



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET



Nina Marić

**ULOGA MATRIKS METALOPROTEINAZA 2 I 9 I TKIVNIH
INHIBITORA MATRIKS METALOPROTEINAZA 1 I 2 KOD
DJECE SA VENTRIKULARNIM SEPTALNIM DEFEKTOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2022.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Nina Marić

**ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 AND TISSUE
INHIBITORS OF MATRIX METALLOPROTEINASES 1 AND 2 IN
CHILDREN WITH VENTRICULAR SEPTAL DEFECT**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2022

Mentor: Prof. dr sc. med. Ines Mrakovčić-Šutić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Komentor: Prof. dr sc. med. Jelica Predojević Samardžić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije: Uloga matriks metaloproteinaza 2 i 9 i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza 1 i 2 kod djece sa ventrikularnim septalnim defektom

REZIME

Uvod: Ventrikularni septalni defekt (VSD) je druga najčešća kongenitalna srčana anomalija koja se u velikom broju slučajeva spontano zatvori u prvim godinama života. U manjem broju slučajeva može biti praćena ozbiljnim komplikacijama zbog čega je od velike važnosti utvrditi markere koji bi mogli pomoći u predviđanju njenog toka. Etiologija i patofiziologija ove anomalije još uvijek nisu u potpunosti istraženi, a saznanja o ulozi matriks metaloproteinaza (MMP) i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP) u procesima cijepanja ekstracelularnog matriksa, bila su povod da se ispita njihova uloga u fiziološkoj i patološkoj kardiogenezi. U do sada urađenim istraživanjima na ovu temu, vršeno je određivanje koncentracije MMP-a i TIMP-a u krvi. Ovo je prva studija koja je za ispitivanje njihove uloge u kongenitalnim srčanim anomalijama koristila urin ispitanika. Cilj je bio ispitati ulogu MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u etiopatofiziologiji VSD.

Ispitanici i metode: Istraživanje je predstavljalo prospektivnu studiju koja je uključivala pedeset dvoje djece sa izolovanim VSD-om i dvadesetoro zdrave djece uzrasta do godinu dana. MMP-e i TIMP-a određivani su iz uzorka urina *ELISA* metodom.

Rezultati: Utvrđeno je da su koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 povišene kod djece sa VSD-om i da postoji pozitivna korelacija njihovih koncentracija, posebno visoka u slučaju MMP-9 i TIMP-1, i veličine defekta. Za MMP-9 utvrdili smo da je njena koncentracija u urinu viša u slučajevima u kojima se defekt nije zatvorio u odnosu na slučajeve u kojima se on spontano zatvorio u prvoj godini.

Zaključak: Naši rezultati ukazuju na ulogu MMP-2, MMP-9 i njihovih tkivnih inhibitora 1 i 2 u etiopatogenezi VSD-a i da bi njihove koncentracije u urinu, naročito koncentracije MMP-9 i TIMP-1, u kombinaciji sa ehokardiografskim i kliničkim praćenjem, mogle služiti u predikciji spontanog toka bolesti.

Ključne riječi: matriks metaloproteinaza, tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza, ventrikularni septalni defekt, urin

Naučna oblast: Pedijatrija

Naučno polje: Medicina

Klasifikaciona oznaka prema CERIF šifrarniku za naučnu oblast: B660

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima (CC BY-NC)

Mentor: Ines Mrakovčić-Šutić, MD, PhD, full professor, Faculty of Medicine, University of Rijeka

Co-mentor: Jelica Predojević Samardžić, MD, PhD, full professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Title of the doctoral dissertation: Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 in children with ventricular septal defect

SUMMARY

Introduction: Ventricular septal defect (VSD) is the second most common congenital heart anomaly, which in many cases closes spontaneously in the first years of life. In a small number of cases, it can be accompanied by serious complications, which is why it is very important to identify markers that could help predict its course. The etiology and pathophysiology of this anomaly have not yet been fully understood, and findings on the role of matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in cleavage of extracellular matrix, are reason to investigate their role in physiological and pathological cardiogenesis. In the previous studies on this topic, the concentration of MMP and TIMP were determined in the blood. This is the first study that used urine to examine their role in congenital heart anomalies. The aim was to investigate the role of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in the etiology and pathophysiology of VSD.

Subjects and methods: The research was a prospective study its included fifty-two children with isolated VSD and twelve healthy children up to one year of age. MMP and TIMP were determined from a urine sample by *ELISA*.

Results: We found that concentrations of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 are elevated in children with VSD and that there is a positive correlation between their concentrations, especially high in the case of MMP-9 and TIMP-1, and the size of the defect. The concentration of MMP-9 in urine was higher in the cases in which the defect did not close compared to cases where it spontaneously closed in the first year of life.

Conclusion: Our results suggest the role of MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors 1 and 2 in the etiopathogenesis of VSD and that their urinary concentrations, especially of MMP-9 and TIMP-1, in combination with echocardiographic and clinical monitoring, could be useful in the prediction of spontaneous course of the disease.

Keywords: matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, ventricular septal defect, urine

Scientific area: Pediatrics

Scientific field: Medicine

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: B660

Type of the selected license of the Creative Commons: Authorship – NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC)

ZAHVALNICA

Od srca se zahvaljujem mentorici prof. dr sc. med. Ines Mrakovčić-Šutić za nesebičnu podršku, pomoć, uloženo vrijeme i trud, posebno prilikom izrade eksperimenata i tumačenja dobijenih rezultata. Hvala na pruženoj slobodi, ukazanom povjerenju, strpljenju, beskrajnom optimizmu i prijateljstvu.

Zahvalnost dugujem i komentorici prof. dr sc. med. Jelici Predojević Samardžić na važnim profesionalnim i životnim lekcijama.

Veliku zahvalnost dugujem pedijatrima-kardiolozima i drugom osoblju Klinike za dječije bolesti koji su nesebično pomogli u eksperimentalnom dijelu rada. Želim da se zahvalim i roditeljima djece koja su učestvovala u istraživanju, na spremnosti i želji da pomognu da dođemo do novih naučnih saznanja.

Doktorsku disertaciju posvećujem mojoj porodici, kojoj dugujem najveću zahvalnost na podršci i razumijevanju, a posebno mom ocu prof. dr sc. med. Zdravku Mariću.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Predmet istraživanja	1
1.2. Ventrikularni septalni defekt	2
1.2.1. Definicija	2
1.2.2. Istorijat	2
1.2.3. Epidemiologija	3
1.2.4. Etiologija	3
1.2.5. Patofiziologija	4
1.2.6. Klasifikacija	5
1.2.7. Kliničke manifestacije	7
1.2.8. Dijagnoza	8
1.2.9. Liječenje	9
1.2.10. Prognoza	11
1.2.11. Spontano zatvaranje	11
1.3. Matriks metaloproteinaze i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza	12
1.3.1. Ekstracelularni matriks	12
1.3.2. Matriks metaloproteinaze	13
1.3.2.1. Struktura MMP-a	13
1.3.2.2. Klasifikacija MMP-a	14
1.3.2.3. MMP-2 i MMP-9	15
1.3.2.4. Regulacija aktivnosti MMP	16
1.3.2.5. Djelovanje MMP	16
1.3.2.6. MMP i TIMP u kardiovaskularnim bolestima	17
2. HIPOTEZA	19
3. CILJEVI RADA	20
4. ISPITANICI I METODE	21
4.1. FAZE ISTRAŽIVANJA	21
4.2. ISPITANICI	21
4.3. METODE RADA	24
4.3.1. Ehokardiografija	24
4.3.2. Klinički pregled i genetička obrada ispitanika	25

4.3.3. Antropometrijska mjerenja	25
4.3.4. Prikupljanje, skladištenje i transport uzoraka	27
4.3.5. Određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika	28
4.4. Statistička obrada prikupljenih podataka	29
4.5. Etički aspekti	30
5. REZULTATI	31
5.1.OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	31
5.1.1. Distribucija ispitanika prema prisustvu VSD-a	31
5.1.2. Starosna struktura	31
5.1.3. Polna struktura	32
5.1.4. Gestacijska starost	32
5.1.5. Uhranjenost na rođenju	33
5.2. DISTRIBUCIJA ISPITANIKA PREMA KARAKTERISTIKAMA VSD-a	33
5.2.1. Distribucija ispitanika prema lokaciji VSD-a	33
5.2.2. Distribucija ispitanika prema veličini VSD-a (VSD/Ao)	35
5.2.3. Distribucija ispitanika prema broju VSD-a	37
5.2.4. Distribucija ispitanika prema postojanju PAH	38
5.2.5. Distribucija zavisno od spontanog zatvaranja VSD-a	39
5.3. MMP-2	42
5.3.1. Vrijednosti MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om	42
5.3.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na pol ispitanika	42
5.3.3. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju	43
5.3.4. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a	43
5.3.5. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika	44
5.3.6. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a	45
5.3.6.1. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a	45
5.3.6.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a	45
5.3.6.3. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a	46

5.3.7. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a	47
5.3.7.1. Vrijednosti MMP-2 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a	47
5.3.7.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika	47
5.3.8. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na prisutnost PAH	48
5.3.9. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na broj VSD-a	49
5.3.10. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na lokaciju VSD-a	49
5.4. MMP-9	50
5.4.1. Vrijednosti MMP-9 kod ispitanika sa VSD-om	50
5.4.2. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na pol ispitanika	50
5.4.3. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju	51
5.4.4. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na veličinu VSD-a	51
5.4.5. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika	52
5.4.6. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a	53
5.4.6.1. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a	53
5.4.6.2. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a	53
5.4.6.3. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a	54
5.4.7. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a	54
5.4.7.1. Vrijednosti MMP-9 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a	54
5.4.7.2. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika	55
5.4.8. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost PAH	55
5.4.9. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na broj VSD-a	56
5.4.10. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na lokaciju VSD-a	56
5.5. TIMP-1	57
5.5.1. Vrijednosti TIMP-1 kod ispitanika sa VSD-om	57
5.5.2. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na pol ispitanika	57
5.5.3. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju	58
5.5.4. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na veličinu VSD-a	58

5.5.5	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika	59
5.5.6.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a	60
5.5.6.1.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a	60
5.5.6.2.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a	60
5.5.6.3.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a	61
5.5.7.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a	61
5.5.7.1.	Vrijednosti TIMP-1 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a	61
5.5.7.2.	TIMP-1 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika	62
5.5.8.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost PAH	62
5.5.9.	Vrijednost TIMP-1 s obzirom na broj VSD-a	63
5.5.10.	Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na lokaciju VSD-a	63
5.6.	TIMP-2	64
5.6.1.	Vrijednosti TIMP-2 kod ispitanika sa VSD-om	64
5.6.2.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na pol ispitanika	64
5.6.3.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju	65
5.6.4.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a	65
5.6.5.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika	66
5.6.6.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a	67
5.6.6.1.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a	67
5.6.6.2.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a	67
5.6.6.3.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a	68
5.6.7.	Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a	68
5.6.7.1.	Vrijednosti TIMP-2 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a	68

5.6.7.2. TIMP-2 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika	69
5.6.8. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost PAH	69
5.6.9. Vrijednost TIMP-2 s obzirom na broj VSD-a	70
5.6.10. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na lokaciju VSD-a	70
6. DISKUSIJA	71
6.1. VSD i njegovo spontano zatvaranje zavisno od opštih karakteristika ispitanika i ehokardiografskih karakteristika anomalije	71
6.2. Nivo MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu kod VSD-a	75
6.3. Zavisnost nivoa MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika sa VSD-om od opštih karakteristika ispitanika i ehokardiografskih karakteristika anomalije	77
6.4. Zavisnost nivoa MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 od spontanog zatvaranja VSD-a	80
7. ZAKLJUČCI	82
8. LITERATURA	84
9. PRILOZI	102

1. UVOD

1.1. Predmet istraživanja

Ventrikularni septalni defekt (VSD) je, poslije bikuspidne aortne valvule, druga najčešća kongenitalna srčana anomalija [1-3]. Nastaje kao rezultat poremećaja u procesu formiranja interventrikularnog septuma u prvih sedam nedjelja embrionalnog razvoja [4, 5]. Najčešće se javlja kao izolovana anomalija, ali može biti i udružena sa drugim anomalijama ili dio sindromskog poremećaja [6]. U velikom broju slučajeva VSD se spontano zatvori u prvim godinama života, često bez potrebe za ikakvom terapijom. U preostalim slučajevima liječenje se sastoji u medikamentoznoj terapiji, a nerijetko i u hirurškom zatvaranju defekta. Ako se pacijenti redovno prate i pravilno liječe, prognoza je najčešće dobra. Međutim, kod velikih i neblagovremeno zatvorenih defekata može doći do ozbiljnih komplikacija, uključujući i nastanak Eisenmengerovog sindroma. Iz tog razloga je za praćenje i liječenje VSD-a, od velike važnosti utvrditi koji faktori, odnosno markeri, bi mogli pomoći u predviđanju njegovog toka.

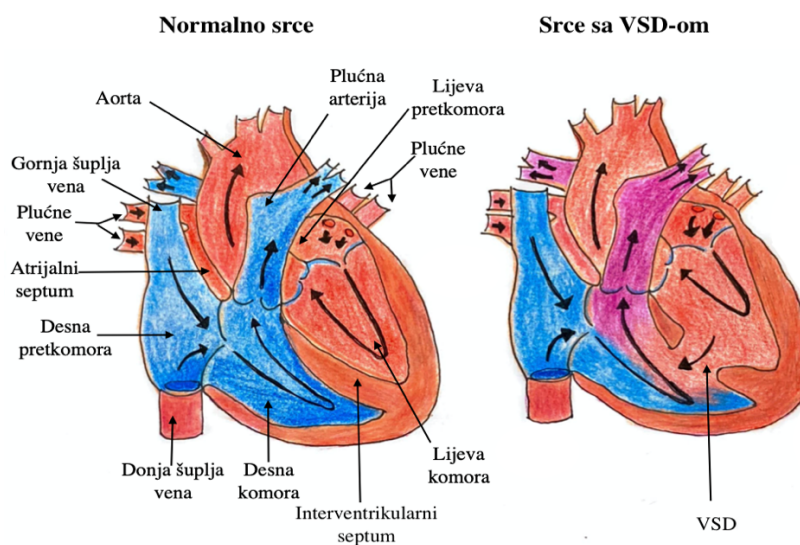
Etiologija i patofiziologija ove anomalije još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Kod izolovanog VSD-a smatra se da je etiologija multifaktorijalna. Saznanja o ulozi matriks metaloproteinaza (MMP) i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP) u procesima cijepanja ekstracelularnog matriksa tokom organogeneze povod su da se ispita njihova uloga kako u fiziološkoj kardiogenezi, tako i u nastanku srčanih anomalija. Dosadašnjim istraživanjima, koja su se bavila određivanjem nivoa MMP-a i TIMP-a u krvi bolesnika sa VSD-om, utvrđeno je da MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 imaju značaj u određivanju težine bolesti, predviđanju njenog toka i ishoda liječenja [7, 8, 9]. Pregledom literature, međutim, nismo našli da je do sada objavljena studija o VSD-u koja je koristila metodu kojom se određuje nivo MMP-a i TIMP-a u urinu. Ukoliko bi se utvrdilo da se korištenjem urina mogu dobiti slični ili isti rezultati kao iz krvi, s obzirom na njenu neinvazivnost i daleko lakšu primjenu kod djece, metoda koja koristi urin bi bila u prednosti u odnosu na metodu koja koristi krv.

1.2. Ventrikularni septalni defekt

1.2.1. Definicija

Međunarodno društvo za nomenklaturu pedijatrijskih i kongenitalnih bolesti srca (ISNPCHD - engl. *The International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease*) definiše VSD kao kongenitalnu srčanu anomaliju u kojoj postoji rupa ili prolaz između srčanih komora [10]. U engleskom i njemačkom jeziku poznat je kao VSD, a u španskom, francuskom i portugalskom kao interventrikularna komunikacija [11]. Neki autori preporučuju da se radije koristi termin interventrikularna komunikacija pošto se neki VSD-i nalaze na mjestu gdje u normalnom srcu ne postoje strukture ventrikularnog septuma [12].

Uslijed postojanja ove anomalije, dio krvi bogate kiseonikom iz lijeve komore, umjesto u aortu, odlazi u desnu komoru gdje se miješa sa krvlju siromašnom kiseonikom i potom plućnom arterijom dopire u pluća (Slika 1).



Slika 1. Anatomija normalnog srca i srca sa VSD-om

1.2.2. Istorijat

Prvi patološko-anatomski opis VSD-a dao je hirurg *Dalrymple* 1847. godine [13], a prvi opis kliničkih karakteristika ove anomalije pedijatar i kardiolog *Henri Louis Roger* 1879. godine [14]. Termin *maladie de Roger* se još uvijek koristi za označavanje malog asimptomatskog VSD-a. Austrijski ljekar *Victor Eisenmenger* je 1897. godine opisao 32-

godišnjeg pacijenta sa cijanozom kod koga je obdukcijom utvrđen veliki VSD [15]. Po njemu se najteži oblik plućne arterijske hipertenzije (PAH) koji je povezan sa kongenitalnom srčanom anomalijom naziva Eisenmengerovim sindromom, a nastaje kao rezultat postojanja značajnog sistemsko-plućnog (lijevo-desnog) šanta [16].

1.2.3. Epidemiologija

Sa prevalencijom od oko 3 na 1000 živorođenih, VSD je, poslije bikuspidne aortne valvule, druga najčešća kongenitalna srčana anomalija [1-3]. Kod prijevremeno rođene djece i djece male porođajne težine prevalencija ove anomalije je značajno veća i iznosi oko 7 na 1000 živorođenih [17]. Budući da su mnogi slučajevi asimptomatski, prava prevalencija je vjerovatno još veća. Kako u većini slučajeva u djetinjstvu dolazi do spontanog zatvaranja defekta ili se, u slučaju velikog defekta, izvrši njegovo zatvaranje hirurškim putem, VSD se rijetko sreće kod odraslih osoba i tada su obično u pitanju mali ili defekti srednje veličine [18-20].

Postoje značajne razlike o učestalosti VSD-a u različitim dijelovima svijeta. Zanimljivo je da je prijavljena učestalost ove anomalije najveća u Evropi, nešto manja u Okeaniji i Sjevernoj Americi, a najmanja u Africi i Južnoj Americi. Razlika između Evrope i Severne Amerike bi se mogla objasniti etničkim, socioekonomskim i ekološkim faktorima, s obzirom da su proučavane populacije i metodologija između studija na ova dva kontinenta prilično uporedive [6].

Učestalost VSD-a se tokom posljednje tri decenije nije značajno mijenjala na globalnom nivou i u slabo razvijenim zemljama [21, 22]. U razvijenim zemljama ona je sada nešto viša, zbog povećanja detekcije asimptomatskih malih defekata i zbog smanjenja mortaliteta zahvaljujući savremenim metodama liječenja i praćenja [1, 23]. S druge strane, na smanjenje prevalencije VSD-a u razvijenim zemljama utiče provođenja preventivnih mjera, zahvaljujući boljem poznavanju etiologije anomalije, kao i prenatalna dijagnostika i prekidi trudnoća u slučaju teških i kompleksnih oblika [24].

1.2.4. Etiologija

VSD nastaje kao rezultat poremećaja u procesu formiranja interventrikularnog septuma u prvih sedam nedjelja intrauterinog razvoja [4, 5]. Faktori koji igraju ulogu u njegovom

nastanku i patofiziološki mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Smatra se da je etiologija ove anomalije multifaktorijalna.

VSD je često dio kliničke slike bolesti koje nastaju zbog poremećaja hromozoma ili gena [25, 26], a može nastati i uslijed teratogenog dejstva različitih infektivnih činilaca, bolesti majke, poput *diabetes mellitus*-a, alkohola, marihuane, kokaina i lijekova kao što su metronidazol i ibuprofen [27, 28]. Identifikovano je nekoliko gena koji se dovode u vezu sa izolovanom formom VSD-a, uključujući *GATA4*, *CITED2*, *NKX2-5* i *HAND1* [29-32]. U mnogim slučajevima uzrok je nepoznat.

1.2.5. Patofiziologija

Interventrikularni septum, ili kako se još naziva ventrikularni septum, je mišićno-membranozna struktura koja razdvaja desnu od lijeve srčane komore. Približno je trouglastog oblika i sastoji se od četiri dijela: infundibularnog (*outlet*), membranoznog, *inlet* (atrioventrikularnog kanala) i mišićnog (trabekularnog) [33]. Kao rezultat poremećaja u procesu razvoja ili fuzije jedne od navedenih komponenti tokom embriogeneze nastaje VSD u odgovarajućoj komponenti.

Glavni patofiziološki mehanizam VSD-a je stvaranje šanta između komora. Količina i pravac šantovane krvi određuju hemodinamski značaj VSD-a. Ovi faktori su regulisani veličinom VSD-a, njegovom lokacijom i plućnom vaskularnom rezistencijom [34]. Uslijed postojanja defekta, dio krvi iz lijeve komore, umjesto u aortu, dopijeva u desnu komoru, iz nje plućnom arterijom u pluća i na kraju u lijevu pretkomoru. Kod najblažeg oblika VSD-a, poznatog kao Rogerova bolest, postoji mali lijevo-desni šant i arterijski pritisak u plućima je normalan. I kod velikih defekata pritisak u plućnim krvnim sudovima može biti normalan. Međutim, u uslovima dugotrajnog velikog lijevo-desnog šanta, plućni vaskularni endotel prolazi kroz ireverzibilne promjene koje rezultiraju nastankom PAH. Kada pritisak u plućnoj cirkulaciji nadmaši pritisak u sistemske cirkulaciji, smjer šanta se obrće i on tada postaje desno-lijevi, što je poznato kao Eisenmengerov sindrom. Smatra se da se Eisenmengerov sindrom javlja kod 10% do 15% pacijenata sa VSD kod kojih on nije pravovremeno zatvoren [16]. VSD, PAH i reverzija šanta nazivaju se Eisenmengerovim kompleksom [35]. Eisenmengerov sindrom se može javiti i kod drugih kongenitalnih mana sa velikim intrakardijalnim ili ekstrakardijalnim šantom, poput defekata atrijsalnog septuma, otvorenog *ductus arteriosus*-a, velike aorto-pulmonalne veze ili kompleksnih anomalija bez značajne

opstrukcije plućne arterije [36]. Kada se razvije Eisenmengerov sindrom, hirurška korekcija anomalije je u principu kontraindikovana i pacijenti imaju lošu prognozu [37]. Na sreću, Eisenmengerov sindrom je danas relativno rijedak i obično se viđa u sredinama sa lošom zdravstvenom zaštitom u kojima veliki defekti mogu ostati neotkriveni dugi niz godina.

1.2.6. Klasifikacija

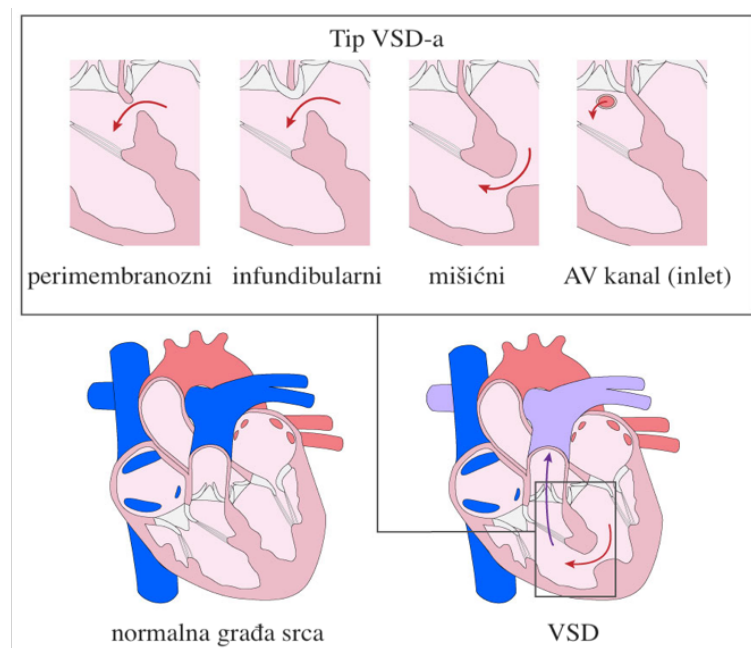
VSD se može klasifikovati prema lokaciji defekta, patohistološkoj strukturi granica, veličini, broju i udruženosti sa drugim anomalijama.

U prošlosti su paralelno korištena dva različita pristupa klasifikaciji VSD-a. Prvi pristup se zasnivao na lokaciji defekta unutar ventrikularnog septuma [12, 33, 38], a drugi na patohistološkim karakteristikama granica defekta, odnosno na postojanju ili nepostojanju fibrozne komponente na postero-inferiornom dijelu defekta. Ova druga klasifikacija je značajna za hirurški tretman zbog rizika od povrede provodnog tkiva ukoliko postoji fibrozna komponenta [12].

Danas se najčešće koristi klasifikacija VSD-a za jedanaestu iteraciju Međunarodne klasifikacije bolesti Međunarodnog društva za nomenklaturu pedijatrijskih i kongenitalnih bolesti srca iz 2018. godine [11] koja uzima u obzir i lokaciju defekta i patohistološku strukturu njegovih granica (Slika 2), s tim da nomenklatura varira i koriste se mnogi sinonimi. Ova klasifikacija razlikuje četiri vrste VSD-a:

1. Perimembranozni centralni (paramembranski, subaortni, konoventrikularni) VSD je najčešći tip i čini 80% svih slučajeva VSD-a. Nalazi se u membranoznom dijelu septuma uz trikuspidnu i aortnu valvulu. Najčešće zahvata i dio mišićnog septuma zbog čega se uobičajeno naziva perimembranozni defekt. Kod ovog tipa VSD-a ponekad dolazi do formiranja aneurizme adherencijom trikuspidne valvule koja smanjuje šant i može dovesti do spontanog zatvaranja defekta.
2. *Inlet* (ulazni, atrioventrikularni kanal, atrioventrikularni septalni defekt) VSD je lociran neposredno ispod ulaznih valvula (trikuspidnih i mitralnih). Udružen je sa zajedničkom atrioventrikularnom valvulom i može biti povezan sa određenim stepenom pomjeranja (*malalignment*) atrioventrikularnog septuma i *straddling* trikuspidne valvule. Čini svega 8% svih slučajeva VSD-a i karakterističan je za sindrom *Down*. Rijetko dolazi do njegovog spontanog zatvaranja.

3. Trabekularni mišićni VSD je defekt koji je potpuno okružen mišićnim tkivom. Kod novorođenčadi čini 20% svih VSD-a, dok je kod odraslih, zbog visoke stope spontanog zatvaranja, značajno rjeđi. Prema dijelu trabekularnog mišićnog septuma u kom je lociran, razlikujemo srednji, apikalni, posteroinferiorni (zadnji) i anterosuperiorni (prednji) trabekularni mišićni VSD. Može biti i multipli, poput švajcarskog sira („*Swiss cheese*” VSD)
4. *Outlet* (infundibularni, suprakristalni, subarterijski, subpulmonalni, konalni, dvostruko pridružen juksta-arterijski) VSD se nalazi ispod semilunarnih valvula (aortnih i plućnih) u izlaznom dijelu septuma desne komore i iznad supraventrikularnog grebena (lat. *crista supraventricularis*). To je najrjeđi tip koji predstavlja samo 6% svih VSD-a, izuzev u azijskoj populaciji gdje čini oko 30%. Zbog gubitka potpore, kod ovog tipa VSD-a česti su prolaps aortne valvule i progresivna aortna regurgitacija. Rijetko dolazi do njegovog spontanog zatvaranja.



Slika 2. Tipovi VSD-a prema lokaciji defekta i patohistološkoj strukturi njegovih granica
(prilagođeno) [39]

Svaki od ovih tipova VSD-a može biti izolovana anomalija ili udružena sa drugim srčanim anomalijama, kao što su defekt atrijsalnog septuma, otvoreni *ductus arteriosus*, desni luk aorte ili stenoza plućne arterije. Takođe, VSD se može javiti kao komponenta kompleksnih srčanih

anomalija poput tetralogije *Fallot* i transpozicije velikih arterija. Izolovana forma VSD-a čini 37% svih kongenitalnih srčanih anomalija [6].

VSD se može klasifikovati i prema njegovoj veličini, a ona se najobjektivnije određuje na osnovu odnosa maksimalnog prečnika VSD-a i prečnika prstena aorte (odnos VSD/Ao) [40]. Obično se defekti smatraju malim ako je njihov prečnik manji od jedne trećine, srednjim ako je između jedne i dvije trećine i velikim ako je veći od dvije trećine prečnika prstena aorte. Trivijalni defekti su mali defekti sa prečnikom manjim od jedne četvrtine prečnika prstena aorte.

1.2.7. Kliničke manifestacije

Kliničke manifestacije VSD-a u velikoj mjeri zavise od prisustva hemodinamski značajnog šanta i u direktnoj su vezi sa veličinom defekta.

Mali VSD dovodi samo do minimalnog lijevo-desnog šanta bez preopterećenja lijeve komore ili PAH. Djeca najčešće nemaju simptome ili su oni blagi. Ovi defekti se otkrivaju u pravilu slučajno, najčešće zbog auskultacije šuma tokom sistematskog pregleda.

VSD srednje veličine dovodi do umjerenog preopterećenja lijeve komore, a PAH, ukoliko postoji, je blaga. Dijete može imati blagu tahipneju, tahikardiju i hepatomegaliju. Tokom hranjenja može da dođe do zamaranja, pogoršanja tahipneje i znojenja zbog povećanog tonusa simpatikusa. Uslijed povećane potrebe za kalorijama i nemogućnosti adekvatnog unosa, dijete slabo dobija na težini, a u nekim slučajevima može i sporije da raste. Kao posljedica plućne kongestije dijete može imati česte respiratorne infekcije.

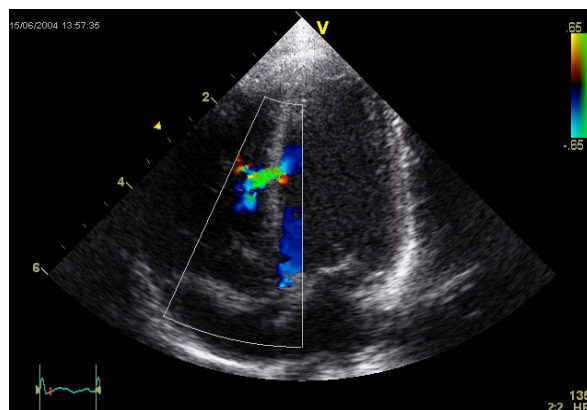
Veliki VSD dovodi do nastanka kongestivne srčane insuficijencije u ranom djetinjstvu uslijed teškog preopterećenja lijeve komore i visoke PAH. Simptomi su slični, ali teži od onih koji se primjećuju kod defekta srednje veličine. Postoji i kardiomegalija koja pomaže u razlikovanju srčane insuficijencije od respiratornog oboljenja poput bronhiolitisa. Kod VSD obično ne postoji cijanoza, a njena pojava ukazuje na obrtanje šanta. Djeca sa Eisenmengerovim sindromom mogu biti samo blago cijanotična u mirovanju, ali tokom napora imaju tahidispneju, duboku cijanozu, bol u grudima, a može doći i do nastanka aritmija, sinkope i hemoptizije.

Šum kod VSD-a je tipično pan-sistolni i najbolje se čuje duž lijeve donje ivice sternuma. Kod malih defekata je oštar i glasan, a kod velikih mekši i manje intenzivan. Infundibularni defekti se najbolje čuju u plućnom polju. Kod Eisenmengerovog sindroma može izostatiti za

VSD tipičan šum, a može se čuti naglašena plućna komponenta drugog srčanog tona. Šumovi koji se čuju kod dojenčeta i koji nestaju do kraja prve godine, vjerovatno predstavljaju VSD koji se vremenom spontano zatvorio.

