 Feb;22(2):228–40.
100. Ireland CG, Ho CY. Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*. 2024 Jan;S0002914923011670.
101. Mattos BPE. Genetic Bases of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2002 Mar [cited 2024 Nov 9];78(3). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2002000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=en
102. Theodorakis CW. Mutagenesis. In: *Encyclopedia of Ecology* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2024 Nov 27]. p. 2475–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080454054004080>
103. Carrier L, Mearini G, Stathopoulou K, Cuello F. Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene*. 2015 Dec;573(2):188–97.
104. Tudurachi BS, Zăvoi A, Leonte A, Țăpoi L, Ureche C, Bîrgoan SG, et al. An Update on MYBPC3 Gene Mutation in Hypertrophic Cardiomyopathy. *IJMS*. 2023 Jun 22;24(13):10510.
105. Glavaški M, Velicki L, Vučinić N. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetic Foundations, Outcomes, Interconnections, and Their Modifiers. *Medicina*. 2023 Aug 4;59(8):1424.
106. Torgerson T, Ochs H. Genetics of Primary Immune Deficiencies. In: *Stiehm's Immune Deficiencies* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2024 Nov 9]. p. 73–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124055469000030>
107. Genetic Alliance, The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. *Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals* [Internet]. Washington (DC): Genetic Alliance; 2009

- [cited 2024 Nov 9]. (Genetic Alliance Monographs and Guides). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115563/>
108. Green DR. Cell Death in Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 May 17;14(4):a041095.
 109. Lee E, Song CH, Bae SJ, Ha KT, Karki R. Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis. *Exp Mol Med.* 2023 Aug;55(8):1632–43.
 110. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3–11.
 111. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486–541.
 112. Hajibabaei F, Abedpoor N, Mohamadynejad P. Types of Cell Death from a Molecular Perspective. *Biology (Basel).* 2023 Nov 13;12(11):1426.
 113. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495–516.
 114. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis.* 2022 Aug;27(7–8):482–508.
 115. Ray SD, Mehendale HM. Apoptosis. In: *Encyclopedia of Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2024 Dec 1]. p. 153–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123694000000831>
 116. Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero M del C, Flores-Morelos DS, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez AM, et al. Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells.* 2022 Jul 22;11(15):2262.
 117. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis.* 2023 Oct 4;14(10):648.
 118. Proskuryakov SYa, Gabai VL, Konoplyannikov AG. [No title found]. *Biochemistry (Moscow).* 2002;67(4):387–408.
 119. Zhu X, Li S. Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in Gastrointestinal Cancers: The Chief Culprits of Tumor Progression and Drug Resistance. *Advanced Science.* 2023 Sep;10(26):2300824.
 120. Tang D, Kang R. Cell death. In: *Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development* [Internet]. Elsevier; 2022 [cited 2024 Oct 15]. p. 47–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128142080000038>

121. Green DR. Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 Mar;14(3):a041012.
122. Yadav P, Yadav R, Jain S, Vaidya A. Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. *Chem Biol Drug Des.* 2021 Jul;98(1):144–65.
123. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2013 Apr 1;5(4):a008656–a008656.
124. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021 May;18(5):1106–21.
125. Yanumula A, Cusick JK. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 May 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560811/>
126. Jan R, Chaudhry GES. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019 Jun;9(2):205–18.
127. Al-Aamri HM, Irving HR, Bradley C, Meehan-Andrews T. Intrinsic and extrinsic apoptosis responses in leukaemia cells following daunorubicin treatment. *BMC Cancer.* 2021 Apr 21;21(1):438.
128. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, et al. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 24;20(17):4133.
129. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Pathophysiology of Cancer Cell Death. In: Abeloff's Clinical Oncology [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2024 Dec 1]. p. 69-77.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781455728657000059>
130. Carpenter R, Brady MF. BAX Gene. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Sep 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555927/>
131. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, et al. Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem.* 2016 Apr;35(2):150–7.
132. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart — A critical review from definition and classification of cell death. *International Journal of Cardiology.* 2013 Sep;167(6):2373–86.
133. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2020 May 14;2020:1–29.
134. Yang B, Ye D, Wang Y. Caspase-3 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2013 Mar;17(3):255–63.

135. Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Bianchi M, Rovesti M, Roccia MG. Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Front Immunol*. 2018 Sep 6;9:2031.
136. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17;72(1):19–44.
137. Lee Y, Gustafsson ÅB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):536–48.
138. Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Biores Open Access*. 2020;9(1):121–36.
139. Cui B, Zheng Y, Sun L, Shi T, Shi Z, Wang L, et al. Heart Regeneration in Adult Mammals after Myocardial Damage. *Acta Cardiol Sin*. 2018 Mar;34(2):115–23.
140. Gong R, Jiang Z, Zagidullin N, Liu T, Cai B. Regulation of cardiomyocyte fate plasticity: a key strategy for cardiac regeneration. *Sig Transduct Target Ther*. 2021 Jan 27;6(1):31.
141. Weber KT, Janicki JS. The metabolic demand and oxygen supply of the heart: Physiologic and clinical considerations. *The American Journal of Cardiology*. 1979 Oct;44(4):722–9.
142. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011 Apr;50(7):777–93.
143. Niestrawska JA, Augustin CM, Plank G. Computational modeling of cardiac growth and remodeling in pressure overloaded hearts—Linking microstructure to organ phenotype. *Acta Biomaterialia*. 2020 Apr;106:34–53.
144. Killilea DW, Killilea AN. Mineral requirements for mitochondrial function: A connection to redox balance and cellular differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022 Mar;182:182–91.
145. De Almeida AJPO, De Oliveira JCPL, Da Silva Pontes LV, De Souza Júnior JF, Gonçalves TAF, Dantas SH, et al. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. Giustarini D, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022 Oct 19;2022:1–23.
146. Rahaman MdM, Hossain R, Herrera-Bravo J, Islam MT, Atolani O, Adeyemi OS, et al. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. *Food Science & Nutrition*. 2023 Apr;11(4):1657–70.
147. Jin S, Kang PM. A Systematic Review on Advances in Management of Oxidative Stress-Associated Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*. 2024 Jul 29;13(8):923.
148. Fariás JG, Molina VM, Carrasco RA, Zepeda AB, Figueroa E, Letelier P, et al. Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. *Nutrients*. 2017 Sep 1;9(9):966.

149. Tanasković I. Cirkulatorni sistem. U: Histologija – tekst i atlas. Niš: Galaksijanis; 2021. 176-190. p.
150. Tanasković I. Cirkulatorni sistem. U: Histologija. Prvo izdanje. Galaksijanis; 2009. 137–150 p.
151. Towbin JA, Jefferies JL, Ryan TD. Pathophysiology of Cardiomyopathies. In: Fetal and Neonatal Physiology [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2024 Nov 23]. p. 1563-1575.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323352147001542>
152. Jia X, He X, Huang C, Li J, Dong Z, Liu K. Protein translation: biological processes and therapeutic strategies for human diseases. *Sig Transduct Target Ther*. 2024 Feb 23;9(1):44.
153. Singh KP, Miaskowski C, Dhruva AA, Flowers E, Kober KM. Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological Research For Nursing*. 2018 Jul;20(4):369–82.
154. Sitinjak BDP, Murdaya N, Rachman TA, Zakiyah N, Barliana MI. The Potential of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) as Biomarkers and Their Association with the Increased Risk of Coronary Heart Disease: A Systematic Review. *VHRM*. 2023 May;Volume 19:289–301.
155. Mitsis T, Efthimiadou A, Bacopoulou F, Vlachakis D, Chrousos G, Eliopoulos E. Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Acad Sci J* [Internet]. 2020 Jan 17 [cited 2024 Nov 23]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/wasj.2020.32>
156. Tan PK. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Research*. 2003 Oct 1;31(19):5676–84.
157. Antontseva EV, Degtyareva AO, Korbolina EE, Damarov IS, Merkulova TI. Human-genome single nucleotide polymorphisms affecting transcription factor binding and their role in pathogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektcii*. 2023 Oct;27(6):662–75.
158. Ostojic N, Radevic T, Kandolf Sekulovic L, Djordjevic B, Jaukovic L, Stepic N, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 3 and 4 genes as prognostic and outcome biomarkers in melanoma patients. *Melanoma Research* [Internet]. 2022 Jul 19 [cited 2024 Nov 23]; Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/CMR.0000000000000836>
159. Dymond JS. Explanatory Chapter. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2024 Nov 23]. p. 279–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124186873000239>
160. Kaul V, Enslin S, Gross SA. History of artificial intelligence in medicine. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2020 Oct;92(4):807–12.
161. Briganti G, Le Moine O. Artificial Intelligence in Medicine: Today and Tomorrow. *Front Med*. 2020 Feb 5;7:27.