1.2.8. Dijagnoza

Dijagnoza VSD-a se u prošlosti obično zasnivala na kliničkoj prezentaciji, fizikalnom pregledu, radiografiji grudnog koša i elektrokardiogramu. Danas *color doppler* transtorakalna ehokardiografija (Slika 3), zbog svoje visoke senzitivnosti, ima glavnu ulogu u dijagnostici, praćenju i planiranju liječenja ove anomalije.



Slika 3. Prikaz VSD-a u srednjem mišićnom dijelu septuma kod novorođenčeta pomoću transtorakalne ehokardiografije sa *color doppler*-om (ljubaznošću autora *Kjetil Lenes-a*). Prikazan je protok krvi od lijeve (desno na slici) do desne komore (lijevo na slici). Zapis u donjem lijevom uglu slike pokazuje protok tokom jednog kompletnog srčanog ciklusa, a crvenom bojom je označeno vrijeme u srčanom ciklusu kada je slika snimljena. Boje predstavljaju brzinu protoka krvi.

Color doppler transtorakalnom ehokardiografijom može se otkriti do 95% VSD-a, posebno neapikalne lezije veće od 5 mm, dobiti morfološke informacije kao što su veličina, lokacija i broj defekata, kao i hemodinamske informacije poput veličine mlaza krvi i procjene pritiska u plućnoj arteriji, te otkriti udružene srčane anomalije i procijeniti veličina i funkcija komora. Ograničenja ove metode su loš akustični prozor i činjenica da je subjektivna. Kada je nalaz nedovoljno jasan, preporučuje se transezofagealna ehokardiografija [41, 42]. Zahvaljujući

fetalnoj ehokardiografiji danas se VSD, prvenstveno srednji i veliki, može u velikom broju slučajeva otkriti prenatalno [43].

Elektrokardiografija kod pacijenata sa velikim šantom može pokazati hipertrofiju lijeve komore, a kod pacijenata sa PAH-om blok desne grane, devijaciju desne ose i hipertrofiju desne komore. Kod polovine pacijenata sa VSD-om nalaz je normalan.

Radiografija grudnog koša je obično normalna kod malog VSD-a, a kod većih defekata može pokazati uvećanu srčanu siluetu.

Magnetna rezonanca srca i kompjuterizovana tomografija su metode koje su korisne kod VSD-a koji je udružen sa drugim srčanim anomalijama i kod njegove neuobičajene lokacije koja se teško vizuelizuje ehokardiografijom [44-47].

Kateterizacijom srca dobijaju se hemodinamske informacije u vezi sa plućnom vaskularnom rezistencijom i reverzibilnosti PAH, što je posebno korisno za odluku o hirurškom zatvaranju defekta. Indikovana je i kada su podaci o anatomiji plućne arterije, velikim aorto-pulmonalnim kolateralnim arterijama i koronarnoj cirkulaciji dobijeni drugim metodama dvosmisleni, kao i u slučaju ranih neočekivanih postoperativnih komplikacija kada magnetna rezonanca srca i kompjuterska tomografija ne daju jasno objašnjenje [48].

1.2.9. Liječenje

U slučaju malog asimptomatskog VSD-a nije indikovana ni medikamentozna niti hirurška terapija. Profilaksa infektivnog endokarditisa antibioticima kod VSD-a više se ne preporučuje rutinski [49]. Ona je uglavnom indikovana kod cijanogenih anomalija, kod pacijenata koji su imali epizodu endokarditisa i kod onih koji imaju ugrađene vještačke srčane valvule. Održavanje dobre oralne higijene smatra se da ima najveći značaj u smanjenju rizika od endokarditisa.

Kod djece sa srednje velikim ili velikim VSD-om medikamentozna terapija je indikovana za liječenje simptomatske kongestivne srčane insuficijencije, jer se neki VSD-i mogu vremenom smanjiti. Nekontrolisana srčana insuficijencija sa poremećajem rasta djeteta i rekurentnim respiratornim infekcijama predstavlja indikaciju za hitnu hiruršku intervenciju.

Veliki asimptomatski VSD sa povišenim pritiskom u plućnoj arteriji se obično hirurški zatvaraju u prvih 6 do 12 mjeseci života. Hirurško liječenje je indikovano kod starije asimptomatske djece sa normalnim plućnim pritiskom ukoliko je odnos plućnog i sistemskog protoka dovoljno veliki da izaziva dilataciju lijeve komore koja se može vidjeti

ehokardiografijom. Prolaps aortne valvule je indikacija za hirurško liječenje čak i ako je VSD mali, jer rana korekcija može spriječiti progresiju insuficijencije aortne valvule.

Kod odraslih pacijenata sa VSD-om, prema najnovijim smjernicama Evropskog udruženja kardiologa iz 2020. godine, zatvaranje VSD se preporučuje bez obzira na simptome u slučaju postojanja preopterećenja lijeve komore bez PAH (kod nepostojanja neinvazivnih znakova povećanja pritiska u plućnoj arteriji ili invazivnih dokaza plućne vaskularne rezistencije u slučaju postojanja takvih znakova). Zatvaranje VSD-a se ne preporučuje kod pacijenata sa Eisenmengerovim sindromom [50]. Glavna kontraindikacija za hirurško zatvaranje VSD-a je prisustvo ireverzibilne PAH zbog visokog hirurškog perioperativnog mortaliteta i plućnih komplikacija [34].

Komplikacije operativnog zahvata su danas rijetke, a uključuju rezidualni ili rekurentni VSD, trikuspidnu regurgitaciju, stenozu i blagu insuficijenciju aortne valvule, disfunkciju lijeve komore i pogoršanje PAH. Aritmije su rjeđe komplikacije nego kod operativnih korekcija drugih srčanih mana. Danas je potpuni atrioventrikularni blok, komplikacija koja se može javiti neposredno nakon operativnog zahvata, rijetka zahvaljujući savremenim kardiohirurškim tehnikama. Kod nepostojanja PAH, stopa mortaliteta kod hirurške intervencije iznosi oko 1%.

Kod djece koja su slabo dobijala na težini, ukoliko se korekcija anomalije uradi rano, odnosno u prvoj godini života, zabilježeno je da dolazi do značajnog ubrzanja rasta tri do šest mjeseci nakon operacije. Utvrđeno je, međutim, da ova djeca imaju povećan rizik za nastanak inzulinske rezistencije, metaboličkog sindroma, gojaznosti i kardiovaskularnih bolesti [51]. Kod nekih pacijenata i nakon zatvaranja VSD-a može postojati povećana plućna vaskularna rezistencija koja u stvari predstavlja primarnu bolest krvnih sudova pluća.

Nedavni napredak u interventnim tehnikama omogućio je perkutano zatvaranje VSD-a. Ono je indikovano u slučajevima kod kojih se operacija smatra veoma rizičnom [52].

Pacijente sa VSD-om i one kod kojih je on hirurški zatvoren, potrebno je redovno kontrolisati. Kod malog asimptomatskog VSD-a preporučuju se kontrole na tri do pet godina. U slučaju postojanja disfunkcije lijeve komore, rezidualnog VSD-a, PAH, aortne regurgitacije i opstrukcije izlaznog trakta desne ili lijeve komore kontrole treba vršiti najmanje jednom godišnje, a u slučaju subjektivnih tegoba i češće. Ako nakon operacije nije došlo do nastanka komplikacija, pregledi se preporučuju svakih pet godina. Nakon transkateterskog zatvaranja defekta redovne kontrole se preporučuju prve dvije godine, a nakon toga svake dvije do četiri godine.

1.2.10. Prognoza

U slučaju malog asimptomatskog VSD-a bez PAH prognoza je odlična i bez bilo kakve terapije. U velikom broju slučajeva ovakvi defekti se spontano zatvore tokom prve godine života, a kod preostalih ne dolazi do pojave simptoma izuzev u slučaju postojanja anemije, infekcija ili endokarditisa. Kod velikog VSD-a prognoza je loša ukoliko se defekt ne zatvori blagovremeno, jer dolazi do razvoja plućne hipertenzije i Eisenmengerovog sindroma.

Za pacijente koji su podvrgnuti hirurškoj korekciji anomalije prognoza je najčešće dobra i većina ima normalan životni vijek [53]. Međutim, ovi pacijenti imaju veći rizik za nastanak aritmija, endokarditisa i kongestivne srčane insuficijencije u poređenju sa opštom populacijom [54].

Fizička aktivnost nije ograničena pacijentima sa malim VSD-om i onima kod kojih je on zatvoren ako nemaju PAH, značajne aritmije i disfunkciju lijeve komore. Onima koji imaju PAH preporučuju se samo blaže i umjerene fizičke aktivnosti i rekreativno bavljenje sportom.

1.2.11. Spontano zatvaranje

Odavno je poznato da u mnogim slučajevima VSD-a dolazi do njegovog spontanog zatvaranja. Stopa zatvaranja ove anomalije bez hirurške intervencije se značajno razlikuje među studijama i kreće se između 12% i 84%, u zavisnosti od dužine praćenja pacijenata i korištenih dijagnostičkih metoda [1, 55-57]. Zna se da spontano zatvaranje ove anomalije zavisi od više faktora, od kojih su dobro poznati dob pacijenta, tip defekta i njegova veličina. Dosadašnja istraživanja nisu utvrdila da na stopu spontanog zatvaranja VSD-a utiču pol, gestacijska starost i porođajna tjelesna masa djeteta [1, 20].

Od svih intrauterino otkrivenih VSD-a, između 5% i 20% se zatvori prije rođenja [18, 58]. Iako se može desiti u bilo kojoj životnoj dobi, spontano zatvaranje defekta se najčešće dešava u toku prve godine i iznosi do 82% [18-20, 56, 59]. Nakon tog perioda, a posebno nakon treće godine, mogućnost da dođe do spontanog zatvaranja defekta je značajno manja [19].

Veličina defekta je jedan od glavnih faktora koji se koriste u predviđanju mogućnosti da dođe do njegovog spontanog zatvaranja, posebno kod mišićnih defekta [60]. Dobro je poznato da se manji defekti češće spontano zatvaraju, a da defekti koji su veći od dvije trećine prečnika prstena aorte uglavnom zahtijevaju hirurški tretman [57].

I lokacija defekta izgleda da utiče na stopu njegovog zatvaranja, te je ona nešto veća kod mišićnih defekata lociranih u srednjem dijelu septuma u odnosu na one u apikalnom, prednjem i zadnjem njegovom dijelu [57, 61].

Stopa spontanog zatvaranja mišićnih i perimembranoznih defekata razlikuje se prije i nakon rođenja. Intrauterino mišićni defekti imaju manju stopu zatvaranja u odnosu na perimembranozne [62]. Suprotno, poslije rođenja stopa zatvaranja mišićnih defekata je značajno veća od perimembranoznih i, zavisno od perioda praćenja, studije navode da iznosi između 69% i 97%. Spontano zatvaranje perimembranoznog defekta nakon rođenja iznosi između 22% i 51% [20, 63, 64]. *Inlet* i *outlet* defekti imaju vrlo malu stopu spontanog zatvaranja.

Mehanizmi odgovorni za zatvaranje VSD-a nisu do kraja razjašnjeni ali najvjerojatnije uključuju više faktora i razlikuju se zavisno od tipa defekta [20]. Smatra se da je uobičajeni mehanizam kojim se zatvara mišićni VSD zahvatanje defekta mišićnim tkivom zajedno sa superponiranjem ili formiranjem fibroznog tkiva oko njegovih ivica koje ih međusobno približava [58]. Opisan je i slučaj neuobičajenog spontanog zatvaranja centralno postavljenog mišićnog VSD-a uz pomoć trabekularne hipertrofije iz desne komore pri čemu je defekt iz lijeve komore ostao otvoren ali bez postojanja šanta [65]. Kao mogući mehanizmi zatvaranja perimembranoznog VSD-a u literaturi se navode fibrozna endokardijalna reakcija na leziju izazvanu mlazom krvi, adhezija medijalnog kuspisa trikuspidne valvule, reduplikacija tkiva trikuspidne valvule, prolaps kuspisa aortne valvule, stvaranje fibroznog flastera i aneurizme membranoznog septuma, kao i tzv. hrapavi endotel ivica defekta koji nastaje zbog jakog mlaza krvi i na koji se postepeno akumuliraju trombociti čineći leziju „ljepljivom“ [19, 66-71].

1.3. Matriks metaloproteinaze i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza

1.3.1. Ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks (ECM) je mreža proteina i drugih molekula koja okružuje ćelije i igra ključnu ulogu u arhitekturi tkiva i homeostazi. Sastoji se od stotina različitih molekula, uključujući proteoglikane, glikozaminoglikane, strukturne proteine poput kolagena i elastina, te adhezivne proteine poput fibronektina i laminina. Komponente ECM-a zajedno čine strukturu koja, osim što ima potpornu ulogu, aktivno učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa, migraciji, preživljavanju i apoptozi ćelija, distribuciji faktora rasta i integraciji signala u ćelije,

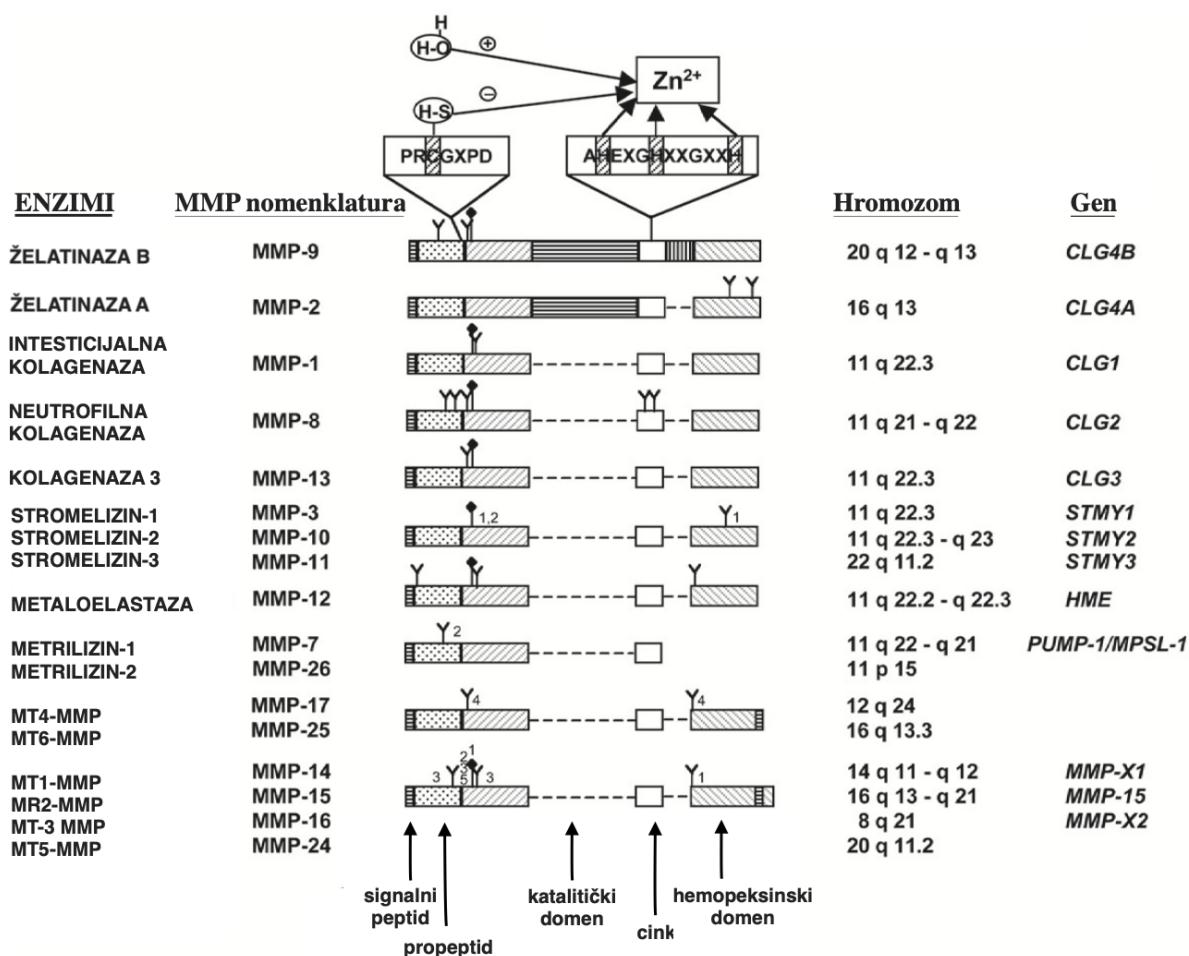
odnosno u njihovoj međusobnoj komunikaciji. ECM doprinosi složenim i raznolikim ćelijskim funkcijama tokom embriogeneze, zarastanja rana ili karcinogeneze. Ovi fiziološki i patološki procesi regulisani su brojnim proteazama koje cijepaju i remodeliraju ECM. Najpoznatije su matriks metaloproteinaze (MMP - engl. *matrix metalloproteinase*) [72], koje zajedno sa tkivnim inhibitorima matriks metaloproteinaza (TIMP - engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) predstavljaju glavne regulatorne elemente u ECM [73, 74].

1.3.2. Matriks metaloproteinaze

MMP su grupa enzima iz porodice cink-ovisnih endopeptidaza koji učestvuju u brojnim fiziološkim i patološkim procesima remodeliranjem ECM [75-77]. Prvi put su opisane prije više od pola vijeka kao „aktivnost“ prisutna tokom metamorfoze kod punoglavaca koja ima sposobnost da razgradi štapiće kolagena [78]. Danas kod ljudi, ovisno o strukturi i glavnome supstratu na koji djeluju, razlikujemo 23 MMP [79].

1.3.2.1. Struktura MMP-a

Osnovna molekularna struktura MMP sastoji se od tri domena zajednička za skoro sve MMP, propeptidnog domena, katalitičkog domena koji sadrži motiv koji vezuje jone cinka i hemopeksinskog domena koji je povezan sa katalitičkim domenom preko fleksibilnog zglobnog regiona (Slika 4) [80-82].



Slika 4. Struktura MMP [80] (prilagođeno)

1.3.2.2. Klasifikacija MMP-a

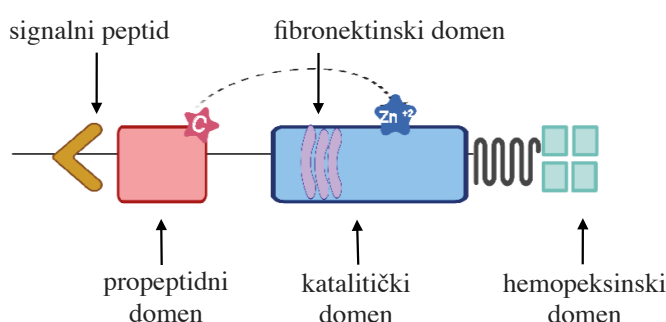
Prema supstratu ECM-a na koji djeluju, MMP se dijele na kolagenaze, želatinaze, stromelizine, matrilizine, MMP vezane za membranu (MT-MMP) i druge neklasifikovane MMP [83]. Kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13 i MMP-18) razgrađuju trostruko spiralni fibrilarni kolagen, koji je osnovni u kostima i ligamentima. Želatinaze (MMP-2 i MMP-9) su uključene u različite ćelijske procese, uključujući angiogenezu i neurogenezu. Stromelizini (MMP-3, MMP-10 i MMP-11) su male proteaze koje razgrađuju segmente ECM. Matrilizini (MMP-7 i MMP-26) obrađuju površinske molekule ćelije i razgrađuju komponente ECM-a. MT-MMP imaju kolagenolitičku aktivnost i mogu da aktiviraju neke proteaze i komponente na površini ćelije [72, 84].

MMP se takođe klasifikuju u osam grupa prema svojoj strukturi. Među njima je pet sekretornih MMP i tri MT-MMP [72, 79]. Sekretorne MMP izlučuju se iz ćelije u ECM u

inaktivnom obliku, kao proenzimi (pro-MMP), kako ne bi izazvale razgradnju ćelijskih komponenti.

1.3.2.3. MMP-2 i MMP-9

MMP-2 i MMP-9 pripadaju grupi želatinaza za koje je karakterističan fibronektinski domen u okviru katalitičkog domena (Slika 5), koji sadrži cisteinom bogate sekvence i vezuje različite supstrate, prije svega kolagene i želatin (denaturisani kolagen) [79, 85, 86].



Slika 5. Šematski prikaz želatinaza (MMP-2 i MMP-9) [86] (prilagođeno)

MMP-2 je MMP kodirana genom *MMP2* (*CLG4A*) lociranim u 16q12.2. Ekspirira se u različitim tipovima ćelija, poput fibroblasta, endotelnih i malignih ćelija. Ova MMP je značajna za angiogenezu, regeneraciju tkiva, procese inflamacije, razgradnju endometrijuma i remodeliranje kostiju. Ima ulogu u mnogim bolestima, uključujući bolesti kardiovaskularnog sistema. Najvažnija njena funkcija je cijepanje kolagena tip IV, a kontrolni mehanizmi MMP-2 uključuju prvenstveno TIMP-2 [87].

MMP-9 je najviše istražena MMP. Kodira je gen *MMP9* (*CLG4B*) lociran u 20q13.12, a sekretuju je brojne ćelije poput neutrofila, makrofaga i fibroblasta [85, 88]. MMP-9 se povezuje s fiziološkim i patološkim procesima uključujući upalu i fibrozu kardiovaskularnog sistema, druga upalna stanja, autoimune bolesti, neurodegenerativne bolesti, *diabetes mellitus* i maligna oboljenja [85]. Funkcija MMP-9 zapravo je remodeliranje tkiva degradacijom ECM i aktivacijom citokina, hemokina i faktora rasta. Glavni supstrati MMP-9 su kolagen (naročito kolagen IV), želatin, elastin, fibronektin i plazminogen [85]. Kontrolni mehanizmi MMP-9 uključuju sve četiri grupe TIMP-a, a najviše TIMP-1 [76].

1.3.2.4. Regulacija aktivnosti MMP

Aktivnosti i nivoi ekspresije MMP su strogo regulisani u različitim fazama: transkripcija, kompartmentalizacija ili lokalizacija, konverzija iz latentnog proenzima u aktivni enzim i endogena inhibicija [82], a ključni korak u regulaciji aktivnosti MMP je konverzija latentnog proenzima u aktivni proteolitički enzim.

Aktivnost MMP-a je takođe regulisana prirodnim inhibitorima kao što su TIMP, alfa-2-makroglobulinom, proteinom bogati cistein i endostatin. Četiri člana porodice TIMP-a, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4, kontrolišu remodeliranje ECM i proteine na površini ćelije kroz funkcionalnu inhibiciju nekoliko klasa metaloproteinaza, uključujući MMP. Promjene u ravnoteži između MMP-a i TIMP-a značajne su u patogenezi mnogih bolesti, uključujući kardiovaskularne [89]. Takođe se pokazalo da TIMP imaju i ulogu neovisnu o MMP u biološkim procesima poput apoptoze, rasta ćelija i angiogeneze, što može objasniti njihove paradoksalne efekte u tumorima [90-93].

1.3.2.5. Djelovanje MMP

MMP djeluju na različite proteine ECM-a, citokine, faktore rasta i membranske proteine, pri čemu pokazuju specifičnost i selektivnost. Kolagenaze (MMP-1, MMP-8 i MMP-13) obično razgrađuju trostruke spiralne regione glavnih fibrilarnih kolagena pri fiziološkoj pH. Želatinaze (MMP-2 i MMP-9) efikasno cijepaju denaturisane kolagene (želatine) i učestvuju u degradaciji kolagena tipa III, IV, V i VII, kao i elastina, fibronektina, laminina i agrekana. Stromelizini (MMP-3 i MMP-10) imaju slična enzimstva i razgrađuju širok spektar supstrata uključujući agrekan, fibronektin, laminin i kolagen tipa IV. Matrilizini (MMP-7 i MMP-26) djeluju na agrekan, fibronektin, kolagen tipa IV i laminin, a MMP-26 aktivira i proMMP-9. Sekretorne MMP djeluju i na neke proteine izvan ECM. MMP-9 aktivira citokine i transformišući faktor rasta (TGF)-b i pretvara plazminogen u angiostatin. Furinom aktivirane MMP-e (MMP-11 i MMP-28) imaju samo slabu proteolitičku aktivnost na ECM proteine, ali takođe razgrađuju inhibitor alfa-1-proteinaze, alfa-2-makroglobulin i protein-1 koji vezuje inzulinu sličan faktor rasta. Ostale sekretorne MMP (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21 i MMP-27) djeluju na različite supstrate u poređenju sa navedenih, a MMP-12 (metaloelastaza), koju uglavnom proizvode makrofagi, može razgraditi elastin, agrekan, fibronektin, laminin i kolagen tipa IV. S druge strane, za membranu vezane MMP glavnom učestvuju u pericelularnoj proteolizi i aktivaciji latentnih proenzima. MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP i MT5-MMP

moгу aktivirati proMMP-2, a MT1-MMP proMMP-13. MT1-MMP potom razgrađuje kolagene I, II i III [94].

1.3.2.6. MMP i TIMP u kardiovaskularnim bolestima

MMP igraju ključnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima. Značajne su za embrionalni razvoj, regeneraciju tkiva i zarastanje rana, a sve više studija se u posljednje vrijeme bavi ispitivanjem njihove uloge u različitim patološkim stanjima. Poremećaj regulacije MMP-a je dokazan u brojnim bolestima, uključujući maligne procese [95], osteoartritis [96], eklampsiju [97] i neuropsihijatrijske bolesti [98], zbog čega se one smatraju potencijalnim kliničkim biomarkerima.

MMP, a posebno MMP-2 i MMP-9, i njihovi tkivni inhibitori 1, 2 i 3 smatraju se značajnim u etiopatogenezi, dijagnostikovanju i liječenju različitih kardiovaskularnih bolesti. Na životinjskim modelima dokazano je da se aktivnost MMP-9 povećava kod razvoja arterijske hipertenzije [85]. I istraživanja na ljudima su pokazala da je kod pacijenata sa hipertenzijom viši nivo MMP-9 u serumu, čak i u ranoj fazi bolesti [76, 99]. Neki radovi navode da se i kod osoba sa normalnim krvnim pritiskom mogu naći povećane koncentracije MMP-9 i TIMP-1 i da takve osobe imaju dvostruko povećan rizik za razvoj hipertenzije [100]. Na životinjskim modelima je utvrđeno da je kod smanjene koncentracije ili u slučaju *knock-out* životinja nepostojanja MMP-9 smanjen rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti [101-104]. O važnoj ulozi MMP-2 i MMP-9 u etiopatogenezi ateroskleroze govore njihove visoke koncentracije utvrđene u urinu oboljelih [105], što bi se moglo koristiti kao lak marker za praćenje razvoja ove bolesti, koja je vodeći uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama [106]. Istraživana je i povezanost genskih polimorfizama koji kodiraju MMP-9 i određenih jednonukleotidnih polimorfizama (SNP - engl. *single nucleotide polymorphism*) varijanti koje povećavaju transkripcijsku aktivnost, te je nađena pozitivna korelacija određenih polimorfizama i težine kliničke slike koronarne ateroskleroze i infarkta miokarda [107]. Da MMP imaju ulogu u nastanku aneurizme aorte, izazivajući destrukciju ECM, govori nalaz povećane aktivnosti MMP-9 i MMP-2 u zidu torakalne i abdominalne aorte kod ove bolesti [108].

MMP i TIMP imaju značajnu ulogu u procesima remodeliranja srca, pri čemu ona može biti i korisna i štetna [109]. Prema većini studija, aktivno remodeliranje miokarda povezano je sa povećanim koncentracijama i aktivnošću MMP-2 i MMP-9 zbog čega ove MMP mogu biti korisni markeri za identifikaciju pacijenata sa rizikom za razvoj srčane insuficijencije i služiti

kao indikatori ishoda bolesti [110-113]. Povećan nivo MMP-9 u ranom stadijumu nakon infarkta miokarda povezan je sa nepovoljnim remodeliranjem miokarda izraženim kao dilatacija lijevog ventrikula [114, 115]. Utvrđeno je da MMP-2 i TIMP-2, uticajem na mehanizme remodeliranja miokarda, mogu biti odgovorni za nastanak hipertrofične kardiomiopatije [116]. TIMP, pored toga što imaju direktan inhibitorski uticaj na MMP, neovisno o tom uticaju uključeni su i u regulaciju profila, funkcije i preživljavanje ćelija, zbog čega se smatra da bi mogli imati centralnu ulogu u procesima formiranja i remodeliranja srca. Za TIMP-3 je utvrđeno da bi njeno niska koncentracija mogla biti razlog prelaska srčane insuficijencije iz kompenzovane u nekompenzovanu fazu [117].

Prije više od 20 godina ispitivanjem na životinjama dokazana je uloga MMP-2 u procesima formiranja srca [118, 119]. Ova MMP učestvuje u procesima regulacije rane kardiogeneze utičući na ventralno zatvaranje srca i degradaciju ECM u dorzalnom mezokardu [120]. Novija istraživanja su pokazala da je MMP-2 posredovano remodeliranje ECM-a potrebno za kardiogenezu, ali da nije neophodno za normalan rast srca kod *Drosophila melanogaster* [121-123].

Vrlo se malo istraživanja bavilo ispitivanjem uloge MMP i TIMP-a u procesima kardiogeneze kod čovjeka. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da njihova distribucija u normalnom miokardu može biti različita što se objašnjava različitim embriološkim porijeklom i različitim ćelijskim odgovorom na stimuluse [109]. Rijetki radovi govore o mogućoj ulozi MMP-a kod kongenitalnih srčanih mana čovjeka, a posebno kod pacijenata koji su razvili plućnu hipertenziju [9]. Utvrđeno je i da određivanje nivoa MMP-a u krvi bolesnika može imati prognostički značaj za postoperativni tok i ishod hirurškog liječenja VSD-a [7, 124]. Studija iz 2013. godine, koja se bavila određivanjem MMP-2 i MMP-9 u krvi djece sa VSD-om, govori o njihovoj ulozi u nastanku i zatvaranju VSD-a [8].

Rijetka su istraživanja uloge MMP u patogenezi kongenitalnih anomalija uopšte, a posebno anomalija kardiovaskularnog sistema, koja su koristila urin ispitanika. Pregledom literature, našli smo jedan takav rad koji govori o ulozi MMP u nastanku vaskularnih anomalija [125]. Međutim, nismo našli da je do sada objavljena studija koja se bavila ispitivanjem uloge MMP i njihovih tkivnih inhibitora u kongenitalnim srčanim anomalijama korištenjem urina ispitanika. Najveća prednosti određivanja ovih parametara iz urina je neinvazivan način dobijanja uzorka, što je posebno važno kod male djece kod koje su ovakva istraživanja posebno značajna.

2. HIPOTEZA

Postavljene su sljedeće hipoteze rada:

1. U urinu djece sa VSD-om je viši nivo MMP-2, MMP-9, TIPM-1 i TIMP-2 u odnosu na zdravu djecu.
2. Postoji pozitivna korelacija nivoa MMP-2, MMP-9, TIPM-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om i veličine defekta.
3. Nivoi MMP-2, MMP-9, TIPM-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om se razlikuju zavisno od toga da li je došlo do spontanog zatvaranja defekta ili ne, te da li je postojala PAH.

3. CILJEVI RADA

Osnovni cilj ovog istraživanja je bio utvrditi značaj MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u etiopatogenezi VSD-a korištenjem urina ispitanika.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti razliku u nivou MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om i zdrave djece.
2. Odrediti korelaciju između nivoa MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om i veličine VSD-a.
3. Odrediti razliku u nivoima MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece kod koje je došlo do spontanog zatvaranja VSD-a i djece kod koje se defekt nije zatvorio.
4. Odrediti razlike u nivoima MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om zavisno od tipa i lokacije VSD-a i postojanja PAH.
5. Odrediti razlike u nivoima MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om zavisno od pola, gestacijske starosti i uhranjenosti na rođenju.

4. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je predstavljalo prospektivnu studiju i sprovedeno je u Klinici na dječije bolesti u Univerzitetskom kliničkom centru Republike Srpske u periodu od 2017. do 2020. godine i u Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci 2021. godine. Uključivalo je grupu djece sa VSD-om i grupu zdrave djece.

4.1. FAZE ISTRAŽIVANJA

1. Odabir i uključivanje ispitanika u istraživanje
2. Uzimanje i čuvanje uzoraka urina ispitanika
3. Određivanje koncentracija MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika
4. Praćenje ispitanika
5. Statistička obrada prikupljenih podataka.

4.2. ISPITANICI

U istraživanje je inicijalno bilo uključeno 80 djece mlađe od godinu dana. U trećoj fazi istraživanja isključeno je 8 djece zbog tehnički neadekvanih uzoraka urina, tako da je konačan broj ispitanika u istraživanju bio 72. Eksperimentalnu grupu činilo je 52 djece sa VSD-om, a kontrolnu grupu 20 zdrave djece. Svaki je ispitanik, odnosno njegov roditelj ili staratelj, nakon što je bio detaljno informisan o ciljevima i načinu izvođenja istraživanja, dao svoju pismenu saglasnost za učešće djeteta u istraživanju.

Kod djece kod koje je auskultacijom postavljena sumnja na urođenu srčanu manu, urađen je ehokardiografski pregled u cilju identifikacije ispitanika koji ispunjavaju kriterijume za ulazak u istraživanje. Nakon dobijanja pismene saglasnosti roditelja, odnosno staratelja, uzeti su anamnestički podaci, izvršena su antropometrijska mjerenja i ispitanici su bili pregledani od strane kliničkog genetičara (istraživača).

Ulazni kriterijumi za uključivanje ispitanika eksperimentalne grupe u istraživanje:

- a) postavljena dijagnoza izolovanog VSD-a ehokardiografskim pregledom
- b) nepostojanje udruženih anomalija, znakova koji bi ukazivali na hromozomopatije i genopatije i druge bolesti

c) dob ispitanika manja od godinu dana.

Ispitanici koji su ispunjavali kriterijume, uključivani su u studiju redom postavljanja dijagnoze.

Ulazni kriterijumi za uključivanje ispitanika kontrolne grupe u istraživanje:

- a) nepostojanje znakova bolesti i anomalija
- b) normalan nalaz ehokardiografskog pregleda
- c) dob ispitanika manja od godinu dana.

Kod odabira ispitanika kontrolne grupe, vodilo se računa da se kontrolna grupa po opštim karakteristikama ispitanika značajno ne razlikuje od eksperimentalne.

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz istraživanja:

- a) veliki VSD ($VSD/Ao > 0,66$ mm), zbog male mogućnosti da dođe do njegovog spontanog zatvaranja i velike vjerovatnoće da će biti potrebno rano operativno liječenje
- b) VSD *inlet* ili *outlet* tipa, zbog male mogućnosti da dođe do njegovog spontanog zatvaranja i velike vjerovatnoće da će biti potrebno rano operativno liječenje
- c) VSD udružen sa drugim anomalijama srca i velikih krvnih sudova (sa izuzetkom ASD tip FOA zbog njegove visoke učestalosti u opštoj populaciji od 20-34% i najčešće asimptomatske pojave [126])
- d) VSD udružen sa velikim anomalijama drugih organa i organskih sistema, hromozomopatijama i genopatijama (dokazanim ili visoko sumnjivim)
- e) tehnički neadekvatni uzorci urina
- f) ispitanici bez pismene saglasnosti za učešće u istraživanju.

U vrijeme postavljanja dijagnoze i uzimanja uzorka urina ispitanika, na bazi strukturisanog upitnika, zabilježeni su sljedeći podaci o ispitaniku:

- a) pol
- b) dob (u danima) u vrijeme postavljanja dijagnoze
- c) gestacijska starost (u nedjeljama i danima)
- d) porođajna tjelesna masa (PTM) u gramima (g)
- e) porođajna tjelesna dužina (PTD) u centimetrima (cm).

Podjelu ispitanika izvršili smo na više načina:

1. Prema veličini VSD:

- a) ispitanici sa trivijalnim VSD-om
 - b) ispitanici sa malim VSD-om
 - c) ispitanici sa srednjim VSD-om.
2. Prema lokaciji defekta u ventrikularnom septumu:
- a) ispitanici sa apikalnim mišićnim VSD-om
 - b) ispitanici sa srednjim mišićnim VSD-om
 - c) ispitanici sa prednjim mišićnim VSD-om
 - d) ispitanici sa perimembranoznim VSD-om.
3. Prema broju defekta:
- a) ispitanici sa jednim VSD-om
 - b) ispitanici sa multiplim VSD-om.
4. Prema postojanju PAH-e:
- a) ispitanici bez PAH-e
 - b) ispitanici sa PAH-om.
5. Prema tome da li je došlo do spontanog zatvaranja VSD-a:
- a) ispitanici kod kojih se VSD spontano zatvorio
 - b) ispitanici kod kojih se VSD nije spontano zatvorio.
6. Prema polu ispitanika:
- a) ispitanici muškog pola
 - b) ispitanici ženskog pola.
7. Prema gestacijskoj starosti ispitanika:
- a) terminski ispitanici
 - b) preterminalski ispitanici.
8. Prema uhranjenosti na rođenju ispitanika:
- a) hipotrofični ispitanici
 - b) eutrofični ispitanici.

4.3. METODE RADA

4.3.1. Ehokardiografija

VSD je otkrivan konvencionalnom dvodimenzionalnom *color doppler* ehokardiografijom koju su izvodili pedijatri-kardiolozi u Klinici za dječije bolesti u Univerzitetском kliničkom centru Republike Srpske uz pomoć komercijalno dostupnog aparata *GE Healthcare - Vivid 4* i linearne sonde od 5 MHz (Slika 6). Pregledi su vršeni u ambulantnim ili bolničkim uslovima, kod budnog ili spontano uspavanog djeteta, a indikacija za pregled je bila auskultacijom postavljena sumnja na urođenu srčanu manu.



Slika 6. Dvodimenzionalni *color doppler* ehokardiografski aparat *GE Healthcare - Vivid 4*

Uz pomoć ehokardiografije kompletno je bio vizuelizovan ventrikularni septum, utvrđeni su lokacija, broj i veličina defekata, veličina aortnog prstena, postojanje ili ne PAH-e i isključene su udružene anomalije srca i velikih krvnih sudova. Određeno je da li se defekt nalazi u mišićnom ili perimembranoznom dijelu septuma, a za defekte u mišićnom dijelu septuma je određeno da li se nalaze u srednjem, apikalnom, posteriornom ili prednjem njegovom dijelu. Veličina defekta je mjerena u svim ravnima i zabilježen je njegov najveći prečnik, izražen u milimetrima (mm). U slučaju da se radilo o multiplim defektima, u razmatranje se uzimala veličina najvećeg. Veličina aortnog prstena, tj. njegov prečnik (Ao), mjerena je na nivou valvule i izražen je u milimetrima (mm).

Na osnovu odnosa prečnika VSD-a i prečnika aortnog prstena (VSD/Ao), VSD je klasifikovan kao:

- a) trivijalan ($VSD/Ao \leq 0,25 \text{ mm}$)
- b) mali ($0,25 \text{ mm} < VSD/Ao \leq 0,33 \text{ mm}$)
- c) srednji ($0,33 \text{ mm} < VSD/Ao \leq 0,66 \text{ mm}$).

Svi ispitanici su bili periodično praćeni od strane pedijatra-kardiologa do zatvaranja VSD-a (spontanog ili hirurškog) ili do kraja prve godine života. Ovaj period praćenja je izabran za studiju s obzirom da se većina VSD-a zatvori tokom prve godine života [20]. Na kontrolnim pregledima bilježeno je da li se VSD zatvorio i da li postoji PAH. Defekt se smatrao spontano zatvorenim ako uz pomoć ehokardiografije nije uočen i ako *color doppler*-om nije viđen mlaz krvi na mjestu prethodno postojećeg defekta.

4.3.2. Klinički pregled i genetička obrada ispitanika

Ispitanici kod kojih je ehokardiografijom utvrđen VSD (ispitanici eksperimentalne grupe), odnosno ispitanici kod kojih je on isključen (ispitanici kontrolne grupe), i kojima su isključene druge anomalije srca i velikih krvnih sudova, sa ciljem da se isključe i druge bolesti, anomalije, hromozomopatije i znaci koji bi ukazivali na genopatije, bili su pregledani od strane pedijatra-kliničkog genetičara (istraživača), a jednom broju su urađeni i ultrazvučni pregledi mozga, organa abdomena i male karlice i citogenetička analiza iz limfocita periferne krvi.

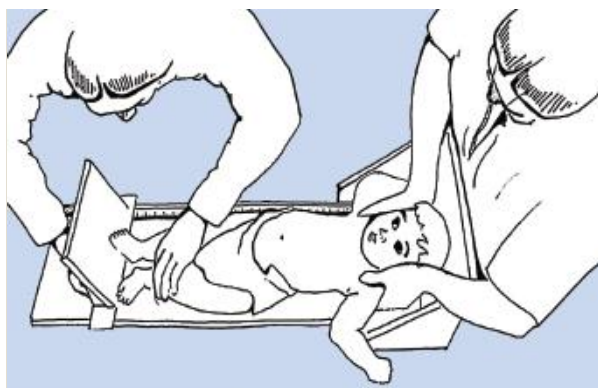
4.3.3. Antropometrijska mjerenja

PTM i PTD ispitanika mjerene su na standardan način neposredno po rođenju. Za određivanje PTM korištena je mehanička medicinska vaga *Libela Maxima* sa tačnošću do 5 grama (Slika 7).



Slika 7. Mehanička medicinska vaga

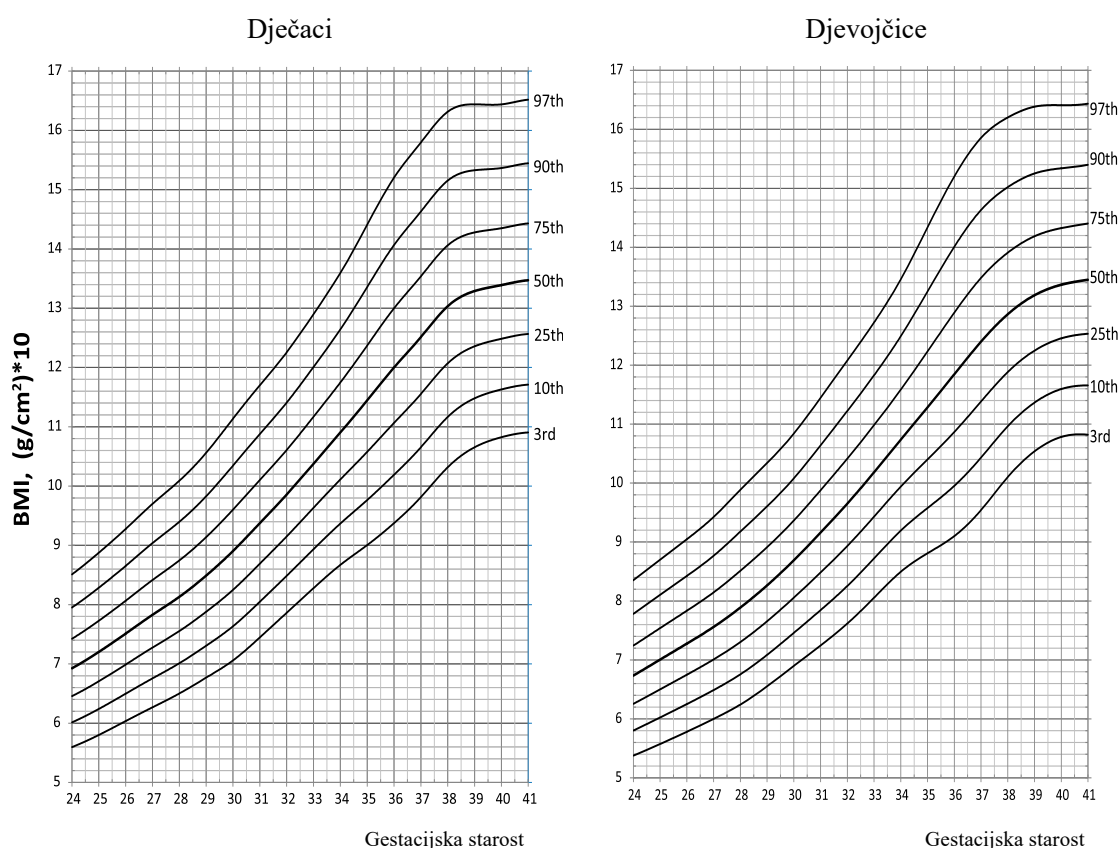
PTD ispitanika mjerena je uz pomoć drvene platforme sa mjernom trakom, sa preciznošću do 1 mm. Na gornjoj i donjoj strani korištene platforme nalaze se okomito postavljene dvije ploče. Gornja ploča je fiksna i nju dodiruje vrh glave djeteta. Donja ploča (podnožje) je pomična i na nju se postavje djetetova stopala tako da je čvrsto dodiruju cijelom dužinom. Na djetetova koljena primjenjuje se blagi pritisak kako bi se noge držale optuženima. Za dužinu djeteta uzima se rastojanje od gornje do donje ploče koje se očitava na mjernoj traci na platformi (Slika 8).



Slika 8. Mjerenje PTD djeteta pomoću platforme sa mjernom trakom

Koristeći PTM i PTD, računali smo indeks tjelesne mase (BMI - engl. *body mass index*) ispitanika na rođenju prema *Quetelet*-ovoj formuli: $BMI (g/cm^2) = PTM (g) / PTD^2 (cm^2)$.

Na osnovu dobijene vrijednosti BMI, koristeći adaptirane *Olsen*-ove percentilne krivulje (Slika 9) [127], procijenili smo uhranjenost djeteta na rođenju. Ispitanici sa BMI ispod desete percentile smatrali su se hipotrofičnim, između desete i devedesete percentile eutrofičnim i preko devedesete percentile hipertrofičnim na rođenju.



Slika 9. *Olsen*-ove percentilne krivulje: BMI za pol i gestacijsku starost djeteta (prilagođeno) [127]

4.3.4. Prikupljanje, skladištenje i transport uzoraka

Za ovo istraživanje koristili smo jutarnji urin ispitanika koji smo nastojali uzeti u što kraćem vremenskom periodu od postavljanja dijagnoze VSD-a. Uzorci urina bili su pohranjeni u staklene bočice od 6 ml s gumenim čepom i aluminijumskim poklopcem i označeni brojevima. Na njima se nisu nalazili lični podaci ispitanika, a spisak sa imenima ispitanika i brojevima je bio zaključan u privatnom sefu istraživača. Kako se radi o analizama za koje su

potrebni kitovi čija je cijena visoka, nije bilo moguće svaki uzorak zasebno analizirati neposredno po uzimanju, već su uzorci bili skupljani i skladišteni na temperaturi od -18°C do -20°C do transporta u laboratoriju. Transport uzoraka vršen je na ledu i u trostrukom pakovanju prema propisima Ujedinjenih nacija za transport biološke supstancije B kategorije [128].

4.3.5. Određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika

Određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika vršeno je u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Rijeci metodom enzimskog imunoeseja tzv. *ELISA* (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Od materijala korišteni su specijalni i visoko selektivni *ELISA* kitovi proizvedeni tačno za tu namjenu (engl. *RayBio® Human MMP-2 ELISA*, *RayBio® Human MMP-9 ELISA*, *RayBio® Human TIMP-1 ELISA* i *RayBio® Human TIMP-2 ELISA*).

U laboratoriji uzorci su stavljeni na sobnu temperaturu u periodu inkubacije od 30 min. Nakon pripreme za analizu standarde (*RayBio®*) i uzorke urina pipetirali smo mikro-pipetama u jamice specijalne mikrotitarske ploče (engl. *Microplate; Item A; RayBio®*) tretirane sa odgovarajućim humanim antitijelima (*anti-human MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2*). Proaktivna i aktivna forma enzima iz uzoraka vezala se za antitijela na zidovima jamica. Nakon što smo jamice isprali, u njih smo dodali biotinizirana enzimska antitijela za detekciju MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u uzorku urina (engl. *Detection Antibody MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2; Item F; Item F; The RayBio®*) i inkubirali sat vremena na sobnoj temperaturi. Iz jamica smo potom isprali nevezana antitijela i u svaku dodali po 100 µl rastvora streptavidina, koji je sastavni dio *ELISA* kita, i inkubirali 45 minuta. Zatim smo jamice isprali i dodali TMB (tetrametilbenzidin; *RayBio®*) supstrat za bojenje u plavu boju svih reakcija u kojima su se za prisutna antitijela vezale proaktivne i aktivne forme enzima u uzorku. U posljednjoj fazi dodali smo rastvor za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*), koji je takođe sastavni dio *ELISA* kita, koji mijenja boju reakcije iz plave u žutu. Odmah nakon dodavanja ovog rastvora, na specijalnom čitaču apsorbancije (*TECAN-sunrise*, Austria) pri 450 nm očitali smo intenzitet žute boje koji je proporcionalan apsorbanciji prisutnih proaktivnih i aktivnih formi enzima. Svi standardi, uzorci i slijepe probe radili su se u duplikatu. Koristili smo *Magellan software* za određivanje srednje vrijednosti apsorbancije za svaki standard, uzorak i slijepu probu (Slika 10).



Slika 10. Slikovni prikaz faza *ELISA* metode za određivanje MMP-a i TIMP-a u urinu [129, 130].

4.4. Statistička obrada prikupljenih podataka

Dobijeni podaci su statistički obrađeni uz pomoć programa *Statistica 12* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Za prikaz kvantitativnih podataka korišteni su pokazatelji deskriptivne statistike (broj ispitanika, procentualna zastupljenost, aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, ekstremne vrijednosti, kvartili i medijana). Za upoređivanje razlika u učestalosti posmatranih obilježja prema različitim pokazateljima, korišteni su Hi-kvadrat test i Fisherov *exact*-ni test. Za izračunavanje razlika između pojedinih grupa ispitanika, korišteni su neparametrijski Mann-Whitney U test, koji je karakterističan za dva mala nezavisna uzorka, ili neparametarski Kruskal-Wallis ANOVA test za više nezavisnih

uzoraka. Korelacije između dvije varijable određivali smo uz pomoć Pirsonovog koeficijenta korelacije. Za statistički značajnu razliku između različitih grupa ispitanika uzeta je značajnost manja od 0,05. Grafički rezultati su napravljeni u kompjuterskim programima *Microsoft® Excel for Windows*, *Microsoft® Excel for Mac* i *GraphPad Prism 8.0.0 for Mac*.

4.5. Etički aspekti

Istraživanjem je bilo sprovedeno uz poštovanje osnovnih etičkih i bioetičkih principa kao što su lični integritet (autonomnost), pravednost, dobronamjernost i neškodljivost, u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Svaki je ispitanik, odnosno njegov roditelj ili staratelj, bio detaljno informisan u usmenoj i pismenoj formi o ciljevima istraživanja i svim metodama koje će se upotrebljavati, a koje su u skladu sa strogim kriterijima koje dopušta etički kodeks za biomedicinska istraživanja, nakon čega je dobijena njihova pismena saglasnost za učešće djeteta u istraživanju.

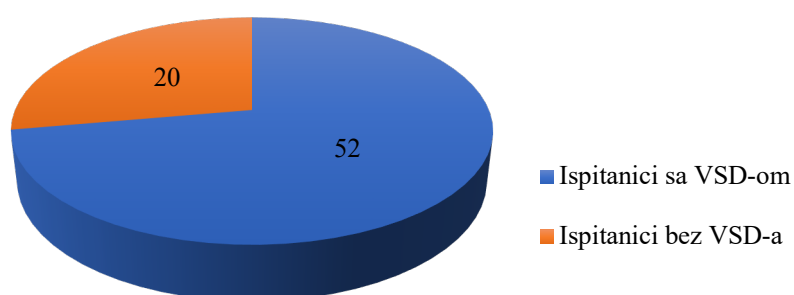
Preliminarni projekat istraživanja odobrili su Etički odbor Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (rješenje broj:01-9-396-2/17) i Etički odbor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (rješenje broj: 18/4.17/17).

5. REZULTATI

5.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

5.1.1. Distribucija ispitanika prema prisustvu VSD-a

U ovom istraživanju su učestvovala 72 ispitanika koji su bili podijeljeni u dvije grupe. Eksperimentalnu grupu činila su 52 (72,22%) ispitanika koji su imali VSD, a kontrolnu grupu 20 (27,78%) zdravih ispitanika (ispitanici bez VSD-a) (Slika 11).



Slika 11. Struktura ispitanika u istraživanju prema prisustvu VSD-a

5.1.2. Starosna struktura

U vrijeme uzimanja uzorka urina, prosječna starosna dob ispitanika sa VSD-om iznosila je 31,92 dana ($\pm 59,91$ SD), a ispitanika bez VSD-a 34,60 dana ($\pm 76,22$ SD), što nije statistički značajna razlika ($p=0,47$) (Tabela 1).

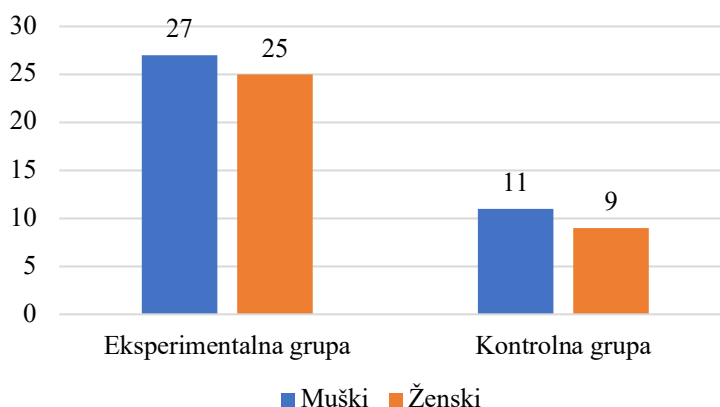
Tabela 1. Starosna dob ispitanika u istraživanju

	Eksperimentalna grupa (N=52)			Kontrolna grupa (N=20)		
	M	SD	Raspon	M	SD	Raspon
Starosna dob	31,92	59,91	243	34,60	76,22	334

Mann-Whitney U test: $U=462,50$, $Z=-0,72$, $p=0,474$, $p>0,05$; N - broj ispitanika, M - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija

5.1.3. Polna struktura

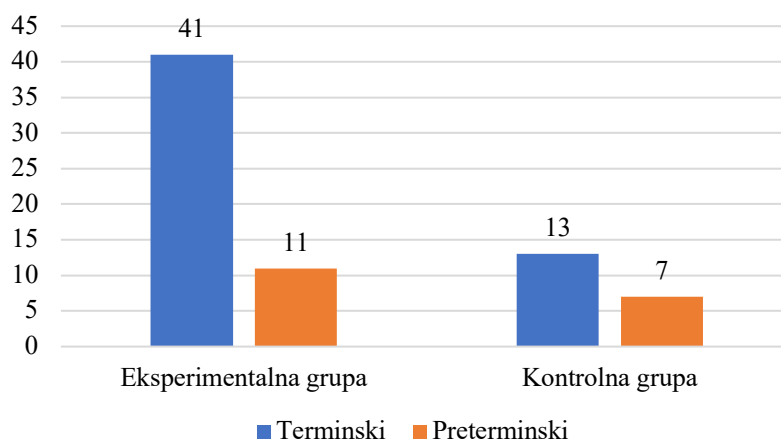
U eksperimentalnoj grupi bilo je 27 (51,92%) muških i 25 (48,08%) ženskih ispitanika, dok je u kontrolnoj grupi muških ispitanika bilo 11 (55%), a ženskih 9 (45%) (Slika 12), što nije statistički značajna razlika (hi-kvadrat=0; $p=0,98$).



Slika 12. Distribucija ispitanika prema polu

5.1.4. Gestacijska starost

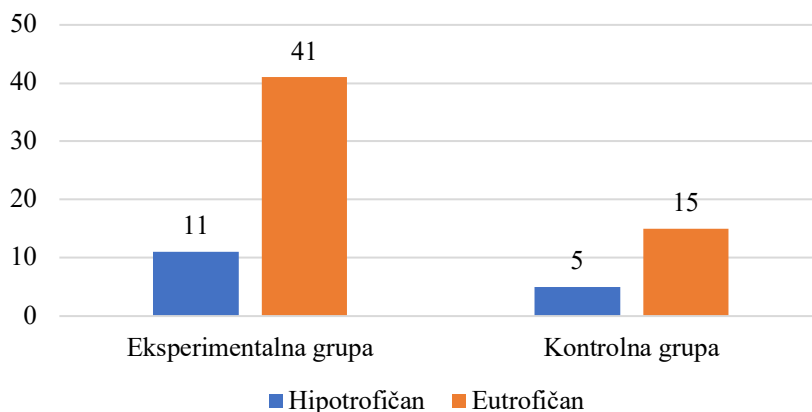
U eksperimentalnoj grupi 41 ispitanik (78,85%) je rođen u terminu (terminski ispitanici), a 11 ispitanika (21,15%) je rođeno prije termina (preterminski ispitanici). U kontrolnoj grupi, terminskih ispitanika je bilo 13 (65%), a preterminskih 7 (35%) (Slika 13). Distribucija ispitanika prema gestacijskoj starosti nije se statistički značajno razlikovala u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi (hi-kvadrat=0,83; $p=0,36$).



Slika 13. Distribucija ispitanika prema gestacijskoj starosti

5.1.5. Uhranjenost na rođenju

U eksperimentalnoj grupi 41 ispitanik (78,85%) je na rođenju bio normalno uhranjen (eutrofični ispitanici), a 11 ispitanika (21,15%) je imalo malu težinu (hipotrofični ispitanici), dok je u kontrolnoj grupi eutrofičnih ispitanika bilo 15 (75%), a hipotrofičnih 5 (25%) (Slika 14), što nije statistički značajna razlika (hi-kvadrat =0,12; p=0,73). U našem istraživanju nije bilo hipertrofičnih ispitanika.

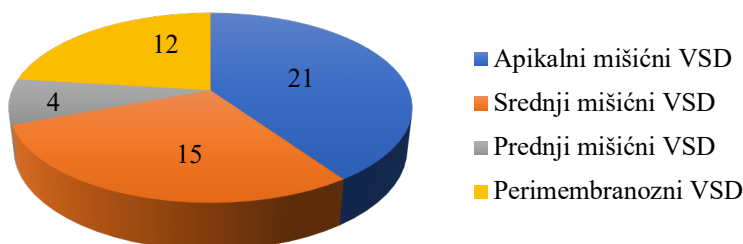


Slika 14. Distribucija ispitanika prema uhranjenosti na rođenju

5.2. DISTRIBUCIJA ISPITANIKA PREMA KARAKTERISTIKAMA VSD-a

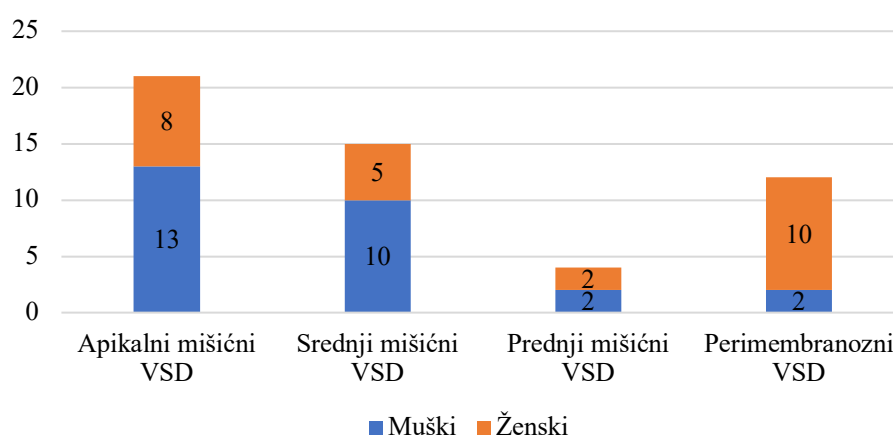
5.2.1. Distribucija ispitanika prema lokaciji VSD-a

VSD u različitim dijelovima mišićnog septuma imalo je 40 (76,92%), a u perimembranoznom dijelu 12 (23,08%) ispitanika. VSD u apikalnom dijelu mišićnog septuma imao je 21 ispitanik ili 40,38%, u srednjem dijelu mišićnog septuma 15 ili 28,85% i u prednjem dijelu mišićnog septuma 4 ili 7,69% ukupnog broja ispitanika (Slika 15). Niti jedan ispitanik u našem istraživanju nije imao defekt u zadnjem dijelu mišićnog septuma.

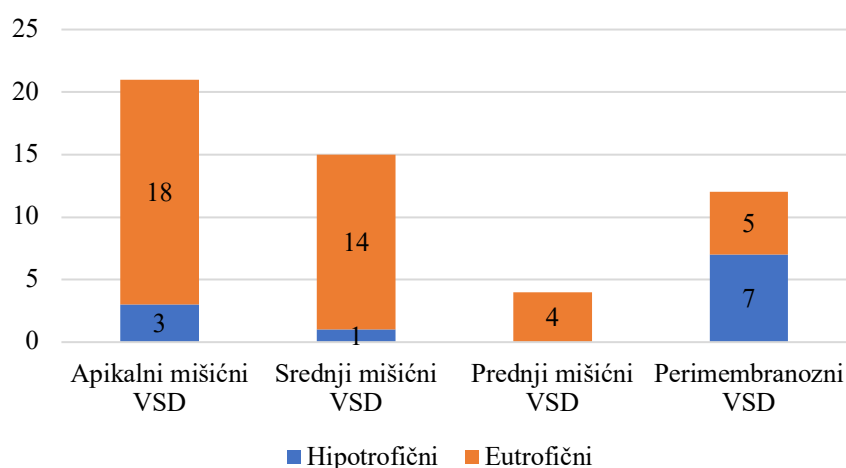


Slika 15. Distribucija ispitanika sa prema lokaciji VSD-a

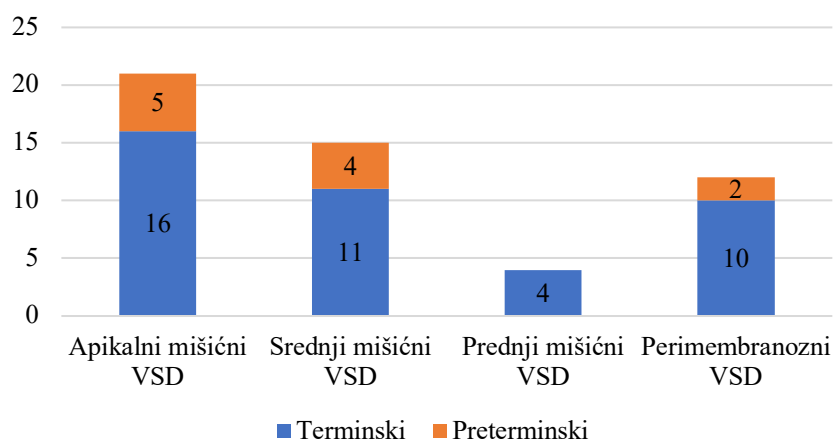
Postojala je statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema polu (hi-kvadrat=8,13; $p=0,04$) i prema uhranjenosti na rođenju (hi-kvadrat=13,50; $p=0,00$) između grupa koje se razlikuju po lokaciji VSD-a. U grupi ispitanika sa perimembranoznim defektom bilo je više ženskih i hipotrofičnih ispitanika, dok je u grupama sa defektom u mišićnom dijelu septuma bilo više muških i eutrofičnih ispitanika (Slike 16 i 17). Nije bilo razlike u gestacijskoj starosti ispitanika između grupa sa različitom lokacijom VSD-a (hi-kvadrat=1,58; $p=0,663$) (Slika 18).