162. Quazi S. Artificial intelligence and machine learning in precision and genomic medicine. *Med Oncol*. 2022 Jun 15;39(8):120.
163. Thomas B. Artificial Intelligence: Review of Current and Future Applications in Medicine. *Federal Practitioner* [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 2024 Nov 4];(38 (11)). Available from: <https://www.mdedge.com/fedprac/article/248362/mixed-topics/artificial-intelligence-review-current-and-future-applications>
164. Krittanawong C, Zhang H, Wang Z, Aydar M, Kitai T. Artificial Intelligence in Precision Cardiovascular Medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2017 May 30;69(21):2657–64.
165. Pirooznia M, Yang JY, Yang MQ, Deng Y. A comparative study of different machine learning methods on microarray gene expression data. *BMC Genomics*. 2008 Mar;9(S1):S13.
166. Kathiresan S, Srivastava D. Genetics of Human Cardiovascular Disease. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1242–57.
167. Henriksen P. Application of gene expression profiling to cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2002 Apr;54(1):16–24.
168. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med*. 2012;63:35–61.
169. Institute of Medicine (US) Committee on Assessing Interactions Among Social, Behavioral, and Genetic Factors in Health. *Genes, Behavior, and the Social Environment: Moving Beyond the Nature/Nurture Debate* [Internet]. Hernandez LM, Blazer DG, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2006 [cited 2024 Nov 4]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19929/>
170. Vakili D, Radenkovic D, Chawla S, Bhatt DL. Panomics: New Databases for Advancing Cardiology. *Front Cardiovasc Med*. 2021 May 10;8:587768.
171. Phillips KA, Trosman JR, Kelley RK, Pletcher MJ, Douglas MP, Weldon CB. Genomic Sequencing: Assessing The Health Care System, Policy, And Big-Data Implications. *Health Affairs*. 2014 Jul;33(7):1246–53.
172. Sammani A, Baas AF, Asselbergs FW, Te Riele ASJM. Diagnosis and Risk Prediction of Dilated Cardiomyopathy in the Era of Big Data and Genomics. *JCM*. 2021 Feb 26;10(5):921.
173. Wooden B, Goossens N, Hoshida Y, Friedman SL. Using Big Data to Discover Diagnostics and Therapeutics for Gastrointestinal and Liver Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Jan;152(1):53-67.e3.
174. Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus Database. In: Mathé E, Davis S, editors. *Statistical Genomics* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [cited 2024 Nov 19]. p. 93–110. (Methods in Molecular Biology; vol. 1418). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3578-9_5

175. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*. 2012 Nov 26;41(D1):D991–5.
176. Michelhaugh SA, Januzzi JL. Using Artificial Intelligence to Better Predict and Develop Biomarkers. *Heart Failure Clinics*. 2022 Apr;18(2):275–85.
177. Bashiri A, Ghazisaeedi M, Safdari R, Shahmoradi L, Ehtesham H. Improving the Prediction of Survival in Cancer Patients by Using Machine Learning Techniques: Experience of Gene Expression Data: A Narrative Review. *Iran J Public Health*. 2017 Feb;46(2):165–72.
178. Pičulin M, Smole T, Žunkovič B, Kokalj E, Robnik-Šikonja M, Kukar M, et al. Disease Progression of Hypertrophic Cardiomyopathy: Modeling Using Machine Learning. *JMIR Med Inform*. 2022 Feb 2;10(2):e30483.
179. Dilsizian SE, Siegel EL. Artificial Intelligence in Medicine and Cardiac Imaging: Harnessing Big Data and Advanced Computing to Provide Personalized Medical Diagnosis and Treatment. *Curr Cardiol Rep*. 2014 Jan;16(1):441.
180. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156–9.
181. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
182. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
183. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
184. Höller V, Seebacher H, Zach D, Schwegel N, Ablasser K, Kolesnik E, et al. Myocardial Deformation Analysis in MYBPC3 and MYH7 Related Sarcomeric Hypertrophic Cardiomyopathy-The Graz Hypertrophic Cardiomyopathy Registry. *Genes (Basel)*. 2021 Sep 23;12(10):1469.
185. García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Álvarez V, Alonso B, et al. Mutations in Sarcomeric Genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2009 Jan;62(1):48–56.
186. Shen CH. Amplification of Nucleic Acids. In: *Diagnostic Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2024 Dec 2]. p. 215–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028230000092>
187. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005 Sep;29(3):151–9.