Slika 16. Polna distribucija ispitanika između grupa koje se razlikuju po lokaciji VSD-a



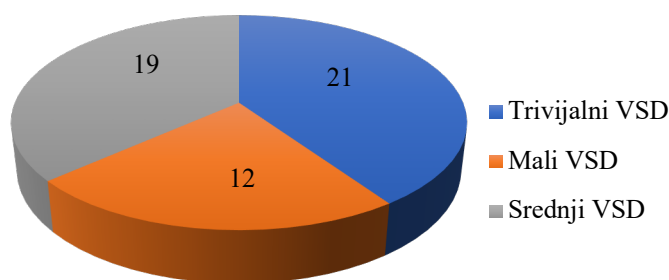
Slika 17. Distribucija ispitanika prema uhranjenosti na rođenju između grupa koje se razlikuju po lokaciji VSD-a



Slika 18. Distribucija ispitanika prema gestacijskoj starosti između grupa koje se razlikuju po lokaciji VSD-a

5.2.2. Distribucija ispitanika prema veličini VSD-a (VSD/Ao)

Trivijalan VSD ($VSD/Ao \leq 0,25$ mm) imao je 21 ispitanik (40,38%), mali VSD ($0,25 \text{ mm} < VSD/Ao \leq 0,33$ mm) 12 ispitanika (23,08%) i srednji VSD ($0,33 \text{ mm} < VSD/Ao \leq 0,66$ mm) 19 ispitanika (36,54%) (Slika 19). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema starosnoj dobi ($p=0,15$), polu ($p=0,56$), gestacijskoj starosti ($p=0,19$) i uhranjenost na rođenju ($p=0,61$) između grupa koje se razlikuju po veličini VSD-a (Tabele 2 i 3).



Slika 19. Distribucija ispitanika prema veličini VSD-a

Prosječna veličina defekta, izražena kao odnos VSD/Ao , u vrijeme postavljanja dijagnoze iznosila je $0,32 \text{ mm} \pm 0,13$ SD (raspon 0,57). Prosječna veličina apikalnog mišićnog defekta iznosila je $0,26 \text{ mm} \pm 0,08$ SD (raspon 0,3), srednjeg mišićnog defekta $0,31 \text{ mm} \pm 0,10$ SD (raspon 0,22), prednjeg mišićnog defekta $0,20 \text{ mm} \pm 0,06$ SD (raspon 0,27) i perimembranoznog defekta $0,49 \text{ mm} \pm 0,13$ SD (raspon 0,44). Kruskal-Wallis ANOVA testom

utvrdili smo da je bila značajna razlika u veličini između apikalnih mišićnih i srednjih mišićnih ($p=0,03$), apikalnih mišićnih i perimembranoznih ($p=0,00$) i apikalnih mišićnih i perimembranoznih ($p=0,00$) defekata.

Tabela 2. Distribucija ispitanika prema starosnoj dobi između grupa koje se razlikuju po veličini VSD-a

Ispitanici		VSD		
		Trivijalni	Mali	Srednji
N		21	12	19
Dob (dani)	Sum of Ranks	660,5	279	438,5
	Mean Rank	31,45	23,25	23,07

Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=52)=3,76, p=0,152; p>0,05$; N - broj ispitanika

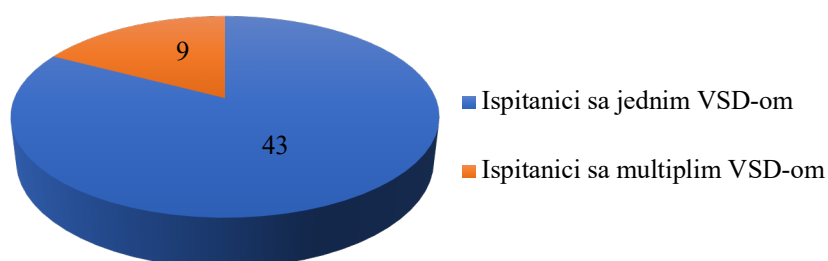
Tabela 3. Distribucija ispitanika prema polu, gestacijskoj starosti i uhranjenosti na rođenju između grupa koje se razlikuju po veličini VSD-a

Ispitanici			VSD				hi- kvadrat	p
			Trivijalni	Mali	Srednji	Ukupno		
Pol	Muški	N	12	7	8	27	1,16	0,56
		%	57,14%	58,33%	42,11%	51,92%		
	Ženski	N	9	5	11	25		
		%	42,86%	41,67%	57,89%	48,08%		
GS	Terminski	N	14	10	17	41	3,30	0,19
		%	66,67%	83,33%	89,47%	78,85%		
	Preterminski	N	7	2	2	11		
		%	33,33%	16,67%	10,53%	21,15%		
Uhr. na rođenju	Hipotrofični	N	3	3	5	11	1,00	0,61
		%	14,29%	25%	26,32%	21,15%		
	Eutrofični	N	18	9	14	41		
		%	85,71%	75%	73,68%	78,85%		
Ukupno		N	21	12	19	52		
		%	40,38%	23,08%	36,54%	100%		

Hi-kvadrat test; N - broj ispitanika; GS - gestacijska starost

5.2.3. Distribucija ispitanika prema broju VSD-a

Među ispitanicima eksperimentalne grupe, 43 (82,69%) su imala jedan VSD, a 9 (17,31%) multipli VSD (Slika 20). Utvrdili smo da se grupe sa različitim brojem defekata statistički značajno ne razlikuju po polu ($p=0,09$), gestacijskoj starosti ($p=0,38$) i uhranjenosti na rođenju ($p=0,38$) ispitanika (Tabela 4).



Slika 20. Distribucija ispitanika prema broju VSD-a

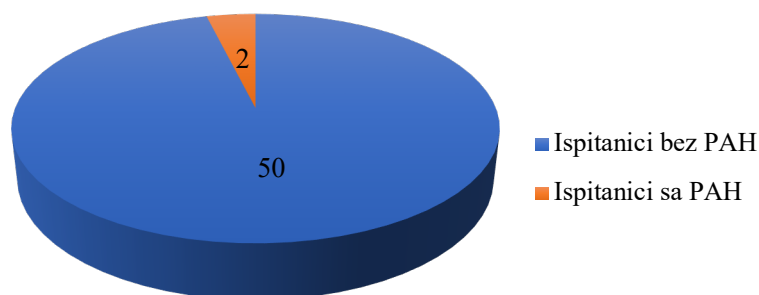
Tabela 4. Distribucija ispitanika prema polu, gestacijskoj starosti i uhranjenosti na rođenju između grupa koje se razlikuju po broju VSD-a

		Jedan VSD	Multipli VSD	Ukupno	p
		N (%)	N (%)	N (%)	
Pol	Muški	20 (46,51%)	7 (77,78%)	27 (51,92%)	0,089
	Ženski	23 (53,49%)	2 (22,22%)	25 (48,08%)	
Gestacijska starost	Terminski	33 (76,74%)	8 (88,89%)	41 (78,85%)	0,381
	Preterminski	10 (23,26%)	1 (11,11%)	11 (21,15%)	
Uhranjenost na rođenju	Hipotrofični	10 (23,26%)	1 (11,11%)	11 (21,15%)	0,381
	Eutrofični	33 (76,74%)	8 (88,89%)	41 (78,85%)	
Ukupno		43 (82,69%)	9 (17,31%)	52 (100%)	

Fisher *exact* test; N - broj ispitanika

5.2.4. Distribucija ispitanika prema postojanju PAH

Među ispitanicima eksperimentalne grupe, 2 (3,85%) su imala PAH, dok kod 50 (96,15%) ona nije zabilježena (Slika 21). U oba slučaja radilo se o ispitanicima sa srednjim VSD-om. Utvrdili smo da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema polu ($p=0,74$), gestacijskoj starosti ($p=0,62$) i uhranjenosti na rođenju ($p=0,38$) između grupe ispitanika bez i grupe ispitanika sa PAH (Tabela 5).



Slika 21. Distribucija ispitanika prema postojanju PAH

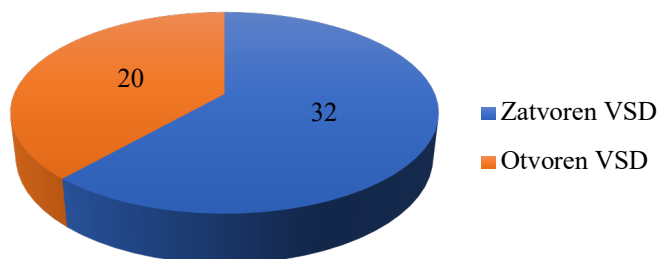
Tabela 5. Distribucija ispitanika prema polu i gestacijskoj starosti zavisno od PAH

		Ispitanici bez PAH N (%)	Ispitanici sa PAH N (%)	Ukupno N	p
Pol	Muški	26 (96,30%)	1 (3,70%)	27	0,735
	Ženski	24 (96,00%)	1 (4,00%)	25	
Gestacijska starost	Terminski	39 (95,12%)	2 (4,88%)	41	0,618
	Preterminski	11 (100,00%)	0 (0,00%)	11	
Uhranjenost na rođenju	Hipotrofični	10 (90,91%)	1 (9,09%)	11	0,382
	Eutrofični	40 (97,56%)	1 (2,44%)	41	
Ukupno		50 (96,15%)	2 (3,85%)	52	

Fisher *exact* test; N - broj ispitanika, PAH - plućna arterijska hipertenzija

5.2.5. Distribucija ispitanika zavisno od spontanog zatvaranja VSD-a

Od 52 ispitanika sa VSD-om, defekt se spontano zatvorio u prvoj godini života kod 32 (61,54%), a kod 20 (38,46%) ostao je otvoren (Slika 22).



Slika 22. Distribucija ispitanika prema spontanom zatvaranju VSD-a

Utvdili smo da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema polu ($p=0,31$), gestacijskoj starosti ($p=0,31$) i uhranjenosti na rođenju ($p=0,57$) između grupe ispitanika kod kojih se defekt spontano zatvorio i grupe u kojoj je on ostao otvoren (Tabela 6).

Tabela 6. Distribucija ispitanika prema polu, gestacijskoj starosti i uhranjenosti na rođenju između grupa koje se razlikuju po spontanom zatvaranju VSD-a

		Zatvoren VSD	Otvoren VSD	Ukupno	p
		N (%)	N (%)	N	
Pol	Muški	18 (66,67%)	9 (33,33%)	27	0,307
	Ženski	14 (56,00%)	11 (44,00%)	25	
Gestacijska starost	Terminski	24 (58,53%)	17 (41,47%)	41	0,310
	Pretermijski	8 (72,73%)	3 (27,28%)	11	
Uhranjenost na rođenju	Hipotrofični	6 (18,75%)	5 (25,00%)	11	0,574
	Eutrofični	26 (81,25%)	15 (75,00%)	41	
Ukupno		32 (61,54%)	20 (38,46%)	52	

Fisher *exact* test; N - broj ispitanika

Razlika u distribuciji ispitanika prema veličini VSD-a između grupe ispitanika kod kojih se defekt spontano zatvorio i grupe u kojoj je defekt ostao otvoren bila je statistički značajna

(hi-kvadrat=12,52; $p=0,00$). Najveća stopa spontanog zatvaranja defekta bila je u grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om (85,71%), zatim sa malim VSD-om (66,67%), a najmanja sa srednjim VSD-om (31,58%) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribucija ispitanika prema veličini defekta između grupa koje se razlikuju po spontanom zatvaranju VSD-a

	Zatvoren VSD	Otvoren VSD	Ukupno
	N (%)	N (%)	N
Trivijalni	18 (85,71%)	3 (14,29%)	21
Mali	8 (66,67%)	4 (33,33%)	12
Srednji	6 (31,58%)	13 (68,42%)	19
<i>Ukupno</i>	32 (61,54%)	20 (38,46%)	52

Hi-kvadrat test: hi-kvadrat=12,52, $p=0,002$; $p<0,05$; N - broj ispitanika

Statistički se značajno razlikovala distribucija ispitanika prema lokaciji VSD-a (hi-kvadrat=14,66; $p=0,00$) između grupe ispitanika kod kojih se defekt spontano zatvorio i grupe u kojoj je defekt ostao otvoren. Najveće stope spontanog zatvaranja defekta bile su u grupi ispitanika sa apikalnim mišićnim VSD-om (80,95%) i grupi sa srednjim mišićnim VSD-om (73,33%). Najmanja stopa spontanog zatvaranja defekta bila je u grupi sa perimembranoznim VSD-om (16,67%) (Tabela 8).

Tabela 8. Distribucija ispitanika prema lokaciji defekta između grupa koje se razlikuju po spontanom zatvaranju VSD-a

	Zatvoren VSD	Otvoren VSD	Ukupno
	N (%)	N (%)	N
Apikalni mišićni	17 (80,95%)	4 (19,05%)	21
Srednji mišićni	11 (73,33%)	4 (26,67%)	15
Prednji mišićni	2 (50,00%)	2 (50,00%)	4
Perimembranozni	2 (16,67%)	10 (83,33%)	12
<i>Ukupno</i>	32 (61,54%)	20 (38,46%)	52

Hi-kvadrat test: hi-kvadrat=14,66, $p=0,002$; $p<0,05$; N - broj ispitanika

U slučaju jednog VSD-a, njegovo spontano zatvaranje je zabilježeno kod 65,12%, a u slučaju multiplog VSD-a u 44,44% slučajeva, što nije statistički značajna razlika (hi-kvadrat=1,34; p=0,25) (Tabela 9). U oba slučaja kod kojih je postojala PAH nije došlo do spontanog zatvaranja VSD-a.

Tabela 9. Distribucija ispitanika prema broju defekata između grupa koje se razlikuju prema spontanom zatvaranju VSD-a

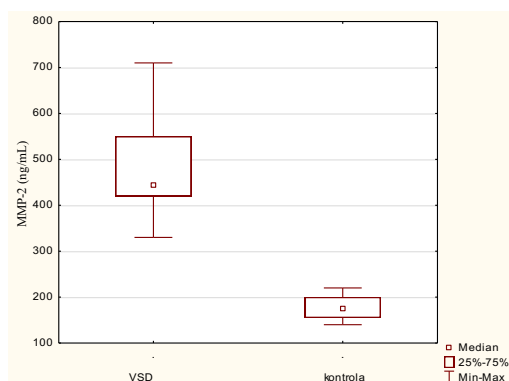
	Zatvoren VSD	Otvoren VSD	Ukupno
	N (%)	N (%)	N
Jedan	28 (65,12%)	15 (34,88%)	43
Multipli	4 (44,44%)	5 (55,56%)	9
<i>Ukupno</i>	32 (61,54%)	20 (38,46%)	52

Hi-kvadrat test: hi-kvadrat=1,34, p=0,246, p>0,05; N - broj ispitanika

5.3. MMP-2

5.3.1. Vrijednosti MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om

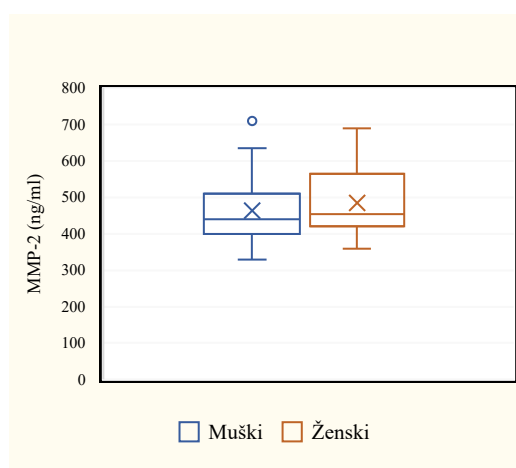
U urinu ispitanika sa VSD-om, korištenjem Mann-Whitney U testa, utvrdili smo statistički značajno veću koncentraciju MMP-2 u odnosu na njenu koncentraciju u urinu ispitanika kontrolne grupe ($U=0$; $Z=6,53$; $p=0,00$) (Slika 23).



Slika 23. Vrijednost MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om u poređenju sa kontrolnom grupom

5.3.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na pol ispitanika

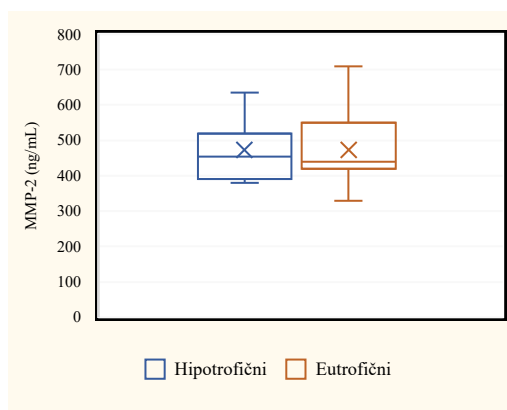
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da koncentracije MMP-2 u grupi ispitanika sa VSD-om nisu bile statistički značajno različite kod ispitanika ženskog u odnosu na ispitanike muškog pola ($U=286$; $Z=-0,93$; $p=0,18$) (Slika 24). U kontrolnoj grupi takođe nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika različitog pola ($U=38$; $Z=-0,84$; $p=0,20$).



Slika 24. Vrijednost MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od pola

5.3.3. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju

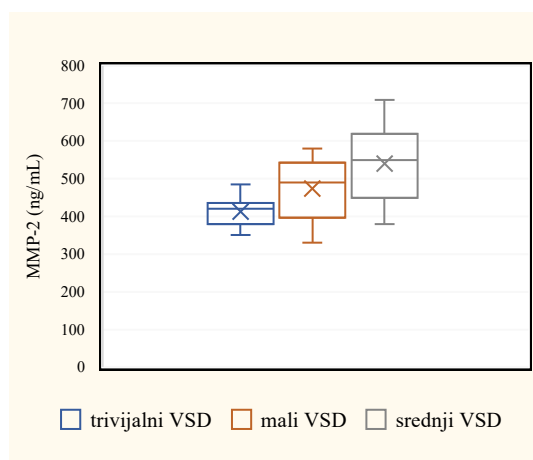
Mann-Whitney U testom smo utvrdili da vrijednosti MMP-2 nisu bile statistički značajno različite između hipotrofičnih i eutrofičnih ispitanika ni u eksperimentalnoj ($U=217$; $Z=-0,18$; $p=0,43$) (Slika 25) niti u kontrolnoj grupi ($U=36,50$; $Z=0,04$; $p=0,48$).



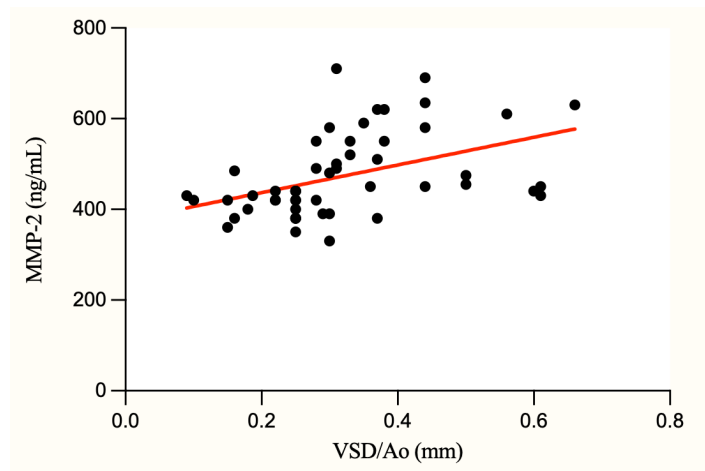
Slika 25. Vrijednost MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od uhranjenosti na rođenju

5.3.4. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a

Vrijednosti MMP-2 bile su najmanje u grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om, a najveće u grupi sa srednjim VSD-om (Slika 26). Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da je statistički značajna bila razlika u vrijednostima MMP-2 između grupe sa trivijalnim i grupe sa malim VSD-om ($p=0,02$) i između grupe sa trivijalnim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,00$), dok razlika između grupe sa malim i grupe sa srednjim VSD-om nije bila statistički značajna ($p=0,10$). Utvrdili smo da postoji slaba pozitivna korelacija ($r=0,44$; $p=0,00$) između veličine VSD-a i nivoa MMP-2 u urinu (Slika 27).



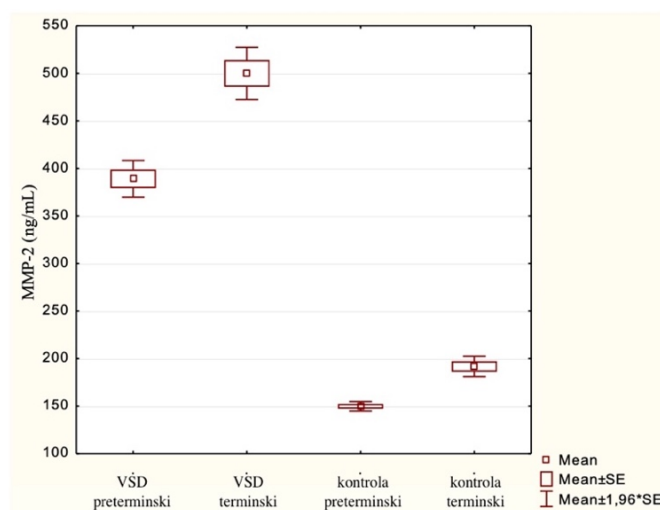
Slika 26. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a



Slika 27. Korelacija veličine VSD-a (VSD/Ao) i vrijednosti MMP-2

5.3.5. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

Poredili smo vrijednosti MMP-2 kod ispitanika sa VSD-om različite gestacijske starosti (VSD pretermenska i VSD termenska grupa) i sa odgovarajućim kontrolama (kontrolna pretermenska i kontrolna termenska grupa) korištenjem testa Kruskal-Wallis ANOVA. Našli smo da su statistički značajno više vrijednosti MMP-2 bile kod terminskih ispitanika sa VSD-om u odnosu na pretermenske ispitanike sa VSD-om ($p=0,02$), kod terminskih ispitanika sa VSD-om i pretermenskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$) i kod terminskih ispitanika sa VSD-om i terminskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$). U kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajne razlike između terminskih i pretermenskih ispitanika ($p=1,00$) (Slika 28).



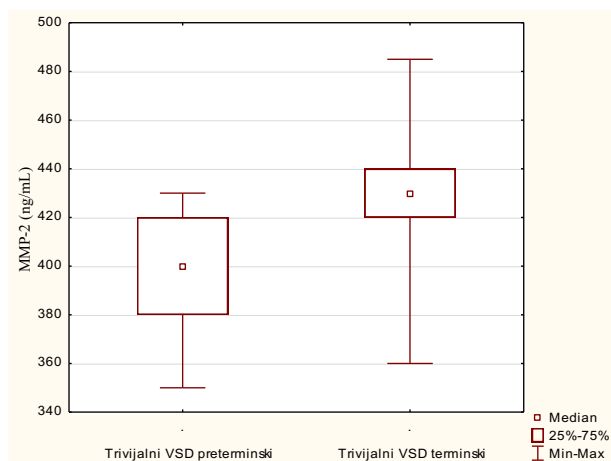
Slika 28. Vrijednosti MMP-2 zavisno od gestacijske starosti

5.3.6. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a

Prema veličini VSD-a, ispitanike eksperimentalne grupe podijelili smo na grupu sa trivijalnim, grupu sa malim i grupu sa srednjim VSD-om i izvršili poređenje koncentracija MMP-2 između grupa korištenjem testa Kruskal-Wallis ANOVA.

5.3.6.1. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a

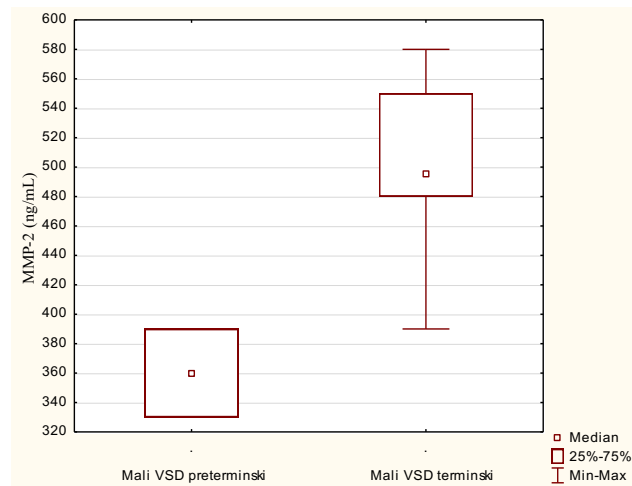
U grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om vrijednosti MMP-2 bile su statistički značajno više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina ($U=18,50$; $Z=-2,24$; $p=0,03$) (Slika 29).



Slika 29. Vrijednosti MMP-2 kod ispitanika sa trivijalnim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.3.6.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a

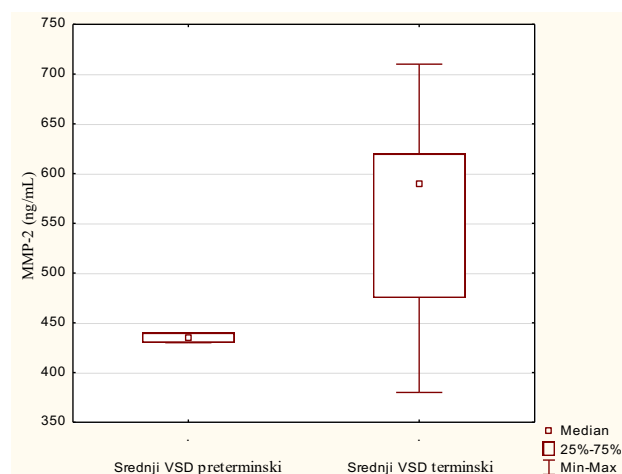
U grupi ispitanika sa malim VSD-om utvrđeno je da su vrijednosti MMP-2 bile više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ($U=0,50$; $Z=-1,93$; $p=0,05$) (Slika 30).



Slika 30. Vrijednosti MMP-2 kod ispitanika s malim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.3.6.3. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a

U grupi ispitanika sa srednjim VSD-om, vrijednosti MMP-2 bile su više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ($U=2$; $Z=-1,93$; $p=0,05$) (Slika 31).

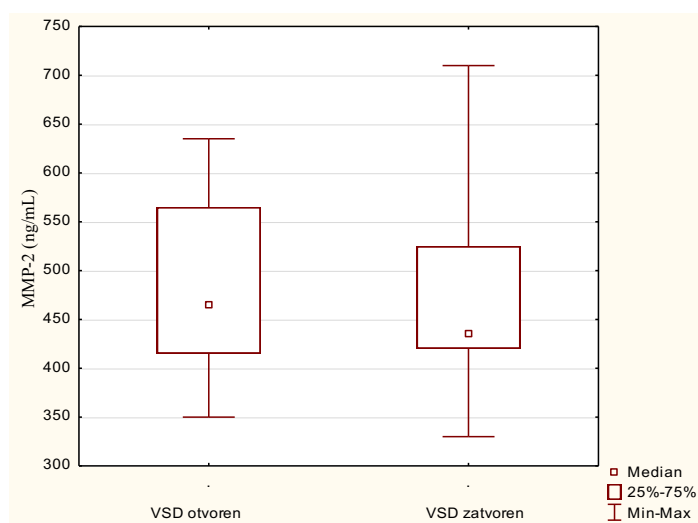


Slika 31. Vrijednosti MMP-2 u urinu djece s srednjim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.3.7. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.3.7.1. Vrijednosti MMP-2 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a

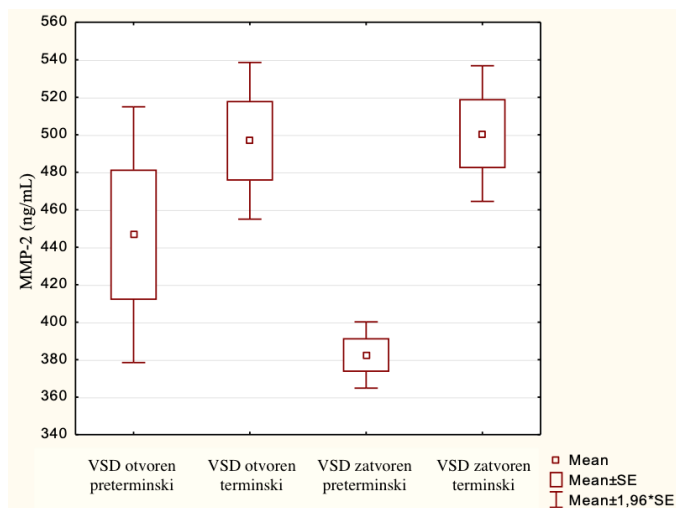
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da se vrijednosti MMP-2 u urinu ispitanika kod kojih se VSD spontano zatvorio do kraja prve godine života i ispitanika kod kojih je defekt ostao otvoren nisu statistički značajno razlikovale ($U=268,50$; $Z=0,96$; $p=0,34$) (Slika 32).



Slika 32. Vrijednosti MMP-2 zavisno od spontanog zatvaranja VSD-a

5.3.7.2. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika

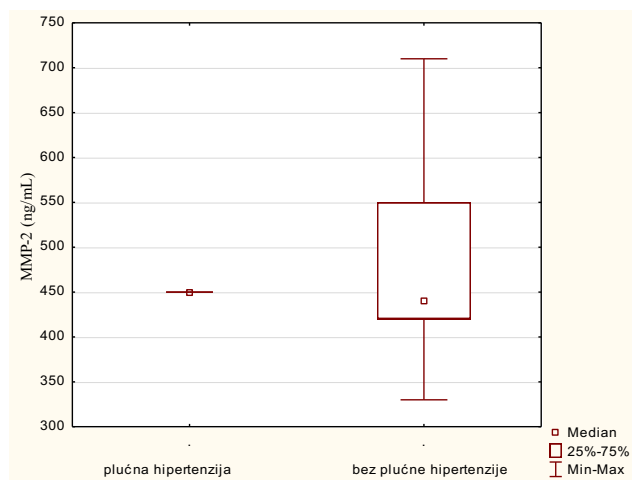
Kruskal-Wallis ANOVA testom smo utvrdili da su u grupi ispitanika kod kojih se defekt spontano zatvorio vrijednosti MMP-2 bile značajno više kod terminskih u odnosu na preterminske ispitanike ($p=0,00$), dok u grupi u kojoj je defekt ostao otvoren ta razlika nije bila statistički značajna ($p=1,00$). Vrijednosti su bile značajno više kod terminskih ispitanika sa otvorenim VSD-om u odnosu na preterminske ispitanike kod kojih se VSD zatvorio ($p=0,00$). Razlike nisu bile značajne između preterminskih ispitanika kod kojih se VSD zatvorio i preterminskih kod kojih je ostao otvoren ($p=0,66$), između terminskih ispitanika kod kojih se defekt zatvorio i terminskih kod kojih je ostao otvoren ($p=1,00$), kao ni između terminskih ispitanika kod kojih se defekt zatvorio i preterminskih kod kojih se nije ($p=1,00$) (Slika 33).



Slika 33. Vrijednosti MMP-2 zavisno od spontanog zatvaranja VSD-a i gestacijske starosti ispitanika

5.3.8. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na prisutnost PAH

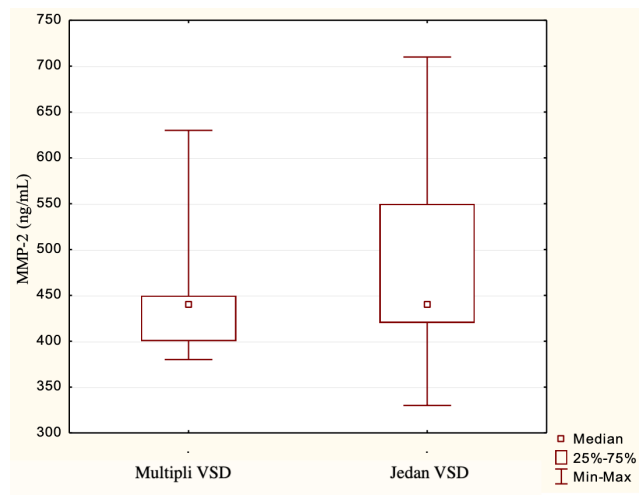
Razlika u vrijednostima MMP-2 između ispitanika sa i ispitanika bez PAH nije bila statistički značajna ($U=45$; $Z=0,21$; $p=0,83$) (Slika 34).