188. Jordà P, García-Álvarez A. Hypertrophic cardiomyopathy: Sudden cardiac death risk stratification in adults. *gcsp* [Internet]. 2018 Oct 24 [cited 2024 Nov 11];2018(3). Available from: <https://globalcardiologyscienceandpractice.com/index.php/gcsp/article/view/335>
189. Lakdawala NK, Olivotto I, Day SM, Han L, Ashley EA, Michels M, et al. Associations Between Female Sex, Sarcomere Variants, and Clinical Outcomes in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ: Genomic and Precision Medicine*. 2021 Feb;14(1):e003062.
190. Kim M, Kim B, Choi YJ, Lee HJ, Lee H, Park JB, et al. Sex differences in the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2021 Mar 1;11(1):4854.
191. Rowin EJ, Maron MS, Wells S, Patel PP, Koethe BC, Maron BJ. Impact of Sex on Clinical Course and Survival in the Contemporary Treatment Era for Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAHA*. 2019 Nov 5;8(21):e012041.
192. Garate-Carrillo A, Gonzalez J, Ceballos G, Ramirez-Sanchez I, Villarreal F. Sex related differences in the pathogenesis of organ fibrosis. *Translational Research*. 2020 Aug;222:41–55.
193. Sado DM, Iqbal J. Hypertrophic cardiomyopathy in older patients. *Clin Med (Lond)*. 2010 Apr;10(2):196–8.
194. Del Rio-Pertuz G, Sethi P, Swaminath D, Argueta-Sosa E. Hypertrophic Cardiomyopathy in the Elderly: A Case Identified With Genetic Screening. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2022;10:23247096221109204.
195. Tian F, Chen L, Qian ZM, Xia H, Zhang Z, Zhang J, et al. Ranking age-specific modifiable risk factors for cardiovascular disease and mortality: evidence from a population-based longitudinal study. *EClinicalMedicine*. 2023 Oct;64:102230.
196. Louie EK, Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy with extreme increase in left ventricular wall thickness: Functional and morphologic features and clinical significance. *Journal of the American College of Cardiology*. 1986 Jul;8(1):57–65.
197. Sun D, Schaff HV, Nishimura RA, Geske JB, Dearani JA, Ducharme MT, et al. Posterior Wall Thickness Associates With Survival Following Septal Myectomy for Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC: Heart Failure*. 2022 Nov;10(11):831–7.
198. Bouzas-Mosquera A, Brouillon FJ, Alvarez-Garcia N, Mendez E, Peteiro J, Gandara-Sambade T, et al. Left atrial size and risk for all-cause mortality and ischemic stroke. *Canadian Medical Association Journal*. 2011 Jul 12;183(10):E657–64.
199. Huusko J, Purmonen T, Toppila I, Lassenius M, Ukkonen H. Real-world clinical diagnostics of heart failure patients with reduced or preserved ejection fraction. *ESC Heart Fail*. 2020 Jun;7(3):1039–48.
200. Minami Y, Haruki S, Kanbayashi K, Maeda R, Itani R, Hagiwara N. B-type natriuretic peptide and risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2018 Oct;15(10):1484–90.

201. Weber M. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart*. 2005 Oct 26;92(6):843–9.
202. Hamada M, Shigematsu Y, Ohtani T, Ikeda S. Elevated Cardiac Enzymes in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients With Heart Failure – A 20-Year Prospective Follow-up Study –. *Circ J*. 2016;80(1):218–26.
203. Hładij R, Rajtar-Salwa R, Dimitrow PP. Troponin as ischemic biomarker is related with all three echocardiographic risk factors for sudden death in hypertrophic cardiomyopathy (ESC Guidelines 2014). *Cardiovasc Ultrasound*. 2017 Dec;15(1):24.
204. Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. Origin of Cardiomyocytes in the Adult Heart. *Circulation Research*. 2015 Jan 2;116(1):150–66.
205. Kaur N, Ruiz-Velasco A, Raja R, Howell G, Miller JM, Abouleisa RRE, et al. Paracrine signal emanating from stressed cardiomyocytes aggravates inflammatory microenvironment in diabetic cardiomyopathy. *iScience*. 2022 Mar;25(3):103973.
206. Korshunova AY, Blagonravov ML, Neborak EV, Syatkin SP, Sklifasovskaya AP, Semyatov SM, et al. BCL2-regulated apoptotic process in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Jan;47(1):23–36.
207. Latif N, Khan MA, Birks E, O’Farrell A, Westbrook J, Dunn MJ, et al. Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000 Jun;35(7):1769–77.
208. Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O’Neill L, et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1997 Jun 1;99(11):2635–43.
209. Cai K, Jiang H, Zou Y, Song C, Cao K, Chen S, et al. Programmed death of cardiomyocytes in cardiovascular disease and new therapeutic approaches. *Pharmacological Research*. 2024 Aug;206:107281.
210. Yang Y, Duan W, Jin Z, Yi W, Yan J, Zhang S, et al. JAK 2/ STAT 3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pineal Research*. 2013 Oct;55(3):275–86.
211. Ma N, Bai J, Zhang W, Luo H, Zhang X, Liu D, et al. Trimetazidine protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via effects on cardiac miRNA-21 expression, Akt and the Bcl-2/Bax pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2016 Nov;14(5):4216–22.
212. Li J, Feng X, Wei X. Modeling hypertrophic cardiomyopathy with human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Dec;13(1):232.
213. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, Baldi M, Will ML, Baldini K, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 6;55(14):1444–53.

214. Basit H, Alahmadi MH, Rout P, Sharma S. Hypertrophic Cardiomyopathy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Sep 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430788/>
215. Writing Committee Members, Ommen SR, Mital S, Burke MA, Day SM, Deswal A, et al. 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2024 May 19];142(25). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000937>
216. Maron BJ. Clinical Course and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2018 Aug 16;379(7):655–68.
217. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jul;60(7):1376–93.
218. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4298–309.
219. Krick S, Eul BG, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):395–403.
220. Hölscher M, Schäfer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovascular Research*. 2012 Apr 1;94(1):77–86.
221. Luo JY, Liu F, Fang BB, Tian T, Li YH, Zhang T, et al. NFKB1 Gene Mutant Was Associated with Prognosis of Coronary Artery Disease and Exacerbated Endothelial Mitochondrial Fission and Dysfunction. Alvarez S, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022 Oct 22;2022:1–13.
222. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF- κ B in the Heart: To Be or Not to NF- κ B. *Circulation Research*. 2011 Apr 29;108(9):1122–32.
223. Cheng P pei, Wang X ting, Liu Q, Hu Y ran, Dai E rui, Zhang M hao, et al. Nrf2 mediated signaling axis in heart failure: Potential pharmacological receptor. *Pharmacological Research*. 2024 Aug;206:107268.
224. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004 May;36(10):1199–207.
225. Satta S, Mahmoud AM, Wilkinson FL, Yvonne Alexander M, White SJ. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. Hrelia S, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017 Jan;2017(1):9237263.
226. Simeunovic D, Odanovic N, Pljesa-Ercegovac M, Radic T, Radovanovic S, Coric V, et al. Glutathione Transferase P1 Polymorphism Might Be a Risk Determinant in Heart Failure. *Dis Markers*. 2019;2019:6984845.