Slika 34. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na prisutnost PAH

5.3.9. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na broj VSD-a

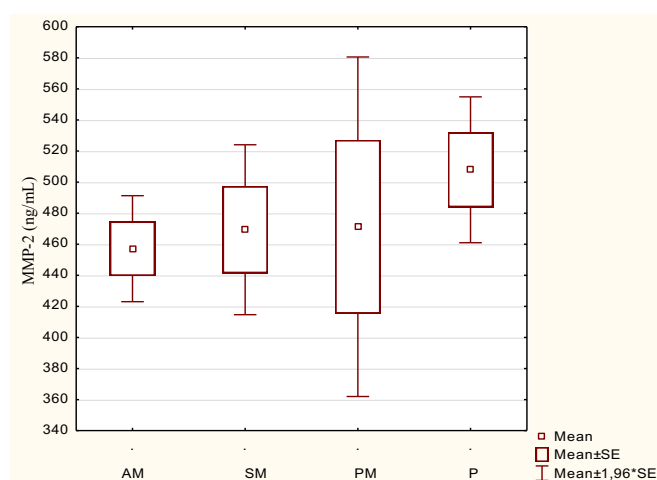
Nije bilo značajne razlike u vrijednostima MMP-2 između ispitanika sa jednim i ispitanika sa multiplim defektom ($U=172,50$; $Z=-0,50$; $p=0,62$) (Slika 35).



Slika 35. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na broj VSD-a

5.3.10. Vrijednosti MMP-2 s obzirom na lokaciju VSD-a

Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima MMP-2 između grupa koje se razlikuju prema lokaciji VSD-a ($p=0,3$, $p=0,58$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 36).

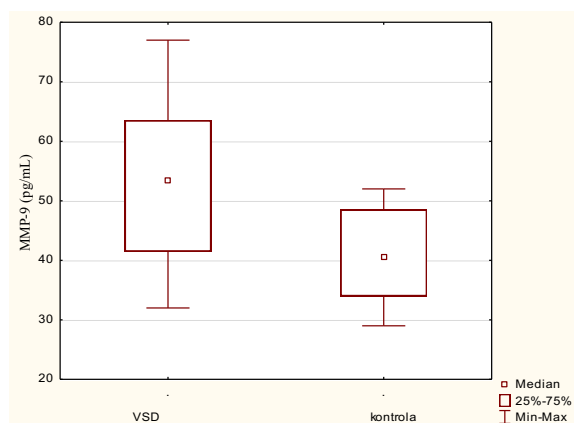


Slika 36. Vrijednosti MMP-2 zavisno od lokacije VSD-a; AM - apikalni mišićni, SM - srednji mišićni, PM - prednji mišićni, P - perimembranozni

5.4. MMP-9

5.4.1. Vrijednosti MMP-9 kod ispitanika sa VSD-om

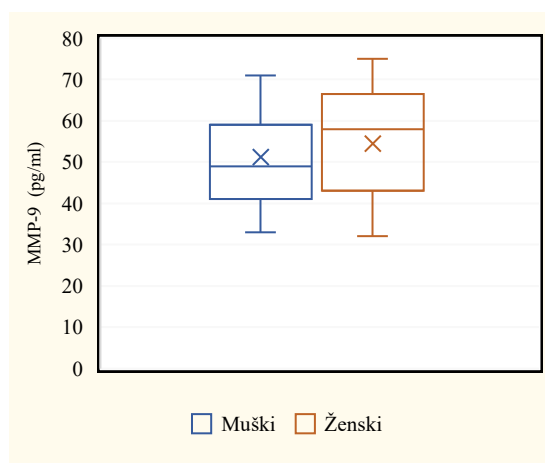
U urinu ispitanika sa VSD-om, korištenjem Mann-Whitney U testa, utvrdili smo statistički značajno veću koncentraciju MMP-9 u odnosu na njenu koncentraciju u urinu ispitanika kontrolne grupe ($U=235,50$; $Z=3,57$; $p=0,00$) (Slika 37).



Slika 37. Vrijednost MMP-9 kod ispitanika sa VSD-om u poređenju sa kontrolnom grupom

5.4.2. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na pol ispitanika

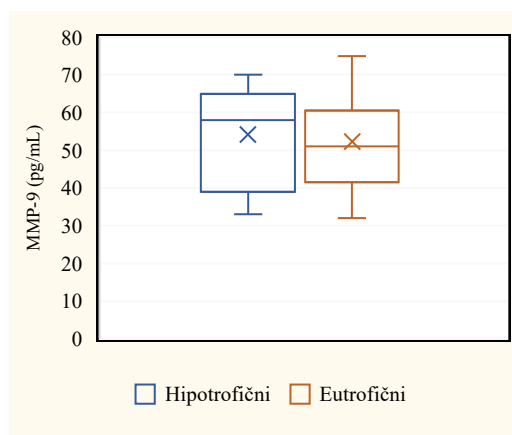
Mann-Whitney U testom utvrdili smo da se vrijednosti MMP-9 u grupi ispitanika sa VSD-om nisu statistički značajno razlikovale kod ispitanika muškog i ispitanika ženskog pola ($U=292,50$; $Z=-0,82$; $p=0,21$) (Slika 38). U kontrolnoj grupi takođe nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika različitog pola ($U=38$; $Z=-0,84$; $p=0,40$).



Slika 38. Vrijednost MMP-9 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od pola

5.4.3. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju

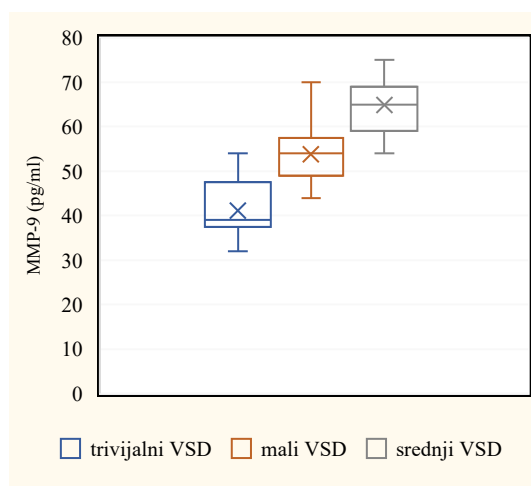
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da vrijednosti MMP-9 nisu bile statistički značajne različite kod hipotrofičnih i eutrofičnih ispitanika u grupi sa VSD-om ($U=203,50$; $Z=-0,48$; $p=0,63$) (Slika 39), kao ni u kontrolnoj grupi ($U=37$; $Z=0,00$; $p=0,5$).



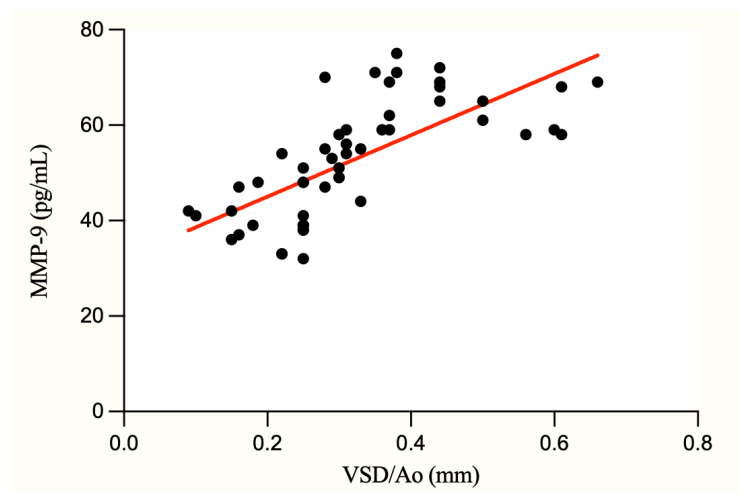
Slika 39. Vrijednost MMP-9 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od uhranjenosti na rođenju

5.4.4. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na veličinu VSD-a

Koncentracija MMP-9 bila je najmanja u grupi ispitanika sa trivijalnim, a najveća u grupi sa srednjim VSD-om (Slika 40). Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da je postojala statistički značajna razlika u koncentraciji MMP-9 između grupe sa trivijalnim i grupe sa malim VSD-om ($p=0,00$), grupe sa trivijalnim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,00$) i grupe sa malim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,00$). Utvrdili smo da je korelacija između veličine VSD-a i koncentracije MMP-9 visoko pozitivna ($r=0,70$; $p=0,00$) (Slika 41).



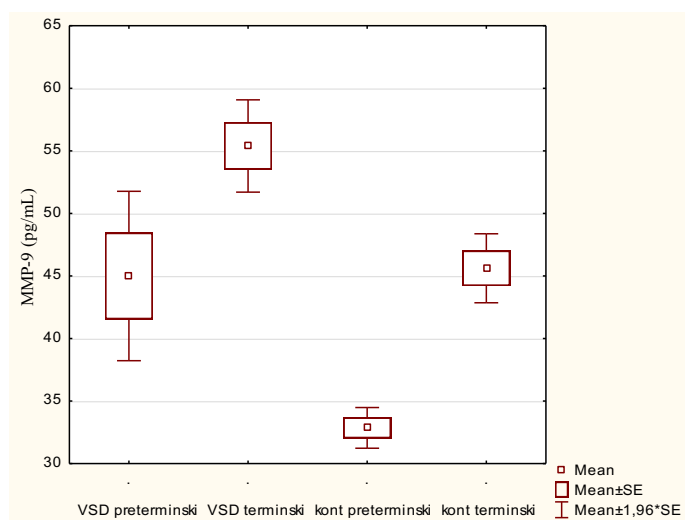
Slika 40. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na veličinu VSD-a



Slika 41. Korelacija veličine VSD-a (VSD/Ao) i vrijednosti MMP-9

5.4.5. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

Uz pomoć testa Kruskal-Wallis ANOVA našli smo da su bile statistički značajno više vrijednosti MMP-9 kod terminskih ispitanika sa VSD-om u odnosu na preterminske ispitanike kontrolne grupe ($p=0,00$), dok se ostale grupe nisu statistički značajno razlikovale (Slika 42).

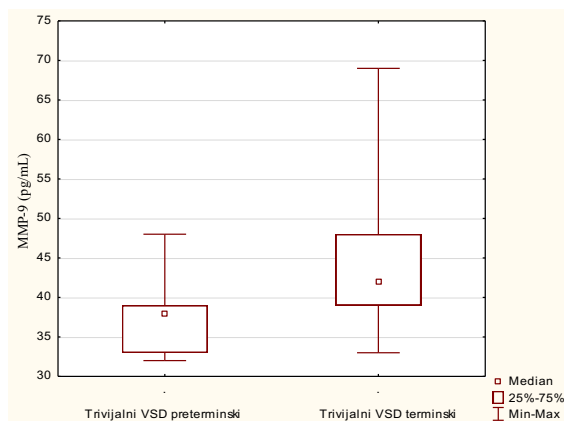


Slika 42. Vrijednosti MMP-9 zavisno od gestacijske starosti ispitanika

5.4.6. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a

5.4.6.1. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a

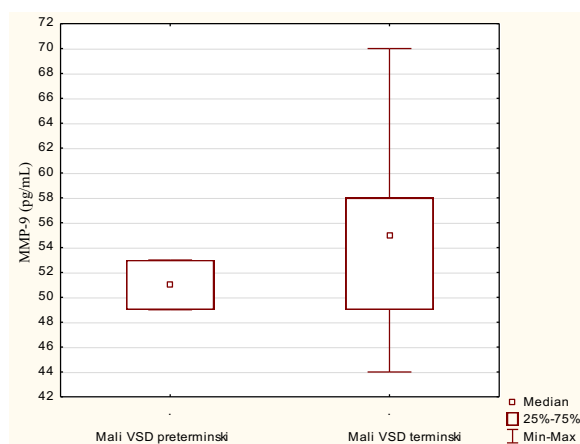
U grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om utvrdili smo da su vrijednosti MMP-9 statistički bile značajno više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina ($U=20,50$; $Z=-2,09$; $p=0,04$) (Slika 43).



Slika 43. Razlika u vrijednosti MMP-9 kod ispitanika s trivijalnim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.4.6.2. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a

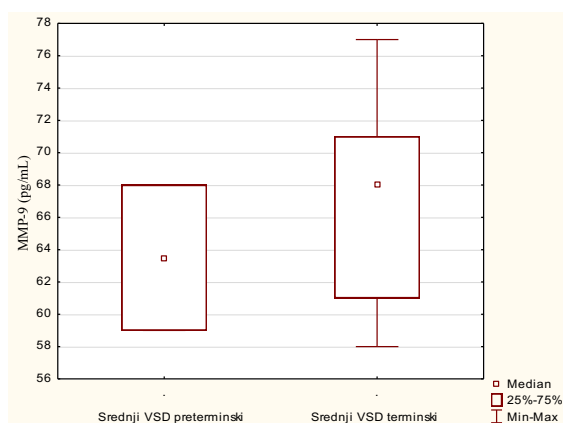
U grupi ispitanika sa malim VSD-om vrijednosti MMP-9 bile su više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ($U=6,50$; $Z=-0,64$; $p=0,52$) (Slika 44).



Slika 44. Razlika u vrijednosti MMP-9 kod ispitanika s malim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.4.6.3. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a

U grupi ispitanika sa srednjim VSD-om, utvrđeno je da su vrijednosti MMP-9 bile više kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ($U=11,50$; $Z=-0,66$; $p=0,51$) (Slika 45).

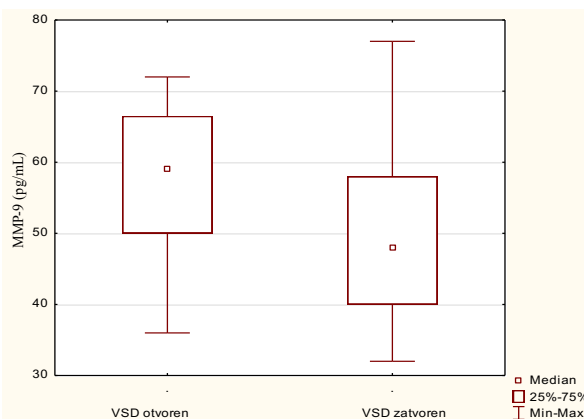


Slika 45. Razlika u vrijednosti MMP-9 kod ispitanika s srednjim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.4.7. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.4.7.1. Vrijednosti MMP-9 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a

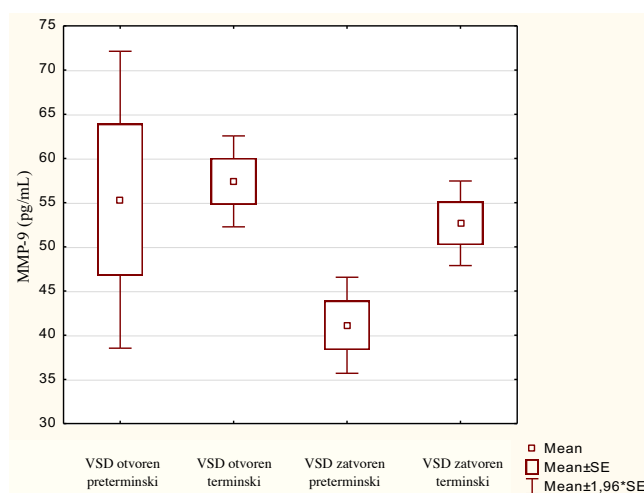
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da je MMP-9 u urinu ispitanika kod kojih se VSD nije zatvorio do kraja prve godine života bila statistički značajno viša od njene vrijednosti kod ispitanika kod kojih se defekt zatvorio ($U=212,50$; $Z=2,01$; $p=0,04$) (Slika 46).



Slika 46. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.4.7.2. MMP-9 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika

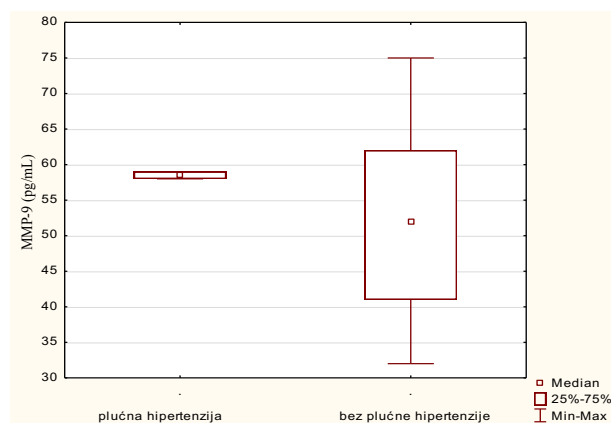
Korištenjem Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da je postojala statistički značajna razlika između terminskih ispitanika kod kojih se VSD nije zatvorio i preterminskih ispitanika kod kojih se defekt zatvorio ($p=0,01$), dok se ostale grupe nisu međusobno statistički značajno razlikovale ($p=0,11$, $p=0,49$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 47).



Slika 47. Vrijednosti MMP-9 zavisno od gestacijske starosti ispitanika i spontanog zatvaranja VSD-a

5.4.8. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost PAH

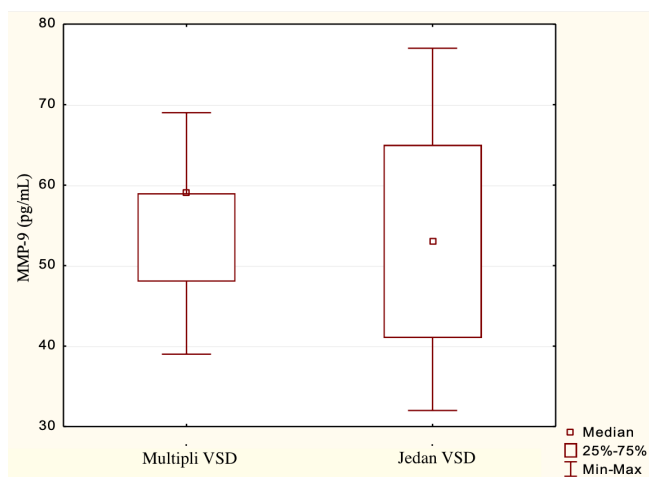
Razlika u vrijednostima MMP-9 između ispitanika sa i ispitanika bez PAH nije bila statistički značajna, što smo utvrdili uz pomoć Mann-Whitney U testa ($U=33,50$; $Z=0,76$; $p=0,45$) (Slika 48).



Slika 48. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na prisutnost PAH

5.4.9. Vrijednost MMP-9 s obzirom na broj VSD-a

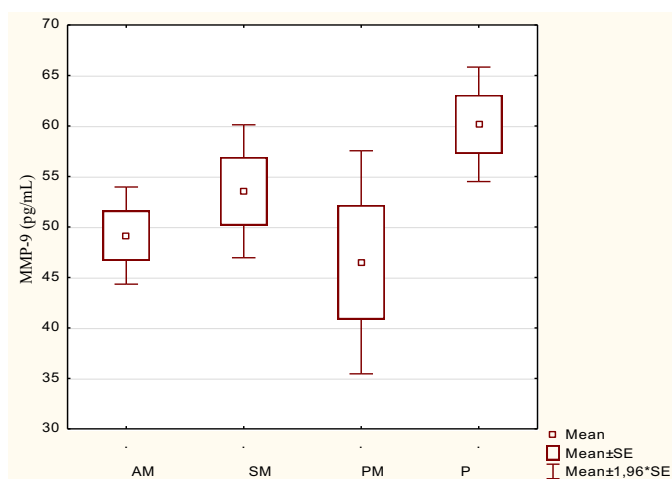
Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima MMP-9 između ispitanika sa jednim i ispitanika sa multiplim VSD-om ($U=172,50$; $Z=-0,50$; $p=0,62$) (Slika 49).



Slika 49. Vrijednosti MMP-9 s obzirom na broj VSD-a

5.4.10. Vrijednost MMP-9 s obzirom na lokaciju VSD-a

Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima MMP-9 između grupa ispitanika sa različitim lokacijama VSD-a ($p=0,05$, $p=0,26$, $p=0,85$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 50).

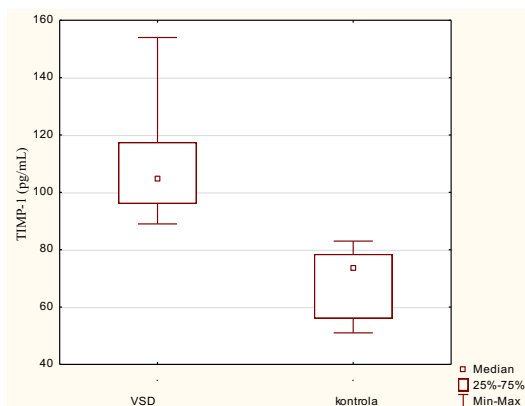


Slika 50. Vrijednosti MMP-9 zavisno od lokacije VSD-a; AM - apikalni mišićni, SM - srednji mišićni, PM - prednji mišićni, P - perimembranozni

5.5. TIMP-1

5.5.1. Vrijednosti TIMP-1 kod ispitanika sa VSD-om

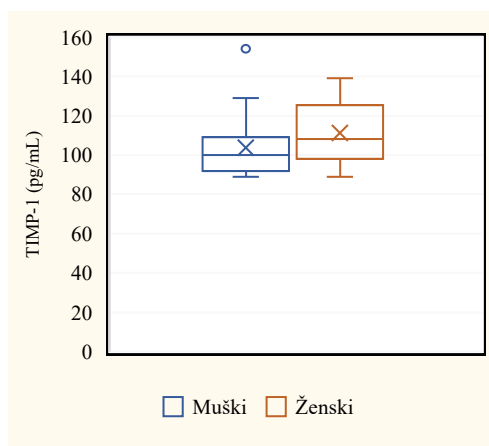
U urinu ispitanika sa VSD-om, korištenjem Mann-Whitney U testa, utvrdili smo da je bila statistički značajno veća koncentracija TIMP-1 u odnosu na njegovu koncentraciju u urinu ispitanika kontrolne grupe ($U=0$; $Z=6,53$; $p=0,00$) (Slika 51).



Slika 51. Vrijednost TIMP-1 kod ispitanika sa VSD-om u poređenju sa kontrolnom grupom

5.5.2. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na pol ispitanika

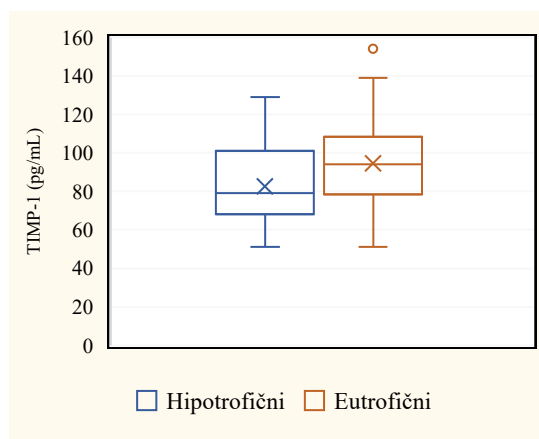
Uz pomoć Mann-Whitney U testa, našli smo da su vrijednosti TIMP-1 bile statistički značajno više kod ispitanika ženskog pola u odnosu na ispitanike muškog pola u eksperimentalnoj grupi ($U=234,50$; $Z=-1,88$; $p=0,03$) (Slika 52). U kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajne razlike ($U=45,50$; $Z=-0,27$; $p=0,39$).



Slika 52. Vrijednost TIMP-1 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od pola

5.5.3. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju

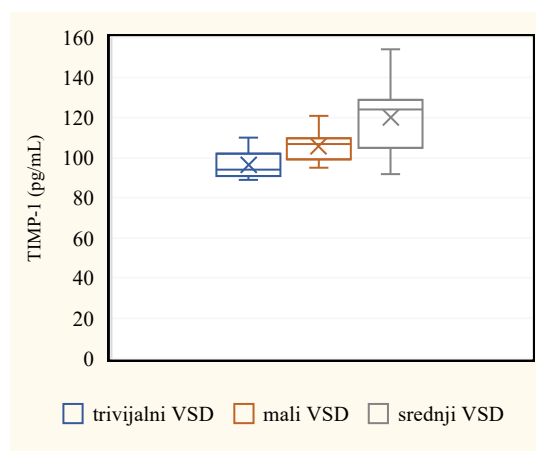
Vrijednosti TIMP-1 nisu se statistički značajno razlikovale kod hipotrofičnih i eutrofičnih ispitanika u grupi sa VSD-om ($U=200$; $Z=-0,56$, $p=0,58$) (Slika 53), kao ni u kontrolnoj grupi ($U=33$; $Z=0,35$; $p=0,73$).



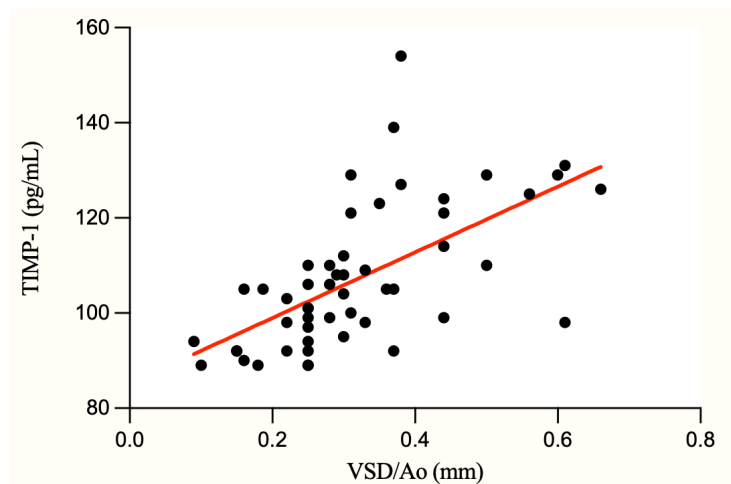
Slika 53. Vrijednost TIMP-1 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od uhranjenosti na rođenju

5.5.4. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na veličinu VSD-a

Vrijednosti TIMP-1 bile su najmanje u grupi ispitanika sa trivijalnim, a najveće u grupi sa srednjim VSD-om (Slika 54). Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da je statistički značajna bila razlika u vrijednostima TIMP-1 između grupe sa trivijalnim i grupe sa malim VSD-om ($p=0,02$), grupe sa trivijalnim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,00$) i grupe sa malim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,01$). Korelacija između veličine VSD-a i vrijednosti TIMP-1 bila je visoko pozitivna ($r=0,61$; $p=0,00$) (Slika 55).



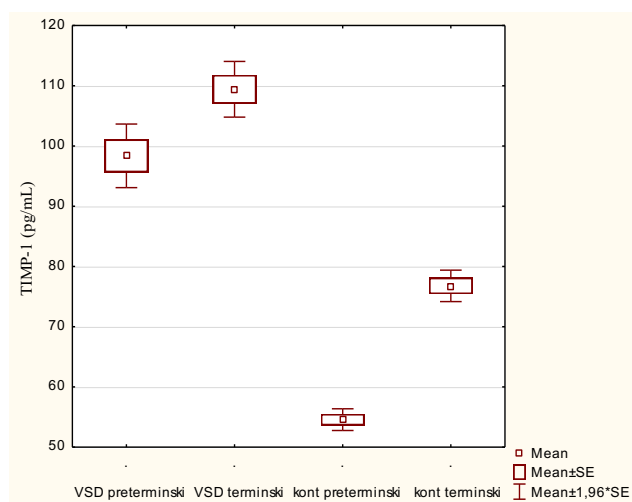
Slika 54. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na veličinu VSD-a



Slika 55. Korelacija veličine VSD-a (VSD/Ao) i vrijednosti TIMP-1

5.5.5. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

Korištenjem testa Kruskal-Wallis ANOVA našli smo da su statistički značajno više vrijednosti TIMP-1 bile kod pretermijskih ispitanika sa VSD-om i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,01$), terminskih ispitanika sa VSD-om i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$) i terminskih ispitanika sa VSD-om i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$), dok razlika nije bila statistički značajna između terminskih i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,44$) i terminskih i pretermijskih ispitanika eksperimentalne grupe ($p=1,00$) (Slika 56).

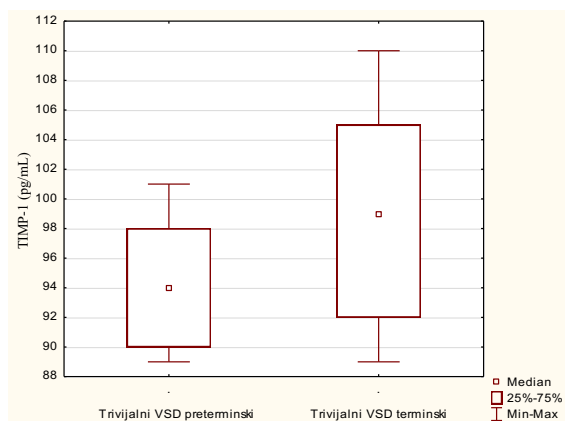


Slika 56. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

5.5.6. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a

5.5.6.1. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a

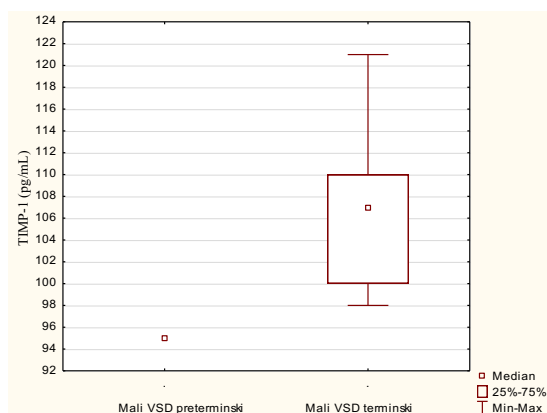
U grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om nije postojala statistički značajna razlika u vrijednostima TIMP-1 između pretermijskih i terminskih ispitanika ($U=34,50$; $Z=-1,04$; $p=0,30$) (Slika 57).



Slika 57. Razlika u vrijednosti TIMP-1 kod djece s trivijalnim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.5.6.2. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a

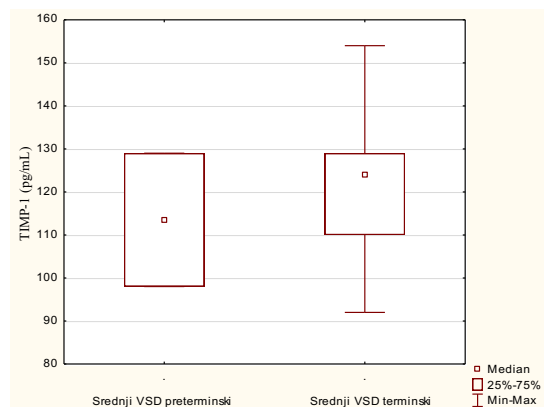
U grupi ispitanika sa malim VSD-om nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima TIMP-1 između pretermijskih i terminskih ispitanika ($U=14,50$; $Z=-0,86$; $p=0,20$) (Slika 58).



Slika 58. Razlika u vrijednosti TIMP-1 kod ispitanika s malim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.5.6.3. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a

U grupi ispitanika sa srednjim VSD-om utvrđeno je da vrijednosti TIMP-1 nisu bile statistički značajno više kod ispitanika rođenih u terminu u odnosu na ispitanike koji su rođeni prije termina ($U=14$; $Z=-0,33$; $p=0,74$) (Slika 59).