227. Lee D, Xu IM, Chiu DK, Leibold J, Tse AP, Bao MH, et al. Induction of Oxidative Stress Through Inhibition of Thioredoxin Reductase 1 Is an Effective Therapeutic Approach for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2019 Apr;69(4):1768–86.
228. Hsieh J, Becklin KL, Givens S, Komosa ER, Lloréns JEA, Kamdar F, et al. Myosin Heavy Chain Converter Domain Mutations Drive Early-Stage Changes in Extracellular Matrix Dynamics in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jun 16;10:894635.
229. Gacita AM, Fullenkamp DE, Ohiri J, Pottinger T, Puckelwartz MJ, Nobrega MA, et al. Genetic Variation in Enhancers Modifies Cardiomyopathy Gene Expression and Progression. *Circulation*. 2021 Mar 30;143(13):1302–16.
230. Kraft T, Montag J, Radocaj A, Brenner B. Hypertrophic Cardiomyopathy: Cell-to-Cell Imbalance in Gene Expression and Contraction Force as Trigger for Disease Phenotype Development. *Circulation Research*. 2016 Oct 14;119(9):992–5.
231. Manivannan SN, Darouich S, Masmoudi A, Gordon D, Zender G, Han Z, et al. Novel frameshift variant in MYL2 reveals molecular differences between dominant and recessive forms of hypertrophic cardiomyopathy. Firulli AB, editor. *PLoS Genet*. 2020 May 26;16(5):e1008639.
232. Parbhudayal RY, Garra AR, Götte MJW, Michels M, Pei J, Harakalova M, et al. Variable cardiac myosin binding protein-C expression in the myofilaments due to MYBPC3 mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018 Oct;123:59–63.
233. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac Myosin Binding Protein C: Its Role in Physiology and Disease. *Circulation Research*. 2004 May 28;94(10):1279–89.
234. Pham JH, Giudicessi JR, Tweet MS, Boucher L, Newman DB, Geske JB. Tale of two hearts: a TNNT2 hypertrophic cardiomyopathy case report. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Apr 27;10:1167256.
235. Smyth P, Sasiwachirangkul J, Williams R, Scott CJ. Cathepsin S (CTSS) activity in health and disease - A treasure trove of untapped clinical potential. *Molecular Aspects of Medicine*. 2022 Dec;88:101106.
236. Lim DS, Roberts R, Marian AJ. Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 Oct;38(4):1175–80.
237. Hautala N. The mechanisms involved in the activation of transcription factors and BNP gene expression in loaded heart. University of Oulu;
238. Preuss UW, Wurst FM, Ridinger M, Rujescu D, Fehr C, Koller G, et al. Association of functional DBH genetic variants with alcohol dependence risk and related depression and suicide attempt phenotypes: Results from a large multicenter association study. *Drug and Alcohol Dependence*. 2013 Dec;133(2):459–67.

239. Abramovs N, Brass A, Tassabehji M. Hardy-Weinberg Equilibrium in the Large Scale Genomic Sequencing Era. *Front Genet.* 2020;11:210.
240. Yousaf M, Khan WA, Shahzad K, Khan HN, Ali B, Hussain M, et al. Genetic Association of Beta-Myosin Heavy-Chain Gene (MYH7) with Cardiac Dysfunction. *Genes.* 2022 Aug 29;13(9):1554.
241. Ferradini V, Parca L, Martino A, Lanzillo C, Silvetti E, Calò L, et al. Variants in MYH7 Gene Cause Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Genes.* 2021 May 22;12(6):793.
242. Helms AS, Tang VT, O’Leary TS, Friedline S, Wauchope M, Arora A, et al. Effects of MYBPC3 loss-of-function mutations preceding hypertrophic cardiomyopathy. *JCI Insight.* 2020 Jan 30;5(2):e133782.
243. Tripathi YM, Chatla SB, Chang YCI, Huang LS, Shieh GS. A nonlinear correlation measure with applications to gene expression data. Ragusa MA, editor. *PLoS ONE.* 2022 Jun 21;17(6):e0270270.
244. De Siqueira Santos S, Takahashi DY, Nakata A, Fujita A. A comparative study of statistical methods used to identify dependencies between gene expression signals. *Briefings in Bioinformatics.* 2014 Nov 1;15(6):906–18.
245. Leppink J, Winston K, O’Sullivan P. Statistical significance does not imply a real effect. *Perspect Med Educ.* 2016 Mar 16;5(2):122–4.
246. Hassan M, Awan FM, Naz A, deAndrés-Galiana EJ, Alvarez O, Cernea A, et al. Innovations in Genomics and Big Data Analytics for Personalized Medicine and Health Care: A Review. *IJMS.* 2022 Apr 22;23(9):4645.
247. Cao Z, Jia Y, Zhu B. BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine. *IJMS.* 2019 Apr 12;20(8):1820.
248. Kobayashi S, Sakai Y, Taguchi I, Utsunomiya H, Shiota T. Causes of an increased pressure gradient through the left ventricular outflow tract: a West Coast experience. *J Echocardiogr.* 2018 Mar;16(1):34–41.
249. Kim D, Seo J, Cho I, Hong G, Ha J, Shim CY. Prognostic Implication of Mitral Valve Disease and Its Progression in East Asian Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAHA.* 2023 Feb 7;12(3):e024792.
250. Gibbons FD, Roth FP. Judging the Quality of Gene Expression-Based Clustering Methods Using Gene Annotation. *Genome Res.* 2002 Oct 1;12(10):1574–81.
251. Chiarito M, Luceri L, Oliva A, Stefanini G, Condorelli G. Artificial Intelligence and Cardiovascular Risk Prediction: All That Glitters is not Gold. *Eur Cardiol.* 2022 Dec 20;17:e29.
252. Krittanawong C, Johnson KW, Choi E, Kaplin S, Venner E, Murugan M, et al. Artificial Intelligence and Cardiovascular Genetics. *Life.* 2022 Feb 14;12(2):279.

253. Das K J, Ingles J, Bagnall RD, Semsarian C. Determining pathogenicity of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy: importance of periodic reassessment. *Genetics in Medicine*. 2014 Apr;16(4):286–93.

БИОГРАФИЈА

Јелена Н. Павић рођена је 13. септембра 1993. године у Ћуприји, Република Србија. Основне академске студије биологије завршила је 2016. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, са просечном оценом 9,25. Мастер академске студије биологије завршила је 2017. године на истом факултету са просечном оценом 9,63 и стекла звање мастер биолог. Школске 2019/2020. године уписала је мастер академске студије из области биоинжењеринга на Факултету инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу, које је завршила 2021. године са просечном оценом 10,00, стичући звање мастер инжењера биомедицинског инжењерства. Докторске академске студије, смер биоинжењеринг, на Факултету инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је 2021. године. Тренутно је истраживач сарадник у Лабораторији за биоинформатику и примењену биологију Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу, где је запослена од 2019. године. Године 2019. боравила је на усавршавању на Катедри за експерименталну и клиничку медицину Универзитета у Фиренци, Италија. Такође, 2020. године похађала је Зимску школу протеомике у Београду, под називом „Proteomics: From sample preparation to practical aspects“, организовану од стране Хемијског факултета Универзитета у Београду и пројекта FoodEnTwin у оквиру програма Horizon 2020.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ТЕНА УКЉУЧЕНИХ У
АПОПТОЗУ, РЕДОКС СТАТУСА И ПАТОГЕНЕЗУ НА
ТИП КАРДИОМИОПАТИЈЕ“

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

у КРАГУЈЕВЦУ, 10.12.2024 године,

Јелена Павић
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У АПОПТОЗУ,
РЕДОКС СТАТУСА И ПАТОГЕНЕЗУ НА ТИП
КАРДИОМИОПАТИЈЕ“

истоветне.

у КРАГУЈЕВЦУ, 10.12.2024 године,

Јелена Павић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, ЈЕЛЕНА ПАВИЋ,



дозвољавам



не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У
АПОПТОЗУ, РЕДОКС СТАТУСА И ПАТОГЕНЕЗУ НА
ТИП КАРДИОМИОПАТИЈЕ⁶⁶

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 10.12.2024 године,

Јелена Табић
потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>