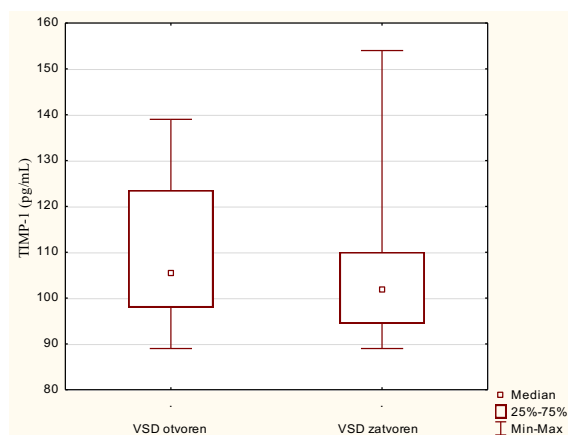


Slika 59. Razlika u vrijednosti TIMP-1 kod ispitanika s srednjim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.5.7. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.5.7.1. Vrijednosti TIMP-1 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a

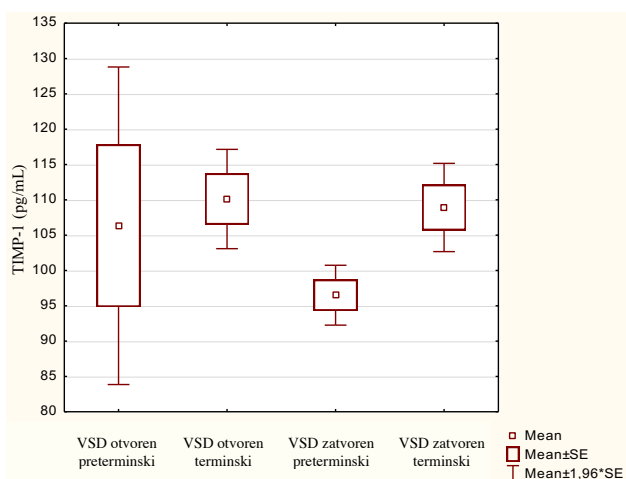
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da vrijednosti TIMP-1 u urinu ispitanika kod kojih se VSD spontano zatvorio do kraja prve godine života i ispitanika kod kojih je defekt ostao otvoren nisu bile statistički značajno različite ($U=266,50$; $Z=1,00$; $p=0,32$) (Slika 60).



Slika 60. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.5.7.2. TIMP-1 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika

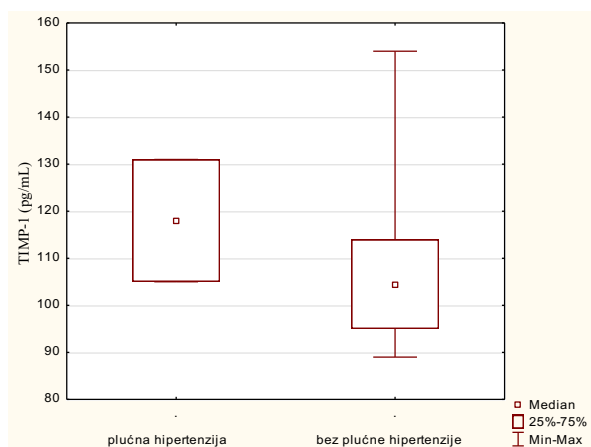
Korištenjem Kruskal-Wallis ANOVA testa nismo našli statistički značajnu razliku u vrijednostima TIMP-1 između ispitanika različite gestacijskoj starosti u grupi u kojoj se defekt zatvorio, kao ni u grupi u kojoj je on ostao otvoren ($p=0,10$, $p=0,17$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 61).



Slika 61. Vrijednosti TIMP-1 zavisno od gestacijske starosti ispitanika i spontanog zatvaranja VSD-a

5.5.8. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost PAH

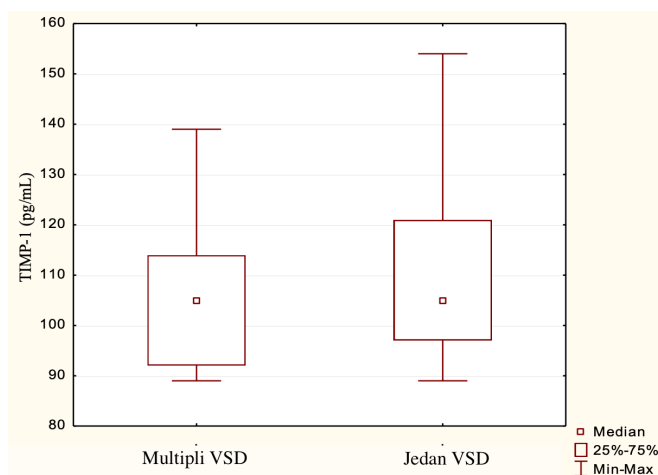
Razlika u vrijednostima TIMP-1 između ispitanika sa i ispitanika bez PAH nije bila statistički značajna ($U=25,50$; $Z=1,14$; $p=0,25$) (Slika 62).



Slika 62. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na prisutnost PAH

5.5.9. Vrijednost TIMP-1 s obzirom na broj VSD-a

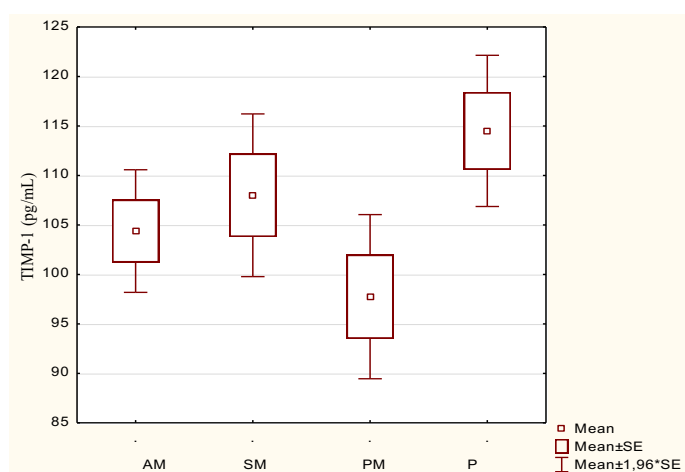
Utvdili smo da nije postojala statistički značajna razlika u vrijednostima TIMP-1 između ispitanika sa jednim i ispitanika sa multiplim defektom ($U=182$; $Z=-0,27$; $p=0,80$) (Slika 63).



Slika 63. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na broj VSD-a

5.5.10. Vrijednosti TIMP-1 s obzirom na lokaciju VSD-a

Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima TIMP-1 između grupa koje se razlikuju prema lokaciji VSD-a ($p=0,23$, $p=0,31$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 64).

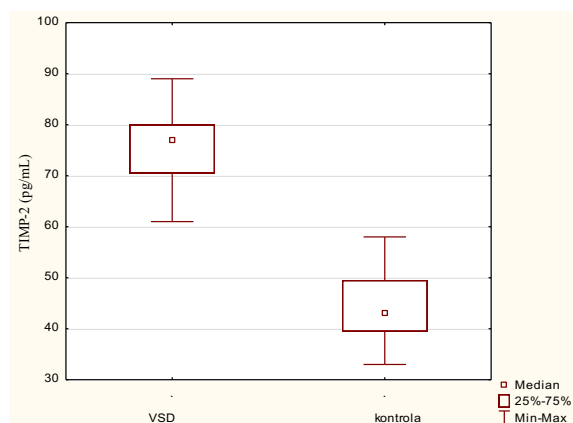


Slika 64. Vrijednosti TIMP-1 zavisno od lokacije VSD-a; AM - apikalni mišićni, SM - srednji mišićni, PM - prednji mišićni, P - perimembranozni

5.6. TIMP-2

5.6.1. Vrijednosti TIMP-2 kod ispitanika sa VSD-om

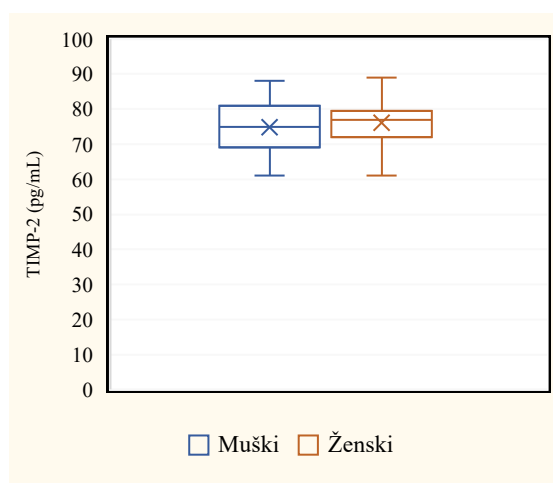
U urinu ispitanika sa VSD-om, uz pomoć Mann-Whitney U testa, utvrdili smo statistički značajno veću koncentraciju TIMP-2 u odnosu na njegovu koncentraciju u urinu ispitanika kontrolne grupe ($U=0$; $Z=6,53$; $p=0,00$) (Slika 65).



Slika 65. Vrijednost TIMP-2 kod ispitanika sa VSD-om u poređenju sa kontrolnom grupom

5.6.2. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na pol ispitanika

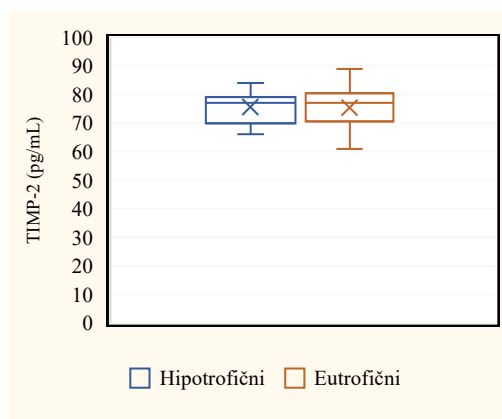
Vrijednosti TIMP-2 u grupi ispitanika sa VSD-om nisu se statistički značajno razlikovale kod ispitanika muškog i ispitanika ženskog pola ($U=300,50$; $Z=-0,67$; $p=0,25$) (Slika 66), kao ni u kontrolnoj grupi ($U=43,50$; $Z=-0,42$; $p=0,34$).



Slika 66. Vrijednost TIMP-2 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od pola

5.6.3. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na uhranjenost ispitanika na rođenju

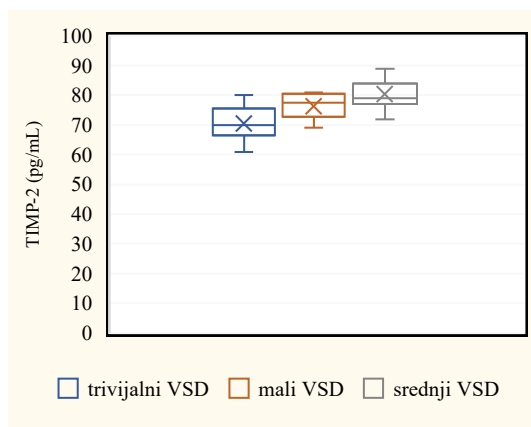
Nađeno je da se vrijednosti TIMP-2 nisu statistički značajno razlikovale kod hipotrofičnih i eutrofičnih ispitanika sa VSD-om ($U=223$, $Z=0,04$, $p=0,97$) (Slika 67), kao ni u kontrolnoj grupi ($U=33$; $Z=-0,35$; $p=0,36$).



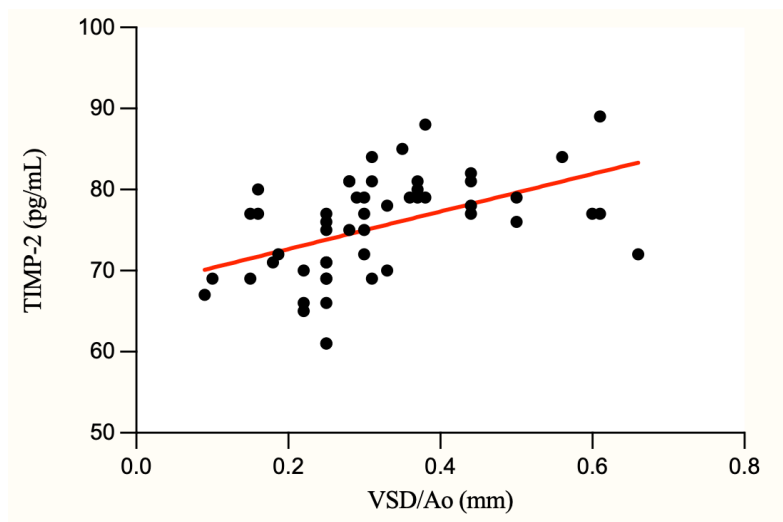
Slika 67. Vrijednost TIMP-2 kod ispitanika sa VSD-om zavisno od uhranjenosti na rođenju

5.6.4. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a

Vrijednost TIMP-2 bila je najmanja u grupi ispitanika sa trivijalnim, a najveća u grupi sa srednjim VSD-om (Slika 68). Uz pomoć Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da je statistički značajna bila razlika u vrijednostima TIMP-2 između grupe sa trivijalnim i grupe sa malim VSD-om ($p=0,00$), grupe sa trivijalnim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,00$) i grupe sa malim i grupe sa srednjim VSD-om ($p=0,04$). Korelacija između veličine VSD-a i vrijednosti TIMP-2 bila je slabo pozitivna ($r=0,48$; $p=0,00$) (Slika 69).



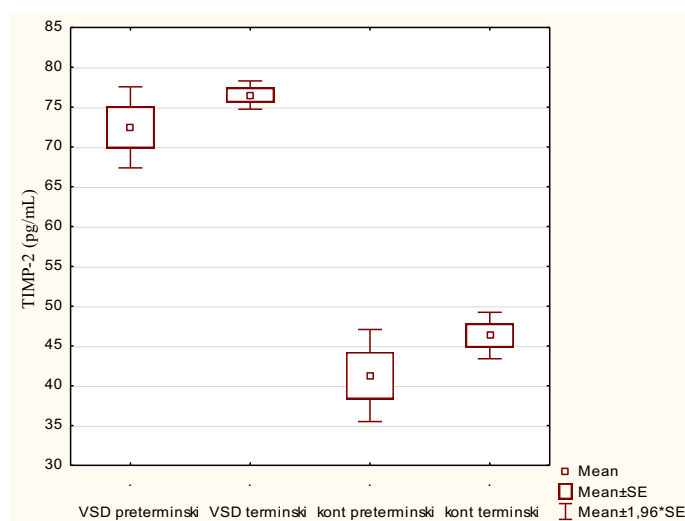
Slika 68. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na veličinu VSD-a



Slika 69. Korelacija veličine VSD-a (VSD/Ao) i vrijednosti TIMP-2

5.6.5. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

Korištenjem testa Kruskal-Wallis ANOVA našli smo da su statistički značajno bile više vrijednosti TIMP-2 kod pretermijskih ispitanika sa VSD-om i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,01$), pretermijskih ispitanika sa VSD-om i terminskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,01$), terminskih ispitanika sa VSD-om i pretermijskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$) i terminskih ispitanika sa VSD-om i terminskih ispitanika kontrolne grupe ($p=0,00$) Nije bilo značajne razlike između pretermijskih i terminskih ispitanika u eksperimentalnoj ($p=1,00$), niti u kontrolnoj grupi ($p=1,00$) (Slika70).

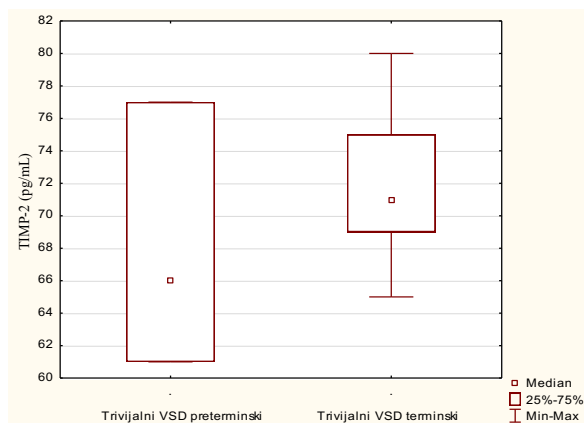


Slika 70. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika

5.6.6. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika i veličinu VSD-a

5.6.6.1. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod trivijalnog VSD-a

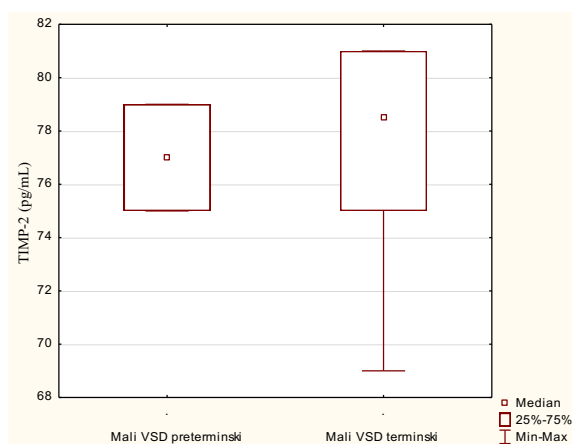
U grupi ispitanika sa trivijalnim VSD-om utvrđeno je da vrijednosti TIMP-2 nisu bile statistički značajno različite kod ispitanika koji su rođeni u terminu i ispitanika koji su rođeni prije termina ($U=30,50$; $Z=-1,34$; $p=0,18$) (Slika 71).



Slika 71. Razlika u vrijednosti TIMP-2 kod ispitanika s trivijalnim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.6.6.2. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod malog VSD-a

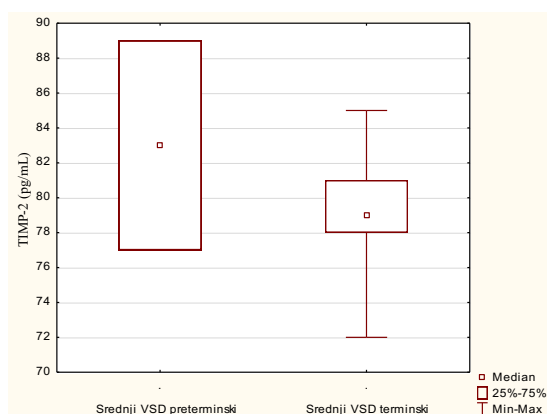
U grupi ispitanika sa malim VSD-om, utvrđeno je da vrijednosti TIMP-2 nisu bile statistički značajno različite kod ispitanika koji su rođeni u terminu i ispitanika koji su rođeni prije termina ($U=8,50$; $Z=-0,21$; $p=0,83$) (Slika 72).



Slika 72. Razlika u vrijednosti TIMP-2 kod ispitanika s malim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.6.6.3. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na gestacijsku starost ispitanika kod srednjeg VSD-a

U grupi ispitanika sa srednjim VSD-om, utvrđeno je da vrijednosti TIMP-2 nisu bile statistički značajno različite kod ispitanika koji su rođeni u terminu i ispitanika koji su rođeni prije termina ($U=14$; $Z=0,33$; $p=0,74$) (Slika 73).

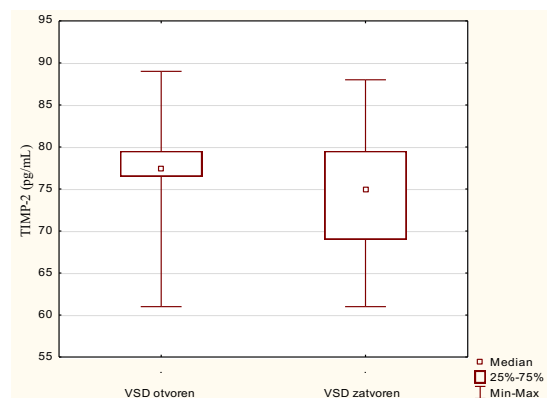


Slika 73. Razlike u vrijednosti TIMP-2 kod ispitanika s srednjim VSD-om zavisno od gestacijske starosti

5.6.7. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.6.7.1. Vrijednosti TIMP-2 kod otvorenog i zatvorenog VSD-a

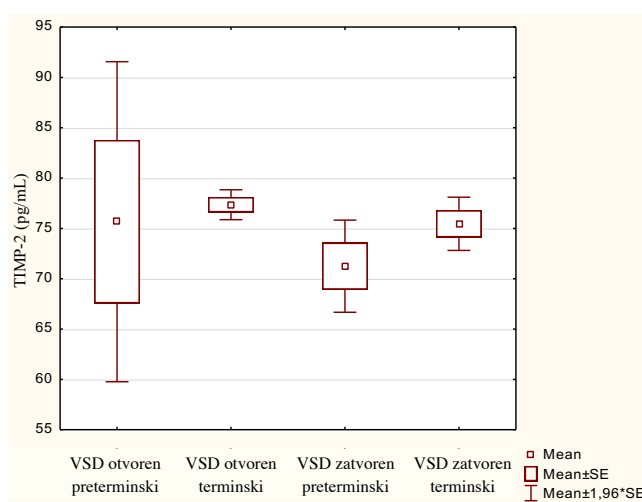
Uz pomoć Mann-Whitney U testa utvrdili smo da se vrijednosti TIMP-2 u urinu nisu statistički značajno razlikovale kod ispitanika kod kojih se VSD spontano zatvorio do kraja prve godine života i ispitanika kod kojih je defekt ostao otvoren ($U=235$; $Z=1,59$; $p=0,11$) (Slika 74).



Slika 74. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost spontanog zatvaranja VSD-a

5.6.7.2. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na spontano zatvaranje VSD-a i gestacijsku starost ispitanika

Korištenjem Kruskal-Wallis ANOVA testa utvrdili smo da nije bilo statistički značajne razlike između grupa ispitanika koje su se razlikovale po gestacijskoj starosti i spontanom zatvaranju defekta ($p=0,14$, $p=0,72$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 75).



Slika 75. Vrijednosti TIMP-2 zavisno od gestacijske starosti ispitanika i spontanog zatvaranja VSD-a

5.6.8. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost PAH

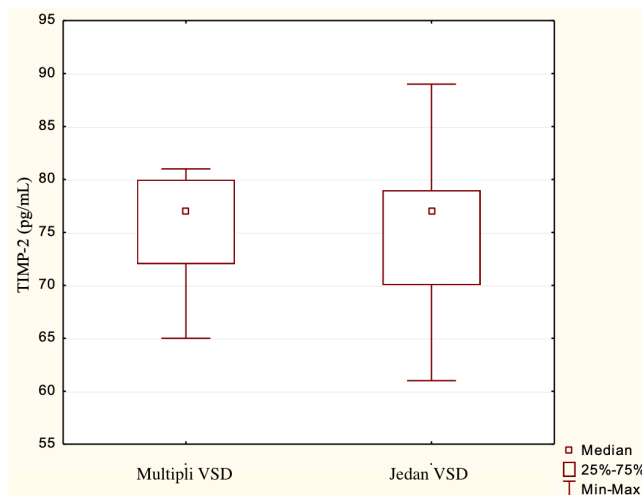
Utvrdili smo da razlika u vrijednostima TIMP-2 između ispitanika sa i ispitanika bez PAH nije bila statistički značajna ($U=38,50$; $Z=0,52$; $p=0,60$) (Slika 76).



Slika 76. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na prisutnost PAH

5.6.9. Vrijednost TIMP-2 s obzirom na broj VSD-a

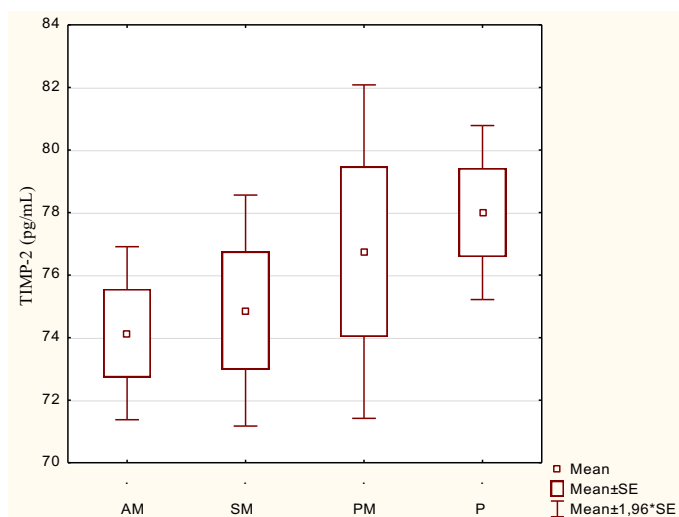
Razlika u vrijednostima TIMP-2 između ispitanika sa jednim i ispitanika sa multiplim defektom nije bila statistički značajna ($U=182$; $Z=0,27$; $p=0,79$) (Slika 77).



Slika 77. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na broj VSD-a

5.6.10. Vrijednosti TIMP-2 s obzirom na lokaciju VSD-a

Nije postojala statistički značajna razlika u vrijednostima TIMP-2 između grupa ispitanika koje su se razlikovale po lokaciji VSD-a ($p=0,83$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$, $p=1,00$) (Slika 78).



Slika 78. Vrijednosti TIMP-2 zavisno od lokacije VSD-a; AM - apikalni mišićni, SM - srednji mišićni, PM - prednji mišićni, P - perimembranozni

6. DISKUSIJA

Ova studija je sprovedena kako bi se, po prvi put, ispitala povezanost nivoa MMP-a i TIMP-a u urinu djece sa izolovanim VSD-om sa određenim karakteristikama ispitanika i ehokardiografskim karakteristikama anomalije, sa ciljem da se donese zaključak o njihovom mogućem značaju u etiopatogenezi VSD-a i predviđanju njegovog spontanog toka korištenjem urina ispitanika.

Ispitivanjem nisu bila obuhvaćena djeca sa velikim VSD-om i VSD-om *inlet* i *outlet* tipa, jer u najvećem broju slučajeva ovakvi defekti zahtijevaju rano operativno liječenje.

Eksperimentalnu grupu činilo je pedeset dvoje djece sa VSD-om, a kontrolnu dvadesetoro zdrave djece. Ispitanici eksperimentalne grupe uključivani su u studiju redom postavljanja dijagnoze. Pri odabiru ispitanika kontrolne grupe vodili smo računa da se po opštim karakteristikama ispitanika grupa značajno ne razlikuje od eksperimentalne, što je i postignuto jer rezultati pokazuju da se ove grupe statistički značajno ne razlikuju po starosnoj dobi, gestacijskoj starosti, polu i uhranjenosti na rođenju ispitanika.

Prosječna starost ispitanika u našoj studiji u vrijeme postavljanja dijagnoze VSD-a i uzimanja uzorka urina iznosila je 31,92 dana, što predstavlja dob u kojoj se ne očekuje pojava simptoma ukoliko se radi o tipovima ove anomalije kakve smo proučavali [40]. Otkrivanje VSD-a prije pojave simptoma u našoj studiji bilo je moguće zahvaljujući izvođenju ehokardiografije kod auskultacije srčanog šuma kao jedine indikacije.

6.1. VSD i njegovo spontano zatvaranje zavisno od opštih karakteristika ispitanika i ehokardiografskih karakteristika anomalije

Prvo smo analizirali povezanost ehokardiografskih karakteristika VSD-a i spontanog toka bolesti sa opštim karakteristikama ispitanika.

U grupi ispitanika sa VSD-om, oba pola bila su gotovo jednako zastupljena, što je u skladu sa dobro utvrđenom činjenicom da učestalost VSD-a ne zavisi od pola [54, 56].

Prijevremeno rođeni ispitanici činili su 21,15% eksperimentalne grupe, što je više od prosječne incidence prijevremeno rođene djece u Evropi koja iznosi 10,6% [131]. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima drugih studija koje su utvrdile da je VSD češći kod prijevremeno rođene djece u odnosu na djecu rođenu u terminu [60, 63, 132]. Veća učestalost prijevremeno

rođenih ispitanika kontrole grupe u odnosu na učestalost prijevremeno rođene djece u opštoj populaciji objašnjavamo našim nastojanjem da se kontrolna grupa ne razlikuje od eksperimentalne po gestacijskoj starosti ispitanika.

Među ispitanicima sa VSD-om, 21,15% ih je na rođenju bilo hipotrofično, što je više od prosječne učestalosti hipotrofične novorođenčadi u Istočnoj Evropi koja iznosi 6,33% [133]. Ovaj rezultat potvrđuje navode više studija da su kongenitalne srčane mane češće kod djece sa malom porođajnom masom [134, 135]. Veća učestalost ispitanika kontrole grupe koji su na rođenju bili hipotrofični u odnosu na učestalost hipotrofične novorođenčadi u opštoj populaciji objašnjavamo, takođe, našim nastojanjem da se kontrolna grupa ne razlikuje od eksperimentalne po uhranjenosti ispitanika na rođenju.

Ispitanike eksperimentalne grupe podijelili smo prema veličini VSD-a, na ispitanike sa trivijalnim VSD-om (40,38%), sa malim VSD-om (23,08%) i sa srednjim VSD-om (36,54%). Ove grupe se takođe nisu razlikovane po starosnoj dobi, gestacijskoj starosti, polu i uhranjenosti na rođenju ispitanika.

Među ispitanicima eksperimentalne grupe, 17,21% je imalo multipli VSD, što je u skladu sa izvještajem *Cresti* i saradnika da je 16% izolovanih VSD-a multiplog tipa [56]. U našem istraživanju ispitanici sa multiplim defektom nisu se razlikovali od ispitanika sa jednim VSD-om prema polu, gestacijskoj starosti i uhranjenosti na rođenju.

VSD u apikalnom dijelu mišićnog septuma imalo je 40,38% ispitanika, u srednjem dijelu mišićnog septuma 28,85%, u prednjem dijelu mišićnog septuma 7,69%, a u perimembranoznom dijelu septuma 23,08% ispitanika. U našem istraživanju nije bilo ispitanika sa defektom u zadnjem dijelu mišićnog septuma. Veća učestalost defekata u mišićnim dijelovima ventrikularnog septuma od defekata u perimembranoznom njegovom dijelu (76,92% u odnosu na 23,08%), se razlikuje od izvještaja studija koje uključuju široku pedijatrijsku populaciju, a prema kojima perimembranski defekti čine približno 75% slučajeva VSD-a [18, 62]. Ova razlika vjerovatno se može objasniti činjenicom da je mišićni VSD, prema studijama koje su se bavile prenatalno dijagnostikovanim slučajevima, češći na rođenju od perimembranoznog VSD-a, a da je stopa njegovog spontanog zatvaranja poslije rođenja veća od stope kod perimembranoznog i da se u velikom broju slučajeva zatvaranje defekta dešava prije pojave simptoma bolesti zbog čega mnogi ostaju nedijagnostikovani [62-64]. Veća učestalost mišićnih defekata u našoj studiji je u skladu sa rezultatima studija u kojima je VSD dijagnostikovao u neselekcioniranoj populaciji pomoću ehokardiografije kao skrining metode [63, 64]. Postojala je statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema polu i prema

uhranjenosti na rođenju između grupa sa različitom lokacijom VSD-a. U grupi ispitanika sa perimembranoznim defektom bilo je više ženskih i hipotrofičnih ispitanika, dok je u grupama sa defektom u mišićnim dijelovima septuma bilo više muških i eutrofičnih ispitanika. S obzirom da prema rezultatima velikih studija nema razlike ni u polnoj niti u distribuciji ispitanika prema uhranjenosti na rođenju između VSD-a različitih lokacija [20, 136], naši rezultati se vjerovatno mogu objasniti manjim uzorkom.

PAH-u je u našoj studiji imalo 3,85% ispitanika sa VSD-om, što je u skladu sa izvještajima drugih autora [137].

Od 52 ispitanika sa VSD-om, defekt se spontano zatvorio do kraja prve godine života kod 32, odnosno kod 61,54%, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su istraživanja radili u približno istom vremenskom periodu. Tako *Cresti* sa saradnicima u istraživanju objavljenom 2018. godine navodi da je učestalost spontanog zatvaranja izolovanog VSD-a u prvoj godini 60,2% [56]. Starije studije su izvještavale o nižoj stopi spontanog zatvaranja VSD u prvoj godini (44%) [59], a novija istraživanja o značajno višoj (82%) [20], što se može objasniti porastom stope otkrivanja ove anomalije zahvaljujući napretku u dijagnostici.

Ispitivali smo moguće prediktore spontanog zatvaranja VSD-a. U našem istraživanju, ono nije zavisilo od pola ispitanika. Bilo je samo neznatno više zastupljeno kod ispitanika muškog pola u odnosu na ispitanike ženskog pola (66,67% naspram 56%), što u svom radu navode i *Li X* i saradnici, dok su *Farina* i saradnici našli da je nešto veća učestalost spontanog zatvaranja kod ženskog pola. U našoj kao i u navedenim studijama navedena razlika nije bila statistički značajna [137, 138]. *Cresti* i saradnici, sa druge strane, su utvrdili da je muški pol negativan prognostički faktor za spontano zatvaranje VSD-a [56].

Slično rezultatima drugih studija, nismo našli da je učestalost spontanog zatvaranje defekta značajno različita kod prijevremeno rođene djece i djece rođene u terminu, kao ni da zavisi od uhranjenosti djeteta na rođenju [57, 137].

Naši rezultati su potvrdili dobro poznatu činjenicu da stopa spontanog zatvaranja VSD-a zavisi od veličine defekta. Među defektima koje smo proučavali, trivijalni su se, očekivano, zatvorili u najvećem broju slučajeva (85,71%). Ipak, u tri slučaja trivijalni defekt je ostao otvoren do kraja perioda praćenja. Ovo je posebno neočekivano jer se u svim slučajevima radilo o defektu u mišićnom dijelu septuma i kod ispitanika nije zabilježena PAH, što su povoljni prognostički faktori za njegovo zatvaranje. Ovaj rezultat nas navodi na zaključak da i drugi, nama nepoznati, faktori utiču na zatvaranje defekta, što bi moglo biti predmet budućih istraživanja. Mali defekti su se zatvorili u 66,67%, a srednji u 31,58% slučajeva.

Utvrđili smo da stopa spontanog zatvaranja defekta zavisi i od njegove lokacije. Kod mišićnih defekata, ukupna stopa zatvaranja iznosila je 75%, a najveća je bila kod mišićnih defekata u apikalnom dijelu septuma (80,95%), nešto manja kod defekata u srednjem dijelu mišićnog septuma (73,33%), a najmanja kod defekata u prednjem dijelu septuma (50%). *Miyake, Li* i *Cresti* sa saradnicima su u svojim zasebnim istraživanjima našli slične stope spontanog zatvaranja mišićnih defekata, s tim da su srednji mišićni defekti u njihovim studijama imali veću stopu spontanog zatvaranja u odnosu na defekte u apikalnom dijelu septuma [56, 57, 137]. Nešto manja stopa zatvaranja srednjih mišićnih u odnosu na apikalne mišićne defekte u našoj studiji mogla bi se objasniti njihovom većom prosječnom veličinom u odnosu na veličinu apikalnih mišićnih defekata (0,31 mm u odnosu na 0,26 mm), što predstavlja statistički značajnu razliku ($p=0,03$). Poznato je da se defekti u perimembranoznom dijelu septuma rjeđe spontano zatvaraju u odnosu na mišićne, pri čemu stopa njihovog spontanog zatvaranja široko varira između studija i kreće se od 12,5% do 57% [20, 55, 63, 64, 137]. Ovako veliki raspon rezultata može se objasniti razlikama u starosti ispitanika i dužinom njihovog praćenja među studijama. U našoj studiji, perimembranozni VSD se spontano zatvorio u 16,67% slučajeva. Niža stopa spontanog zatvaranja perimembranoznog VSD-a u našoj studiji u odnosu na rezultate većine drugih studija može se objasniti relativno većom prosječnom veličinom perimembranoznog defekta (0,49 mm) kod naših ispitanika i činjenicom da se perimembranozni defekti prosječno zatvaraju u kasnijoj dobi u odnosu na dob ispitanika u našoj studiji [56].

Generalno, multipli VSD se rjeđe i kasnije zatvaraju od VSD kod kog postoji samo jedan defekt, što se objašnjava većim šantom. *Cresti* i saradnici navode da se samo 20% multiplih defekata zatvori do kraja prve godine života [56]. U našem istraživanju 44,44% multiplih defekata se spontano zatvorilo do kraja prve godine, što nije statistički značajno različito od stope zatvaranja koja je bila u slučaju jednog defekta (65,12%).

Ranija istraživanja su utvrdila da je PAH negativan faktor za spontano zatvaranje VSD-a [60, 137, 139] i da bi se ona trebala prije smatrati kliničkom manifestacijom VSD-a nego prognostičkim faktorom [139]. U našem istraživanju samo dva ispitanika sa VSD-om su imala PAH-u i kod oba defekt je ostao otvoren do kraja prve godine života.

Možemo zaključiti da nam, od opštih karakteristika bolesnika i ehokardiografskih parametara, za predviđanje spontanog toka izolovanog VSD-a mogu pomoći veličina defekta, njegova lokacija i postojanje PAH.

6.2. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu kod VSD-a

Etiopatogeneza VSD-a i uopšte kongenitalnih srčanih anomalija nije u potpunosti razjašnjena. Kardiogeneza uključuje karakteristične mehanizme ćelijske proliferacije, rearanžiranja ćelija, interakcije između ćelija i ćelija matriksa i remodeliranje tkiva. S obzirom na značaj koji MMP-e i njihovi tkivni inhibitori imaju u procesima remodeliranja ECM, više istraživanja se bavilo njihovom ulogom u procesima fiziološke i patološke kardiogeneze, pri čemu su najviše ispitivane MMP bile MMP-2 i MMP-9. Njihove povećane koncentracije u krvi dovedene su u sigurnu vezu sa poremećajima remodeliranja miokarda, koji, na primjer, može dovesti do dilatacije lijevog ventrikula u ranom stadijumu nakon infarkta miokarda [114, 115]. Studijama na životinjama utvrđeno je da MMP-2 ima značaj u normalnoj kardiogenezi [118-120]. Za razliku od mnogobrojnih istraživanja uloge MMP u kardiovaskularnim oboljenjima poput hipertenzije, ateroskleroze i srčane insuficijencije [76, 99, 105, 110-113], rijetka su istraživanja koja su se bavila ispitivanjem njihove uloge u procesima kardiogeneze kod čovjeka. *Spinale* i saradnici su dokazali da MMP-e, uključujući MMP-2 i MMP-9, imaju značajnu ulogu u kardiogenezi kod čovjeka i da ona može biti i korisna i štetna [109]. O mogućoj ulozi MMP u nastanku kongenitalnih srčanih anomalija kod čovjeka, a posebno kod pacijenata koji su razvili PAH-u, govore i *Kiliç* i saradnici [9]. *Cheng* i saradnici su dokazali da MMP-2 i MMP-9 imaju ulogu u nastanku i zatvaranju VSD-a [8]. U svim navedenim istraživanjima MMP su određivane u krvi ispitanika.

U literaturi je mali broj istraživanja u kojim je za ispitivanje uloge MMP u etiopatogenezi kongenitalnih anomalija korišten urin ispitanika, a među njima su posebno rijetka istraživanja koja su se bavila anomalijama kardiovaskularnog sistema. Prije više od 20 godina utvrđeno je da se MMP nalaze u urinu ljudi oboljelih od maligne bolesti, što je bilo očekivano s obzirom na stepen remodeliranja tkiva kod ovih oboljenja [140]. Međutim, njihovo prisustvo u urinu djece sa urođenim anomalijama predstavljalo je svojevrsno iznenađenje koje je prvi put objavio *Marler* sa saradnicima 2005. godine [125]. Ovi autori su dokazali da se MMP u urinu mogu otkriti u svojim intaktnim i potpuno funkcionalnim oblicima kod pacijenata sa vaskularnim malformacijama i da postoji pozitivna korelacija njihove koncentracije u urinu i progresije bolesti [125]. Do sada, međutim, nije objavljeno istraživanje uloge MMP i TIMP-a u etiopatogenezi VSD-a, niti uopšte kongenitalnih anomalija srca, u kom su određivane njihove koncentracije u urinu. U nedostatku takvih studija, naše rezultate poredimo sa rezultatima studija koje su određivale MMP i TIMP u urinu kod drugih bolesti i sa rezultatima studija koje

su se bavile kongenitalnim srčanim manama, posebno VSD-om, a u kojima su se određivale MMP-e i TIMP u krvi.

Mi smo, koristeći *ELISA* metodu, odredili nivoe MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece sa VSD-om prosječne starosti 31,92 dana i izvršili poređenje rezultata sa rezultatima kod zdrave djece. Utvrdili smo da su koncentracije ovih proteina statistički značajno više ($p=0,00$) u urinu djece sa VSD-om u odnosu na njihovu koncentraciju kod zdrave djece i da postoji pozitivna korelacija njihove koncentracije i veličine defekta, odnosno težine bolesti. Ova korelacija je bila visoka u slučaju MMP-9 ($r=0,70$) i TIMP-1 ($r=0,61$), a slaba u slučaju MMP-2 ($r=0,44$) i TIMP-2 ($r=0,48$). *Cheng* i saradnici su u svom istraživanju utvrdili da su u krvi djece sa VSD-om viši nivoi MMP-2 i MMP-9 u odnosu na zdravu djecu i da postoji pozitivna korelacija nivoa MMP-9 i veličine VSD-a [8]. Za MMP-2 isti autori nisu našli da njegova koncentracija u krvi korelira sa veličinom defekta [8]. *Kiliç* i saradnici su takođe našli više koncentracije ovih MMP, ali i tkivnog inhibitora 1, u krvi djece sa kongenitalnim srčanim anomalijama u poređenju sa zdravom djecom, ali da je samo kod MMP-2 ta razlika bila statistički značajna [9]. Isti autori su utvrdili i da postoji pozitivna korelacija MMP-2 i TIMP-1 sa ehokardiografskim parametrima, a za TIMP-2 nisu našli da je njegova koncentracija različita od koncentracije kod zdrave djece [9]. *Cheung* i saradnici su dokazali da su koncentracije u krvi MMP-2 i MMP-9 kod pacijenata sa operativno korigovanim srčanim anomalijama, tipa tetralogije *Fallot*, značajno povećane u odnosu na zdrave osobe [141].

Naši i rezultati navedenih studija ukazuju da MMP-2 i MMP-9 i TIMP-1, a prema našim rezultatima i TIMP-2, imaju ulogu u etiopatogenezi VSD-a i drugih urođenih srčanih anomalija kod čovjeka. Naime, njihove povećane koncentracije ukazuju na povećanu degradaciju ECM koja može biti u osnovi poremećaja arhitekture miokarda.

Objašnjenje povezanosti povećane degradacije ECM i VSD-a možemo naći u opterećenju desne komore volumenom i pritiskom koji kod ove anomalije može nastati uslijed postojanja lijevo-desnog šanta. Poznato je da je ovo preopterećenje praćeno remodeliranjem miokarda komora, ali mehanizmi koji doprinose ovom progresivnom procesu nisu do kraja razjašnjeni. *Spinale* i saradnici navode da je kod remodeliranja miokarda komora, koje je uzrokovano hroničnim volumnim preopterećenjem, djelomična razgradnja ECM uglavnom povezana sa povećanjem aktivnosti MMP-a [142]. Smatra se, međutim, da u remodeliranju miokarda mnoge vrste MMP-e imaju specifične uloge [116] i da različiti stimulusi selektivno utiču na njihovu aktivnost i ekspresiju, što, zauzvrat, utiče na cjelokupni proces remodeliranja miokarda. *Nagatomo* i saradnici su, u eksperimentima na psima, dokazali da se aktivnost MMP-9

povećava više od tri puta tokom akutnog preopterećenja srčane komore volumenom, ali da se u kasnijem toku ona smanjuje na normalne vrijednosti, te da se aktivnost MMP-1 smanjuje za 50% kod porasta volumena ali ne i kod porasta pritiska u lijevoj komori, a da se aktivnost MMP-3 povećava za oko 40% kod akutnog, a za 80% kod hroničnog porasta pritiska u komori [143].

U aktivnom remodeliranju miokarda dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da od MMP-a najvažniju ulogu imaju MMP-2 i MMP-9, zbog čega njih mnogi autori smatraju dijagnostičkim i prognostičkim markerima kardiovaskularnih oboljenja [110-113]. Prema *Blankenburg*-u i njegovim kolegama, pored informacija koje dobijamo od tradicionalnih prognostičkih markera poput nivoa holesterola, informacija o nivou MMP-9 u krvi predstavlja najznačajniju prognostičku informaciju za pacijente sa koronarnim oboljenjem [144].

6.3. Zavisnost nivoa MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ispitanika sa VSD-om od opštih karakteristika ispitanika i ehokardiografskih karakteristika anomalije

Ispitivali smo da li koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu zavise od pola kod djece sa VSD-om i kod zdrave djece. Našli smo da je vrijednost TIMP-1 kod djece sa VSD-om statistički značajno viša kod ženskog pola u odnosu na njenu vrijednost kod muškog pola. I vrijednosti MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 su bile više kod ženskih ispitanika u odnosu na muške, ali navedena razlika nije bila statistički značajna. U kontrolnoj grupi nije nađeno da vrijednosti ovih MMP-a i TIMP-a zavise od pola. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima *Thraillkilla* i saradnika na osnovu kojih vrijednosti MMP-2 i MMP-9 u urinu zdravih osoba ne zavise od pola [145]. Vrlo malo je do sada objavljenih studija koje su se bavile ispitivanjem zavisnosti koncentracije TIMP-a od pola kod zdravih ljudi i to su uglavnom bile studije koje su ispitivale stariju populaciju. *Komosinska-Vassev* je sa saradnicima ispitivala zavisnost koncentracija MMP-3, MMP-10, TIMP-1 i TIMP-2 u krvi zdravih osoba od starosti i pola i našla da je nivo TIMP-1 u prvoj i drugoj deceniji života viši kod ženskog pola u odnosu na muški pol, kao i da se on tokom života ne mijenja značajno kod ženskog pola, a da kod muškog pola od početka treće decenije počinje da raste i postaje viši u odnosu na njenu koncentraciju kod ženskog pola [146]. I rezultati studije *Sundstroma* i saradnika govore da su koncentracije TIMP-1 u krvi odraslih osoba veće kod muškog pola i da njegove vrijednosti u krvi pozitivno koreliraju sa dobi i BMI ispitanika [147]. *Komosinska-Vassev* sa saradnicima je utvrdila i da je

u prve četiri decenije života TIMP-2 u krvi viši kod muškog u odnosu na ženski pol [146]. Zbog razlike u dobi ispitanika, rezultati naše i navedenih studija su teško uporedivi.

Utvdili smo da su vrijednosti MMP-2 u urinu djece sa VSD-om bile značajno više kod one koja su rođena u terminu u odnosu na prijevremeno rođenu djecu, dok kod zdrave djece nije nađeno da koncentracija ove MMP-e u urinu zavisi od gestacijske starosti. Za MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 utvdili smo da vrijednosti u urinu ne zavise od gestacijske starosti ni kod ispitanika sa VSD-om niti kod zdravih ispitanika. Zavisnost MMP-a i TIMP-a od gestacijske starosti ispitivali smo za defekte različite veličine i utvdili da su u slučaju trivijalnog defekta vrijednosti obe ispitivane MMP-e značajno bile više kod djece rođene u terminu u odnosu na prijevremeno rođenu djecu, dok u slučaju malog i srednjeg VSD-a njihova vrijednost nije zavisila od gestacijske starosti. U slučaju TIMP-1 i TIMP-2, koncentracija u urinu nije zavisila od gestacijske starosti za sve veličine defekta. Pregledom literature nismo našli istraživanje koje se bavilo uticajem gestacijske starosti na vrijednosti MMP-a i TIMP-a kod anomalija. Među rijetkim radovima koji su se bavili određivanjem njihovih fizioloških koncentracija izdvaja se rad *Schultz-a* i saradnika u kom su određivane koncentracije MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u plazmi novorođenčadi različite gestacijske starosti [148]. Autori navode da su kod novorođenčadi rođene u terminu koncentracije MMP-2 i MMP-9 u plazmi niže u odnosu na djecu rođenu prije termina, a da su, suprotno tom, koncentracije TIMP-1 kod njih bile više. Za koncentraciju TIMP-2 u plazmi autori su utvdili da ne zavisi od gestacijske starosti [148]. Njihovi rezultati, kao i naši, govore o mogućoj zavisnosti koncentracija MMP-2 i MMP-9 i njihovih tkivnih inhibitora od gestacijske starosti, s tim da se različiti rezultati mogu objasniti različitom metodologijom rada kao i brojnim fiziološkim i, posebno kod prijevremeno rođene djece, mnogim patološkim procesima karakterističnim za novorođenačku dob.

Kod pacijenata sa kongenitalnim srčanim anomalijama u ranoj fazi nastanka PAH-e utvrđeno je da u ECM dolazi do degradacija elastina [149]. Ulogu u njegovoj degradaciji ima MMP-2, a dokazano je da hipoksija endotelnih ćelija dovodi po njegove povećane ekspresije [150]. Kod urođenih srčanih anomalija, poput velikog VSD-a, uslijed hipoksije dolazi do povećane proliferacije i migracije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i sinteze proteina ECM koji remodeliraju plućnu vaskularnu mrežu i povećavaju rizik od plućne hipertenzije i srčane insuficijencije [151]. *Frisdal* i saradnici su našli da je ekspresija MMP-2 u plućima pasa sa PAH-om izazvanom hipoksijom povećana i da postoji pozitivna korelacija između njene aktivnosti i težine PAH-e [152]. Ovaj nalaz ukazuje na ulogu MMP-2 u nastanku PAH-e

procesima remodeliranja ECM povezanih sa hipoksijom. Pored hipoksije, ovi autori navode i da bi dejstvo mehaničke sile, poput pritiska i istezanja krvnih sudova pluća, mogao biti drugi mehanizam nastanka povećane ekspresije MMP-2 [152]. Da TIMP-1 ima ulogu u nastanku PAH-e kod kongenitalnih srčanih anomalija ukazuje njegova značajno viša koncentracija u krvi djece sa ovim anomalijama koja imaju PAH-u u odnosu na djecu koja takođe imaju kongenitalnu srčanu anomaliju ali kod kojih je pritisak u plućnim krvnim sudovima normalan [9]. Takođe, kod pacijenata sa idiopatskom PAH-om, zabilježena je neravnoteža između nivoa TIMP-1 i MMP-3 i visoke vrijednosti MMP-2 u poređenju sa zdravim osobama [153]. U našem istraživanju nismo dokazali da koncentracije ispitivanih MMP-a i TIMP-a u urinu zavise od postojanja PAH-e, što bi se moglo najvjerojatnije objasniti malim uzorkom s obzirom da su samo dva ispitanika u našoj studiji imala PAH-u. Ipak, našli smo da je koncentracija TIMP-1 u urinu kod njih bila veća u odnosu njenu koncentraciju kod ispitanika sa VSD-om koji nisu imali PAH-a, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost.

Dobro je poznato da osobe koje su rođene sa malom tjelesnom masom imaju povećan rizik za kardiovaskularna i metabolička oboljenja, što se smatra posljedicom programiranja vaskularnog endotela tokom fetalnog života [154]. Da MMP-2 i MMP-9 mogu imati ulogu u ovom procesu govore rezultati istraživanja *Sesso*-a i saradnika koji su utvrdili da su kod ovih osoba više vrijednosti MMP-2 i MMP-9 između 8. i 13. godine života u odnosu na djecu sa normalnom težinom na rođenju [155]. Pregledom literature nismo našli da je objavljeno istraživanje povezanosti tjelesne mase i nivoa ovih MMP na rođenju, a naši podaci govore da se nivo MMP-2 i MMP-9 i njihovih tkivnih inhibitora u urinu ne razlikuje kod djece koja su bila eutrofična i djece koja su bila hipotrofična na rođenju. Ostaje da se uradi istraživanje o postojanju razlike nivoa MMP kod djece sa normalnom tjelesnom masom na rođenju i djece koja su bila hipertrofična. Ovo istraživanje bi moglo dati zanimljive rezultate jer je ispitivanjima na starijoj populaciji već utvrđena veza između ekspresije MMP i gojaznosti, mada ova uloga MMP nije do kraja rasvijetljena [156-158].

Ispitivali smo da li koncentracije MMP i TIMP-a zavise od ehokardiografskih parametara poput lokacije i broja defekata. Iako razlika nije dostigla statističku značajnost, utvrdili smo više vrijednosti MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu kod ispitanika sa defektom u perimembranoznom dijelu septuma u odnosu na njihove vrijednosti u urinu ispitanika koji su imali defekt u nekom od mišićnih dijelova septuma. Moguće objašnjenje ovog rezultata je statistički značajno veća prosječna veličina perimembranoznog defekta u odnosu na veličine mišićnih defekata u našem istraživanju, a prethodno smo dokazali da postoji pozitivna

korelaciju njihove koncentracije i veličine defekta. Drugi razlog bi mogli biti različiti procesi remodeliranja EMC, s obzirom na različitu histološku građu ivica kod perimembranoznog i mišićnih defekata. Naši rezultati govore da vrijednosti MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ne zavise od broja defekata. *Baggen* i saradnici takođe nisu našli da nivoi MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u krvi ovise o ehokardiografskim parametrima kod odraslih stabilnih pacijenata sa kongenitalnim srčanim anomalijama [159].

6.4. Zavisnost nivoa MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 od spontanog zatvaranja VSD-a

Sa ciljem otkrivanja biomarkera, kao potencijalnih prediktora, za spontano zatvaranje VSD-a, poredili smo koncentracije MMP-a i TIMP-a u urinu djece kod koje se VSD tokom praćenja spontano zatvorio i djece kod kojih je on ostao otvoren do kraja prve godine života i našli da je koncentracija MMP-9 bila značajno viša kod djece kod koje se VSD tokom daljeg praćenja nije zatvorio. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima studija koje su se bavile ispitivanjem MMP-9 kod infarkta miokarda i drugih kardiovaskularnih bolesti, a koje su povezale visoke vrijednosti ove MMP sa poremećajima remodeliranja miokarda i predložile MMP-9 za indikatora ishoda bolesti [110-113].

U našim rezultatima, koncentracije MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu se ne razlikuju značajno kod djece kod koje se defekt zatvorio i one kod koje je ostao otvoren. *Cheng* i autori su takođe utvrdili da koncentracije MMP-2 u serumu nisu ovisne o zatvaranju defekta [8]. Na osnovu naših rezultata, dakle, vrijednosti MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ne mogu se smatrati prediktorom spontanog zatvaranja VSD-a u prvoj godini života, s obzirom da njihova vrijednost nije bila značajno različita kod ispitanika kod kojih se defekt zatvorio i onih kod koje je on ostao otvoren i nakon prve godine.

Istraživali smo postojanje razlike u koncentracijama MMP-a i TIMP-a u urinu zavisno od prisustva spontanog zatvaranja defekta i gestacijske starosti ispitanika i našli da je u grupi u kojoj se defekt zatvorio, vrijednost MMP-2 bila značajno viša kod ispitanika koji su rođeni u terminu u odnosu na one koji su rođeni prijevremeno. U slučaju kada je defekt ostao otvoren, vrijednost MMP-2 nije zavisila od gestacijske starosti. Vrijednosti MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 nisu zavisile od gestacijske starosti ni u slučaju da se defekt zatvorio, niti da je ostao otvoren.

U zaključku, možemo reći da naši rezultati ukazuju na ulogu MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u etiopatogenezi VSD-a i da bi njihovo određivanje u urinu, u kombinaciji sa ehokardiografskim i kliničkim praćenjem, moglo služiti u predikciji spontanog toka bolesti i određivanje najboljeg modaliteta praćenja i liječenja za svakog pojedinačnog bolesnika.

Ova studija ima nekoliko ograničenja koja treba uzeti u obzir. Prvo, nedostatak prethodnih istraživanja na ovu temu i relativno mali broj uključenih ispitanika predstavljaju izazov za tumačenje rezultata. Drugo, kako na koncentracije MMP-a i TIMP-a u organizmu mogu uticati i mnogobrojni fiziološki procesi, što je posebno izraženo u prvim mjesecima života, izmijenjeni profil MMP-a i TIMP-a možda u potpunosti ne odražava stvarne histološke promjene u miokardu. Pored toga, i različiti komorbiditeti mogu uticati na koncentracije MMP-a i TIMP-a u urinu, zbog složenih interakcija MMP-a i drugih biološki aktivnih supstrata [160-163]. I konačno, zbog visoke cijene *ELISA* kitova, nivoe MMP-a i TIMP-a određivali smo samo u jednom uzorku urina uzetom neposredno po postavljanju dijagnoze. Višestruka mjerenja tokom perioda praćenja doprinijela bi boljem razumijevanju korelacije između njihovih koncentracija u urinu i prirodnog toka VSD-a.

7. ZAKLJUČCI

1. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 su statistički značajno više u urinu djece koja imaju VSD u odnosu na zdravu djecu.
2. Postoji visoka pozitivna korelacija između veličine VSD-a i koncentracija MMP-9 i TIMP-1 i slaba pozitivna korelacija između veličine VSD-a i koncentracija MMP-2 i TIMP-2 u urinu.
3. MMP-9 u urinu u vrijeme postavljanja dijagnoze VSD-a je statistički značajno viša kod djece kod koje je VSD ostao otvoren u odnosu na djecu kod koje se on zatvorio do kraja prve godine života. Nivoi MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu se ne razlikuju kod djece kod koje je VSD ostao otvoren i djece kod koje se on zatvorio do kraja prve godine života
4. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ne zavise od lokacije defekta, broja defekata i postojanja PAH.
5. Koncentracija TIMP-1 u urinu djece koja imaju VSD zavisi od pola i statistički je značajno viša kod ženskog pola. Koncentracije MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 u urinu djece koja imaju VSD ne zavise od pola.
6. Kod djece koja imaju VSD, koncentracija MMP-2 u urinu zavisi od gestacijske starosti i statistički je značajno viša kod djece koja su rođena u terminu. Koncentracija MMP-9 u urinu ne zavisi od gestacijske starosti, izuzev u slučaju trivijalnog defekta kada je statistički značajno viša kod djece koja su rođena u terminu u odnosu na djecu koja su rođena prije termina. TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ne zavise od gestacijske starosti.
7. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu djece koja imaju VSD ne zavise od njihove uhranjenosti na rođenju.
8. Kod zdrave djece nivoi MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u urinu ne zavise od pola, gestacijske starosti i uhranjenosti na rođenju.

9. Naši rezultati ukazuju na ulogu MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 u etiopatogenezi VSD-a i da bi njihove koncentracije u urinu, naročito koncentracije MMP-9 i TIMP-1, u kombinaciji sa ehokardiografskim i kliničkim praćenjem, mogle služiti u predikciji spontanog toka bolesti.

8. LITERATURA

1. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970–2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol*. 2019 Apr 1;48(2):455-463. doi: 10.1093/ije/dyz009.
2. EUROCAT. Prevalence charts and tables (per 10,000 births) for all full registries from 2015 to 2019. 2021. Available at: <http://www.eurocat-network.eu/accessprevalencedata/prevalencetables>. [Accessed 2021 December 4th].
3. Sillesen AS, Vøgg O, Pihl C, Raja AA, Sundberg K, Vedel C, et al. Prevalence of Bicuspid Aortic Valve and Associated Aortopathy in Newborns in Copenhagen, Denmark. *JAMA*. 2021 Feb 9;325(6):561-567. doi: 10.1001/jama.2020.27205. PMID: 33560321; PMCID: PMC7873775.
4. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005 Nov;6(11):826-35.
5. Tan CMJ, Lewandowski AJ. The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life. *Fetal Diagn Ther*. 2020;47(5):373-386. doi: 10.1159/000501906. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31533099; PMCID: PMC7265763.
6. Van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58: 2241-2247. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.025.
7. Tsai CY, Lai CH, Chang MH, Jong GP, Cheng YC, Tsai FJ, et al. IGF-II and MMP9 as surgical repair indicators of ventricular septal defects. *Clin Chim Acta*. 2011 Apr 11;412(9-10):761-5. doi: 10.1016/j.cca.2011.01.005. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21238444.
8. Cheng KS, Liao YC, Chen MY, Kuan TC, Hong YH, Ko L, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 enzyme activities in the children with ventricular septal defect. *Int J Biol Sci*. 2013;9(6):557-563. Published 2013 Jun 12. doi:10.7150/ijbs.6398.
9. Kılıç Z, Uçar B, Özdemir G, Çolak Ö, Bal C, Ertuğrul T. Circulating matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases levels in pediatric

- patients with congenital heart disease: Relationship to cardiac functions. *Anatol J Cardiol.* 2014;14(6):531-541. doi: 10.5152/akd.2014.4950. PMID: 25233500.
10. Franklin R, Béland M, Colan S, Walters H, Aiello V, Anderson R, et al. Nomenclature for congenital and paediatric cardiac disease: The International Paediatric and Congenital Cardiac Code (IPCCC) and the Eleventh Iteration of the International Classification of Diseases (ICD-11). *Cardiology in the Young.* 2017;27(10):1872-1938. doi:10.1017/S1047951117002244.
 11. Lopez L, Houyel L, Colan SD, Anderson RH, Béland MJ, Aiello VD, et al. Classification of Ventricular Septal Defects for the Eleventh Iteration of the International Classification of Diseases-Striving for Consensus: A Report From the International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease. *Annals of Thoracic Surgery.* 2018 Nov;106(5):1578-1589. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.06.020>.
 12. Spicer DE, Hsu HH, Co-Vu J, Anderson RH, Fricker FJ. Ventricular septal defect. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:144. doi: 10.1186/s13023-014-0144-2.
 13. Glazbrook AJ. Eisenmenger's complex. *Br Heart J.* 1943;5:147-151.
 14. Roger H. Clinical researches on the congenital communication of the two sides of the heart by failure of occlusion of the interventricular septum. *Bull de l' Acad de Med.* 1879;8:1074.
 15. Eisenmenger V. Die angeborenen Defekte der Kammerscheidewände des Herzens. *Zeitschrift für Klinische Medicin.* 1897;32(Suppl.):1-28.
 16. Nashat H, Kempny A, McCabe C, Price LC, Harries C, Alonso-Gonzalez R, et al. Eisenmenger syndrome: current perspectives. *Research Reports in Clinical Cardiology.* 2017;8:1-12. doi: org/10.2147/RRCC.S117838.
 17. McDaniel NL, Gutgesell HP. Ventricular septal defects. In: Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DD, editors. *Moss and Adam's Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents.* Baltimore: Williams & Wilkins. 2000;1151-1178.
 18. Gómez O, Martínez JM, Olivella A, Bennasar M, Crispí F, Masoller N, et al. Isolated ventricular septal defects in the era of advanced fetal echocardiography: risk of chromosomal anomalies and spontaneous closure rate from diagnosis to age of 1 year. *Ultrasound Obstet Gynecol,* 2014;(43):65-71. doi: org/10.1002/uog.12527.

19. Zhang J, Ko JM, Guileyardo JM, Roberts WC. A review of spontaneous closure of ventricular septal defect. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2015;28(4):516-520. doi:10.1080/08998280.2015.11929329.
20. Zhao QM, Niu C, Liu F, Wu L, Ma XJ, Huang GY. Spontaneous Closure Rates of Ventricular Septal Defects (6,750 Consecutive Neonates). *Am J Cardiol*. 2019 Aug 15;124(4):613-617. doi: 10.1016/j.amjcard.2019.05.022. Epub 2019 May 25. Erratum in: *Am J Cardiol*. 2020 Jan 15;125(2):302. PMID: 31208700.
21. Wu W, He J, Shao X. Incidence and mortality trend of congenital heart disease at the global, regional, and national level, 1990-2017. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jun 5;99(23):e20593. doi: 10.1097/MD.00000000000020593. PMID: 32502030; PMCID: PMC7306355.
22. Zikarg YT, Yirdaw CT, Aragie TG. Prevalence of congenital septal defects among congenital heart defect patients in East Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021 Apr 22;16(4):e0250006. doi: 10.1371/journal.pone.0250006. PMID: 33886628; PMCID: PMC8062078.
23. Cox AT, Boos CJ, Sharma S. The Hearts of Heroes: the epidemiology of cardiac disease in the UK Armed Forces. *J R Army Med Corps*. 2015;161:169-72.
24. Jicinska H, Vlasin P, Jicinsky M, Grochova I, Tomek V, Volaufova J, et al. Does First-Trimester Screening Modify the Natural History of Congenital Heart Disease? Analysis of Outcome of Regional Cardiac Screening at 2 Different Time Periods. *Circulation*. 2017 Mar 14;135(11):1045-1055. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020864. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28143885.
25. Cai M, Huang H, Su L, Lin N, Wu X, Xie X, et al. Chromosomal abnormalities and copy number variations in fetal ventricular septal defects. *Mol Cytogenet*. 2018 Nov 28;11:58. doi: 10.1186/s13039-018-0408-y. PMID: 30519285; PMCID: PMC6264052.
26. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al; on behalf of the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Council on Genomic and Precision Medicine. Genetic basis for congenital heart disease: re-visited: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138(21):e653-e711. doi: 10.1161/CIR.0000000000000606.

27. Muthialu N, Balakrishnan S, Sundar R. Single patch closure of multiple VSDs through right atrial approach. *Indian Heart J.* 2018 Jul-Aug;70(4):578-579.
28. Durden RE, Turek JW, Reinking BE, Bansal M. Acquired ventricular septal defect due to infective endocarditis. *Ann Pediatr Cardiol.* 2018 Jan-Apr;11(1):100-102.
29. Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, Li Z. GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease. *Europ. J. Med. Genet.* 2008;51:527-535.
30. Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, Mebus S, Sperling HP, Ebner A, et al. Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum Mutat.* 2005 Dec;26(6):575-82. doi: 10.1002/humu.20262. PMID: 16287139.
31. Wang J, Xin YF, Liu XY, Liu ZM, Wang XZ, Yang YQ. A novel NKX2-5 mutation in familial ventricular septal defect. *Int J Mol Med.* 2011 Mar;27(3):369-75. doi: 10.3892/ijmm.2010.585. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21165553.
32. Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Traverso I, Kuhls B, Inga A, Borlak J. A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 1;18(19):3567-78. doi: 10.1093/hmg/ddp305. Epub 2009 Jul 7. PMID: 19586923.
33. Van Praagh R, Geva T, Kreutzer J. Ventricular septal defects: how shall we describe, name and classify them?. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Nov;14(5):1298-9.
34. Dakkak W, Oliver TI. Ventricular Septal Defect. 2022 Jan 18. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29261884. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470330/>. [Accessed 2022 February 4th].
35. Pascall E, Tulloh RM. Pulmonary hypertension in congenital heart disease. *Future Cardiol.* 2018 Jul;14(4):343-353. doi: 10.2217/fca-2017-0065. Epub 2018 May 24. PMID: 29792339.
36. Wood P. The Eisenmenger syndrome or pulmonary hypertension with reversed central shunt. *Br Med J* 1958;2:755-62.
37. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D42-50. Epub 2013/12/21. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.032.

38. Soto B, Ceballos R, Kirklin JW. Ventricular septal defects: a surgical viewpoint. *J Am Coll Cardiol*. 1989 Nov 1;14(5):1291-7. doi: 10.1016/0735-1097(89)90430-0. PMID: 2808985.
39. Atlas of Human Cardiac Anatomy, University of Minnesota/© Medtronic [Accessed 2022 February 22nd]. Available from: <http://www.vhlab.umn.edu/atlas/congenital-defects-tutorial/septal-defects/ventricular-septal-defects.shtml>.
40. Eroğlu AG, Oztunç F, Saltik L, Bakari S, Dedeoğlu S, Ahunbay G. Evolution of ventricular septal defect with special reference to spontaneous closure rate, subaortic ridge and aortic valve prolapse. *Pediatr Cardiol*. 2003;(24):31-5. doi: 10.1007/s00246-002-1345-3.
41. Maagaard M, Heiberg J, Eckerström F, Asschenfeldt B, Rex CE, Ringgaard S, et al. Biventricular morphology in adults born with a ventricular septal defect. *Cardiol Young*. 2018 Dec;28(12):1379-1385. doi: 10.1017/S1047951118001361. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30160649.
42. Hadeed K, Hascoët S, Karsenty C, Ratsimandresy M, Dulac Y, Chausseray G, et al. Usefulness of echocardiographic-fluoroscopic fusion imaging in children with congenital heart disease. *Arch Cardiovasc Dis*. 2018;111(6-7):399-410. doi: 10.1016/j.acvd.2018.03.006. Epub 2018 May 28. PMID: 29853351.
43. Cho YS, Park SE, Hong SK, Jeong NY, Choi EY. The natural history of the fetal diagnosed isolated ventricular septal defect. *Prenat Diagn*. 2017;37(9):889-893. doi: 10.1002/pd.5100.
44. Rajiah P, Kanne JP. Computed tomography of septal defects. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2010 Jul-Aug;4(4):231-45. doi: 10.1016/j.jcct.2010.05.005. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20579615.
45. Nau D, Wuest W, Rompel O, Hammon M, Gloeckler M, Toka O, et al. Evaluation of ventricular septal defects using high pitch computed tomography angiography of the chest in children with complex congenital heart defects below one year of age. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2019 Jul-Aug;13(4):226-233. doi: 10.1016/j.jcct.2019.01.023. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30737152.
46. Fratz S, Chung T, Greil GF, Samyn MM, Taylor AM, Valsangiacomo Buechel ER, et al. Guidelines and protocols for cardiovascular magnetic resonance in children and adults with congenital heart disease: SCMR expert consensus group on congenital

- heart disease. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013 Jun 13;15(1):51. doi: 10.1186/1532-429X-15-51. PMID: 23763839; PMCID: PMC3686659.
47. Oye M, Zoltowska D, Gopireddy D, Percy R, Sattiraju S. A Complex Ventricular Septal Defect Causing Severe Aortic Insufficiency. *Cureus*. 2021 Jan 6;13(1):e12532. doi: 10.7759/cureus.12532. PMID: 33569260; PMCID: PMC7864680.
 48. Feltes TF, Bacha E, Beekman RH 3rd, Cheatham JP, Feinstein JA, Gomes AS, et al; American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; American Heart Association. Indications for cardiac catheterization and intervention in pediatric cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011 Jun 7;123(22):2607-52. doi: 10.1161/CIR.0b013e31821b1f10. Epub 2011 May 2. PMID: 21536996.
 49. Sendi P, Hasse B, Frank M, Flückiger U, Boggian K, Guery B, et al. Infective endocarditis: prevention and antibiotic prophylaxis. *Swiss Med Wkly*. 2021 Feb 15;151:w20473.
 50. Baumgartner H, De Backer J, Babu-Narayan SV, Budts W, Chessa M, Diller GP, et al; ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. *Eur Heart J*. 2021 Feb 11;42(6):563-645. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa554. PMID: 32860028.
 51. Correia Martins L, Lourenço R, Cordeiro S, Carvalho N, Mendes I, Loureiro M, et al. Catch-up growth in term and preterm infants after surgical closure of ventricular septal defect in the first year of life. *Eur J Pediatr*. 2016 Apr;175(4):573-9. doi: 10.1007/s00431-015-2676-4. Epub 2015 Dec 9. PMID: 26646145.
 52. Brown KN, Adnan G, Kanmanthareddy A. Catheter Management Of Ventricular Septal Defect. 2022 Feb 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30844204.
 53. Rao PS, Harris AD. Recent advances in managing septal defects: ventricular septal defects and atrioventricular septal defects. *F1000Res*. 2018 Apr 26;7:F1000 Faculty Rev-498. doi: 10.12688/f1000research.14102.1. PMID: 29770201; PMCID: PMC5931264.

54. Goldberg JF. Long-term Follow-up of "Simple" Lesions - Atrial Septal Defect, Ventricular Septal Defect, and Coarctation of the Aorta. *Congenit Heart Dis.* 2015 Sep-Oct;10(5):466-74.
55. Eroğlu AG, Atik SU, Sengenc E, Cig G, Saltik IL, Oztunç F. Evaluation of ventricular septal defect with special reference to the spontaneous closure rate, subaortic ridge, and aortic valve prolapse II. *Pediatr Cardiol.* 2017 Jun;38(5):915-921. doi: 10.1007/s00246-017-1597-6. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28401252.
56. Cresti A, Giordano R, Koestenberger M, Spadoni I, Scalese M, Limbruno U, et al. Incidence and natural history of neonatal isolated ventricular septal defects: do we know everything? A 6-year single-center Italian experience follow-up. *Congenit Heart Dis.* 2018;13(1):105-112. doi: 10.1111/chd.12528.
57. Miyake T, Shinohara T, Inoue T, Marutani S, Takemura T. Spontaneous closure of muscular trabecular ventricular septal defect: comparison of defect positions. *Acta Paediatr.* 2011;100(10):158-162. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02333.x.
58. Li X, Song GX, Wu LJ, Chen YM, Fan Y, Wu Y, et al. Prediction of spontaneous closure of isolated ventricular septal defects in utero and postnatal life. *BMC Pediatr.* 2016;16(1):207.
59. Krovetz LJ. Spontaneous closure of ventricular septal defect. *Am J Cardiol* 1998;81(1):100-101.
60. Xu Y, Liu J, Wang J, Liu M, Xu H, Yang S. Factors influencing the spontaneous closure of ventricular septal defect in infants. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5614-23. PMID: 26191273; PMCID: PMC4503144.
61. Ramaciotti C, Vetter JM, Bornemeier RA, Chin AJ. Prevalence, relation to spontaneous closure, and association of muscular ventricular septal defects with other cardiac defects. *American Journal of Cardiology.* 1995;75(1):61-65.
62. Erol O, Sevket O, Keskin S, Yazıcıoğlu HF, Gül A. Natural history of prenatal isolated muscular ventricular septal defects. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2014;15(2):96-99.
63. Turner SW, Hunter S, Wyllie JP. The natural history of ventricular septal defects. *Arch Dis Child.* 1999;81(5):413-416.
64. Meberg A, Otterstad JE, Frøland G, Lindberg H, Sørland SJ. Outcome of congenital heart defects - a population-based study. *Acta Paediatr.* 2000;89(11):1344-1351.

65. Dasgupta S, Aly AM. An Unusual Mechanism of Closure of Muscular Ventricular Septal Defects. *Case Rep Pediatr.* 2017;2017:4303298. doi: 10.1155/2017/4303298. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29130013; PMCID: PMC5654272.
66. Roberts WC, Morrow AG, Mason DT, Braunwald E. Spontaneous closure of ventricular septal defect, anatomic proof in an adult with tricuspid atresia. *Circulation.* 1963;27:90-94.
67. Glancy DL, Roberts WC. Complete spontaneous closure of ventricular septal defect: necropsy study of five subjects. *Am J Med* 1967;43(6):846-853.
68. Collins G, Disenhouse R, Keith JD. Spontaneous closure of ventricular septal defect. *Can Med Assoc J.* 1969;100(16):737-743.
69. Cozijnsen MA, Cozijnsen L, Maas AC, Bakker-de Boo M, Bouma BJ. A ventricular septal defect with a giant appendiform aneurysm of the membranous septum. *Neth Heart J.* 2013;21(3):152-154.
70. Moe DG, Guntheroth WG. Spontaneous closure of uncomplicated ventricular septal defect. *Am J Cardiol.* 1987;60(8):674-678.
71. Anderson RH, Lenox CC, Zuberbuhler JR. Mechanisms of closure of perimembranous ventricular septal defect. *Am J Cardiol.* 1983;52(3):341-345.
72. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28413025; PMCID: PMC5430303.
73. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol.* 2016;32(5):659-68.
74. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801.
75. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J.* 2004 Apr;18(6):734-6. doi: 10.1096/fj.03-0966fje. Epub 2004 Feb 6. PMID: 14766790.
76. Papadopoulos DP, Makris TK, Krespi PG, Poulakou M, Papazachou OG, Hatzizacharias AN, et al. Changes in metalloproteinases in healthy normotensive

- patients with high-normal blood pressure. *Eur Cytokine Netw*. 2005 Sep;16(3):211-4. PMID: 16266862.
77. Lin CS, Lai LP, Lin JL, Sun YL, Hsu CW, Chen CL, et al. Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007 Jul;4(7):938-49. doi: 10.1016/j.hrthm.2007.03.034. Epub 2007 Apr 6. PMID: 17599682.
 78. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Jun 15;48(6):1014-22. doi: 10.1073/pnas.48.6.1014. PMID: 13902219; PMCID: PMC220898.
 79. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739. PMID: 33419373; PMCID: PMC7767220.
 80. Van den Steen PE. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2002;37:375-536.
 81. Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int*. 2010 Jul;60(7):477-96. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02547.x. PMID: 20594269; PMCID: PMC3745773.
 82. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015. PMID: 20371345; PMCID: PMC2862057.
 83. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
 84. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177-183. doi: 10.3109/14756366.2016.1161620. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27028474.
 85. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, et al. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. 2010;17(31):3751-68.

86. Moracho N, Learte AIR, Muñoz-Sáez E, Marchena MA, Cid MA, Arroyo AG, et al. Emerging roles of MT-MMPs in embryonic development. *Dev Dyn*. 2022 Feb;251(2):240-275. doi: 10.1002/dvdy.398. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34241926.
87. Bourbonliou D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010 Jun;20(3):161-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.05.002. Epub 2010 May 12. PMID: 20470890; PMCID: PMC2941566.
88. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Compr Physiol*. 2015;6(1):215-54.
89. Ma Y, de Castro Bras LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, et al. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch*. 2014 Jun;466(6):1113-27. doi: 10.1007/s00424-014-1463-9. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24519465; PMCID: PMC4033805.
90. Suriawinata A. TIMP-2 inhibits angiogenesis, independent of MMP mechanism. *Lab Invest*. 2004;84, 6-7. doi.org/10.1038/labinvest.3700018.
91. Bourbonliou D, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2: An Endogenous Angiogenesis Inhibitor with Distinct Antitumoral Properties. *Treat Strategies Hematol*. 2012;2(1):31-35. PMID: 31380106; PMCID: PMC6677273.
92. Kaczorowska A, Miękus N, Stefanowicz J, Adamkiewicz-Drożyńska E. Selected Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and Their Inhibitor (TIMP-2) in Adult and Pediatric Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jul 31;10(8):547. doi: 10.3390/diagnostics10080547. PMID: 32751899; PMCID: PMC7460349.
93. Albin A, Gallazzi M, Palano MT, Carlini V, Ricotta R, Bruno A, et al. TIMP1 and TIMP2 Downregulate TGFβ Induced Decidual-like Phenotype in Natural Killer Cells. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 1;13(19):4955. doi: 10.3390/cancers13194955. PMID: 34638439; PMCID: PMC8507839.
94. Shimoda M. Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment. *Adv Clin Chem*. 2019;88:35-66. doi: 10.1016/bs.acc.2018.10.006. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30612606.
95. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018 Sep 27;18(10):3249. doi: 10.3390/s18103249. PMID: 30262739; PMCID: PMC6211011.

96. Bollmann M, Pinno K, Ehnold LI, Märtens N, Märtson A, Pap T, et al. MMP-9 mediated Syndecan-4 shedding correlates with osteoarthritis severity. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021 Feb;29(2):280-289. doi: 10.1016/j.joca.2020.10.009. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33246160.
97. Timokhina E, Strizhakov A, Ibragimova S, Gitel E, Ignatko I, Belousova V, et al. Matrix Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 Occupy a New Role in Severe Preeclampsia. *J Pregnancy*. 2020 Dec 16;2020:8369645. doi: 10.1155/2020/8369645. PMID: 33381317; PMCID: PMC7759403.
98. Beroun A, Mitra S, Michaluk P, Pijet B, Stefaniuk M, Kaczmarek L. MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(16):3207-3228. doi:10.1007/s00018-019-03180-8.
99. Friese RS, Rao F, Khandrika S, Thomas B, Ziegler MG, Schmid-Schönbein GW, et al. Matrix metalloproteinases: discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. *Clin Exp Hypertens*. 2009 Oct;31(7):521-33. doi: 10.3109/10641960802668730. PMID: 19886850; PMCID: PMC2875383.
100. Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Matrix Metalloproteases in Arterial Hypertension and their Trend after Antihypertensive Treatment. *Kidney Blood Press Res*. 2017;42:347-357.
101. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, et al. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016;594(17):4917-31.
102. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension*. 2005;45(4):687-91.
103. Durand MJ, Lombard JH. Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase expression. *Am J Hypertens*. 2013;26(6):739-47.
104. Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, Westin-Eriksson A, Wennbo H, Herslof M et al. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2006;71(3):586-95
105. Lekic A, Brekalo Z, Kvesic A, Kovacevic M, Baricev-Novakovic Z, Sutic I, et al. Crosstalk Between Enzyme Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and Regulatory T Cell

- Immunity in the Global Burden of Atherosclerosis. *Scand J Immunol*. 2017 Jul;86(1):65-71. doi: 10.1111/sji.12563. PMID: 28500763.
106. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al; GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2021 Apr 20;77(15):1958-1959. PMID: 33309175; PMCID: PMC7755038.
 107. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
 108. Rabkin SW. The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:239-265. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.002
 109. Spinale FG. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *APS*. 2007;87:1285-1342].
 110. Radosinska J, Barancik M, Vrbjar N. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9. *Panminerva Med*. 2017 Sep;59(3):241-253. doi: 10.23736/S0031-0808.17.03321-3. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28399617.
 111. Elhewala AA, Sanad M, Soliman AM, Sami MM and Ahmed AA. Matrix metalloproteinase-9 in pediatric rheumatic heart disease with and without heart failure. *Biomed Rep*. 2021;14(1):4, <https://doi.org/10.3892/br.2020.1380>.
 112. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2004 Jan;6(1):41-5. doi: 10.1016/j.ejheart.2003.05.002. PMID: 15012917.
 113. George J, Patal S, Wexler D, Roth A, Sheps D, Keren G. Circulating matrix metalloproteinase-2 but not matrix metalloproteinase-3, matrix metalloproteinase-9, or tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts outcome in patients with congestive heart failure. *Am Heart J*. 2005 Sep;150(3):484-7. doi: 10.1016/j.ahj.2004.11.016. PMID: 16169329.
 114. Miyazaki S, Kasai T, Miyauchi K, Miyazaki T, Akimoto Y, Takagi A, et al. Changes of matrix metalloproteinase-9 level is associated with left ventricular remodeling following acute myocardial infarction among patients treated with trandolapril,

- valsartan or both. *Circ J*. 2010 Jun;74(6):1158-64. doi: 10.1253/circj.cj-09-0412. Epub 2010 Apr 6. PMID: 20378999.
115. Kampourides N, Tziakas D, Chalikias G, Papazoglou D, Maltezos E, Symeonides D, et al. Usefulness of matrix metalloproteinase-9 plasma levels to identify patients with preserved left ventricular systolic function after acute myocardial infarction who could benefit from eplerenone. *Am J Cardiol*. 2012 Oct 15;110(8):1085-91. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.05.049. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22742718.
 116. Noji Y, Shimizu M, Ino H, Higashigata T, Yamauchi M, Nohara A, et al. Increased matrix metalloproteinase-2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy with systolic dysfunction. *Circ J* 2004; 68:355-60.
 117. Fedak PW, Altamentova SM, Weisel RD, Nili N, Ohno N, Verma S, et al. Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a possible regulatory role for TIMP-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Feb;284(2):H626-34. doi: 10.1152/ajpheart.00684.2002. Epub 2002 Oct 10. PMID: 12388270.
 118. Alexander SM, Jackson KJ, Bushnell KM, McGuire PG. Spatial and temporal expression of the 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) correlates with development and differentiation of valves in the embryonic avian heart. *Dev Dyn*. 1997;209(3):261-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199707)209:3<261::AID-AJA2>3.0.CO;2-G. PMID: 9215641.
 119. Cai DH, Vollberg TM Sr, Hahn-Dantona E, Quigley JP, Brauer PR. MMP-2 expression during early avian cardiac and neural crest morphogenesis. *Anat Rec*. 2000;259:168-79.
 120. Linask KK, Han M, Cai DH, Brauer PR, Maisastry SM. Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. *Dev Dyn*. 2005 Jul;233(3):739-53. doi: 10.1002/dvdy.20377. PMID: 15844197.
 121. Raza QS, Vanderploeg JL, Jacobs JR. Matrix Metalloproteinases are required for membrane motility and lumenogenesis during *Drosophila* heart development. *PLoS One*. 2017 Feb 13;12(2):e0171905. doi: 10.1371/journal.pone.0171905. PMID: 28192468; PMCID: PMC5305246.
 122. Hughes CJR, Jacobs JR. Dissecting the Role of the Extracellular Matrix in Heart Disease: Lessons from the *Drosophila* Genetic Model. *Vet Sci*. 2017 Apr 24;4(2):24. doi: 10.3390/vetsci4020024. PMID: 29056683; PMCID: PMC5606597.

123. Hughes CJR, Turner S, Andrews RM, Vitkin A, Jacobs JR. Matrix metalloproteinases regulate ECM accumulation but not larval heart growth in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Cell Cardiol*. 2020 Mar;140:42-55. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.02.008. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105665.
124. McQuinn TC, Deardorff RL, Mukherjee R, Taylor AG, Graham EM, Atz AM, et al. Circulating matrix metalloproteinase levels after ventricular septal defect repair in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Dec;140(6):1257-65. doi: 10.1016/j.jtcvs.2010.05.014. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20561637; PMCID: PMC2972374.
125. Marler JJ, Fishman SJ, Kilroy SM, Fang J, Upton J, Mulliken JB, et al. Increased expression of urinary matrix metalloproteinases parallels the extent and activity of vascular anomalies. *Pediatrics*. 2005 Jul;116(1):38-45. doi: 10.1542/peds.2004-1518. PMID: 15995028.
126. Calvert PA, Rana BS, Kydd AC, Shapiro LM. Patent foramen ovale: anatomy, outcomes, and closure. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:148.
127. Olsen IE, Lawson ML, Ferguson AN, Cantrell R, Grabich SC, Zemel BS, et al. BMI curves for preterm infants. *Pediatrics*. 2015 Mar;135(3):e572-81. doi: 10.1542/peds.2014-2777. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25687149.
128. UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods – Model Regulations – Twenty-first revised edition (see p. 84 of Volume II). Available from: <https://unece.org/rev-21-2019>.
129. Koç M, Ediger D, Budak F, Karadağ M, Oral HB, Uzaslan E, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori*. 2006 Mar-Apr;92(2):149-54. PMID: 16724695.
130. Bulog A. Određivanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika, enzima matriks metaloproteinaze-9 i imunološkog statusa kao pokazatelja razvoja bolesti okoliša: doktorski rad [Disertacija]. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2011 [pristupljeno 24.03.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:111144>.
131. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(1):e37-e46. doi: 10.1016/S2214-109X(18)3045-0.

132. Miyake T. A review of isolated muscular ventricular septal defect. *World J Pediatr.* 2020 Apr;16(2):120-128. doi: 10.1007/s12519-019-00289-5.
133. Erasun D, Alonso-Molero J, Gómez-Acebo I, Dierssen-Sotos T, Llorca J, Achneider J. Low birth weight trends in Organisation for Economic Co-operation and Development countries, 2000-2015: economic, health system and demographic conditionings. *BMC Pregnancy Childbirth* 2021;21(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03484-9>.
134. Tanner K, Sabrine N, Wren C. Cardiovascular malformations among preterm infants. *Pediatrics.* 2005 Dec;116(6):e833-8.
135. Chung SH, Kim CY, Lee BS: Congenital Anomalies in Very-Low-Birth-Weight Infants: A Nationwide Cohort Study. *Neonatology* 2020;117:584-591. doi: 10.1159/000509117.
136. Noori NM, Teimouri A. Clinical course in children and adolescents with ventricular septal defect. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2019 Sep;27(7):529-534. doi: 10.1177/0218492319867001. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31362513.
137. Li X, Ren W, Song G, Zhang X. Prediction of spontaneous closure of ventricular septal defect and guidance for clinical follow-up. *Clin Cardiol.* 2019;42:536-541. doi: 10.1002/clc.23173.
138. Farina MA, Hook EB. Apparent sex difference in spontaneous closure of ventricular septal defect. *J Pediatr.* 1978;93(6):1065-1066. doi: 10.1016/s0022-3476(78)81268-.
139. Sun J, Sun K, Chen S, Yao L, Zhang Y. A New Scoring System for Spontaneous Closure Prediction of Perimembranous Ventricular Septal Defects in Children. *PLoS ONE* 2014;9(12):e113822. doi:10.1371/journal.pone.0113822.
140. Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1395-9. PMID: 9537238.
141. Cheung YF, Chow PC, So EK, Chan KW. Circulating Transforming Growth Factor- β and Aortic Dilation in Patients with Repaired Congenital Heart Disease. *Sci Rep.* 2019 Jan 17;9(1):162. doi: 10.1038/s41598-018-36458-1. PMID: 30655554; PMCID: PMC6336785.
142. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the

- progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 1998; 82: 482-95.
143. Nagatomo Y, Carabello BA, Coker ML, McDermott PJ, Nemoto S, Hamawaki M, Spinale FG. Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jan;278(1):H151-61. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.1.H151. PMID: 10644594.)
 144. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1579-85. doi: 10.1161/01.CIR.0000058700.41738.12. PMID: 12668489.)
 145. Thrailkill KM, Kumar S, Rosenberg CK, Auten KJ, Fowlkes JL. Characterization of matrix metalloproteinases in human urine: alterations during adolescence. *Pediatr Nephrol*. 1999 Apr;13(3):223-9. doi: 10.1007/s004670050597. PMID: 10353410.
 146. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K, Kuznik-Trocha K, Klimek K, Olczyk K. Age- and gender-dependent changes in connective tissue remodeling: physiological differences in circulating MMP-3, MMP-10, TIMP-1 and TIMP-2 level. *Gerontology*. 2011;57(1):44-52. doi: 10.1159/000295775. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20215736.
 147. Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J*. 2004 Sep;25(17):1509-16. doi: 10.1016/j.ehj.2004.05.029. PMID: 15342170.
 148. Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY. MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates. *Pediatr Res*. 2004 May;55(5):794-801. doi: 10.1203/01.PDR.0000120683.68630.FB. Epub 2004 Feb 18. PMID: 14973177.
 149. Rabinovitch M, Bothwell TH, Hayakawa BN, Williams WG, Trusler GA, Rowe RD, et al. Pulmonary artery endothelial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension. A correlation of light with scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Lab Invest* 1986;55:632-53.

150. Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Nov;289(5):C1321-31. doi: 10.1152/ajpcell.00079.2005. PMID: 16210427.
151. Charolidi N, Carroll V. Hypoxia and Pulmonary Hypertension. *Hypoxia and Human Diseases*, edited by Jing Zheng, Chi Zhou, Intech Open, 2017. 10.5772/67151.
152. Frisdal E, Gest V, Vieillard-Baron A, Levame M, Lepetit H, Eddahibi S, et al. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2001 Nov;18(5):838-45. doi: 10.1183/09031936.01.00084601. PMID: 11757635.
153. Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, et al. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2005 May;25(5):834-42. doi: 10.1183/09031936.05.00072504. PMID: 15863640.
154. Nuyt AM, Alexander BT. Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009 Mar;18(2):144-52. doi: 10.1097/MNH.0b013e328326092c. PMID: 19434052; PMCID: PMC2782679.
155. Sesso R, Franco MC. Abnormalities in metalloproteinase pathways and IGF-I axis: a link between birth weight, hypertension, and vascular damage in childhood. *Am J Hypertens*. 2010 Jan;23(1):6-11. doi: 10.1038/ajh.2009.200. Epub 2009 Nov 5. PMID: 19893495.
156. Ruiz-Ojeda FJ, Méndez-Gutiérrez A, Aguilera CM, Plaza-Díaz J. Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 2;20(19):4888. doi: 10.3390/ijms20194888. PMID: 31581657; PMCID: PMC6801592.
157. Caimi G, Hopps E, Montana M, Urso C, Carollo C, Canino B, et al. The function of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor (TIMP-1) in several clinical conditions: Results and analysis of our survey. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2021;78(4):401-416. doi: 10.3233/CH-201094. PMID: 33814420.
158. Ezzati-Mobaser S, Malekpour-Dehkordi Z, Nourbakhsh M, Tavakoli-Yaraki M, Ahmadpour F, Golpour P, et al. The up-regulation of markers of adipose tissue fibrosis by visfatin in pre-adipocytes as well as obese children and adolescents. *Cytokine*. 2020 Oct;134:155193. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155193. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32707422.

159. Baggen VJ, Eindhoven JA, van den Bosch AE, Witsenburg M, Cuypers JA, Langstraat JS, et al. Matrix metalloproteinases as candidate biomarkers in adults with congenital heart disease. *Biomarkers*. 2016;21(5):466-73. doi: 10.3109/1354750X.2016.1153722. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26983903.
160. Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 12;362(1):200-205. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.003. Epub 2007 Aug 9. PMID: 17706606; PMCID: PMC2017114.
161. Friedberg MK, Cho MY, Li J, Assad RS, Sun M, Rohailla S, et al. Adverse biventricular remodeling in isolated right ventricular hypertension is mediated by increased transforming growth factor- β 1 signaling and is abrogated by angiotensin receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Dec;49(6):1019-28. doi: 10.1165/rcmb.2013-0149OC. PMID: 23841477.
162. Jones JA, McNally AK, Chang DT, Qin LA, Meyerson H, Colton E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jan;84(1):158-66. doi: 10.1002/jbm.a.31220. PMID: 17607751.
163. Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol*. 2001 Apr;69(4):613-21. PMID: 11310848.

9. PRILOZI

Spisak skraćenih naziva u tekstu

VSD	ventrikularni septalni defekt
PAH	plućna arterijska hipertenzija
MMP	matriks metaloproteinaza (engl. <i>matrix metalloproteinase</i>)
TIMP	tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza (engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
MMP-2	matriks metaloproteinaza 2
MMP-9	matriks metaloproteinaza 9
TIMP-1	tkivni inhibitor metaloproteinaze 1
TIMP-2	tkivni inhibitor metaloproteinaze 2
Ao	prečnik aortnog prstena
AV	atrioventrikularni
ECM	ekstracelularni matriks
PTM	porođajna tjelesna masa
PTD	porođajna tjelesna dužina
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i>)
ELISA	enzimsko vezani imunosorbentni esej (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
GS	gestacijska starost
SNP	jednonukleotidni polimorfizam (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)

Biografija

Nina Marić je rođena 17. 03. 1977. godine u Mrkonjić Gradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Banjoj Luci. Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci upisala je 1996. godine, a diplomirala 2003. godine sa prosječnom ocjenom 9,14. Dobitnik je „Zlatne plakete“ Univerziteta u Banjoj Luci i „Povelje“ Komore doktora medicine Republike Srpske za najbolje rezultate postignute na studiju medicine.

Zaposlena je u Klinici za dječije bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske od 2004. godine. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 2009. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, a 2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu položila je subspecijalistički ispit iz kliničke genetike i odbranila rad „Hromozomske aberacije i prenatalna dijagnostika u KC Banjaluka“.

Postdiplomski studij „Biomedicinska istraživanja“ upisala je 2009. godine na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci i tokom studija imala prosječnu ocjena 9,90. Magistarski rad „Komparativna analiza indikacija i rezultata prenatalne citogenetičke dijagnostike“, iz uže naučne oblasti Pedijatrija, odbranila je 2016. godine. Angažovana je na Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci u zvanju višeg asistenta.

Republički je koordinator za rijetke bolesti i rukovodilac Centra za rijetke bolesti Republike Srpske. Učestvovala je u izradi „Programa za rijetke bolesti“ i bila predstavnik Republike Srpske na konferenciji Komiteta za bioetiku Vijeća Evrope pod nazivom „Genetsko testiranje u zdravstvene svrhe u Centralnoj i Istočnoj Evropi“.

Autor je i koautor brojnih naučnih i stručnih radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima i učesnik velikog broja međunarodnih i domaćih naučnih i stručnih skupova. Kao koordinator učestvovala je u realizaciji projekata „Kongenitalne anomalije u Republici Srpskoj: kliničke i epidemiološke karakteristike“ i „Prevencija kongenitalnih anomalija u Republici Srpskoj i stvaranje nacionalne biobanke“.

Majka je jednog djeteta.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

"Uloga matriks metaloproteinaza 2 i 9 i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza 1 i 2 kod djece sa ventrikularnim septalnim defektom"

"Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 in children with ventricular septal defect"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, april 2022.

Potpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom "Uloga matriks metaloproteinaza 2 i 9 i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza 1 i 2 kod djece sa ventrikularnim septalnim defektom"

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, april 2022.

Potpis doktoranta



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora	Nina Marić
Naslov rada	Uloga matriks metaloproteinaza 2 i 9 i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza 1 i 2 kod djece sa ventrikularnim septalnim defektom
Mentor	Prof. dr sc. med. Ines Mrakovčić Šutić
Komentor	Prof. dr sc. med. Jelica Predojević Samardžić

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, april 2022. godine

Potpis doktoranta

