

ПОЛИМОРФИЗАМ G (-308) A TNF- α ГЕНА КАО МАРКЕР ЗА ДИАБЕТИЧНУ РЕТИНОПАТИЈУ КОД *DIABETES MELLITUS* ТИП 2

Циленшек Инес¹, Херцеговац Амела², Терзић Рифет², Вукојевић Катарина³, Сарага Бабић Мирна³, Милутиновић Живин Александра¹

¹ Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет,
Универзитет у Љубљани, Љубљана, Словенија.

² Одсек за биологију, Природно – математички факултет,
Универзитет у Тузли, Босна и Херцеговина

³ Одсек за анатомију, хистологију и ембриологију, Медицински факултет,
Универзитет у Сплиту, Хрватска

Abstract

CILENŠEK, Ines, Amela HERCEGOVAC, R. TERZIĆ, Katarina VUKOJEVIĆ, Mirna SARAGA BABIĆ, Aleksandra MILUTINOVIĆ ŽIVIN: TNF- α G (-308)A AS MARKER FOR DIABETIC RETINOPATHY IN TYPE 2 *DIABETES MELLITUS*. | ¹ Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty of Ljubljana, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. ² Department of Biology, Faculty of Science, Tuzla, Bosnia and Herzegovina. ³ Department of Anatomy, Histology and Embryology, School of Medicine, University of Split, Croatia |

In this study we evaluated the possible role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α gene G(-308)A polymorphism in the development of diabetic retinopathy (DR) in Caucasians with type 2 diabetes (DM2). 256 patients with DR (187 with proliferative DR - PDR and 69 with nonproliferative DR - NDR) and 103 patients who had DM2 for over 10 years without DR were enrolled in this cross-sectional study. Genotyping of TNF- α G(-308)A polymorphism was performed using a PCR-RFLP method. Serum and vitreous TNF- α levels were analysed. The highest serum TNF- α levels were found in 7 patients with the AA genotype. The TNF- α G(-308)A polymorphism was not associated with either PDR or NDR in a group of Caucasians with DM2.

Key words : TNF- α gene G(-308)A polymorphism, diabetic retinopathy, *diabetes mellitus*.

Сажетак

У овом раду истраживали смо могућу улогу полиморфизма G (-308)A гена за тумор некротизирајући фактор алфа (TNF- α) у развоју дијабетичне ретинопатије (DR) у бијелаца с дијабетесом типа 2 (DM2). Истраживање је обухватило 256 испитаника с DR (187 са пролиферативном DR - PDR и 69 са непролиферативном DR - NDR) и 103 испитаника који су имали дијагностициран DM2 више од 10 година али нису имали дијагностицирану DR. Генотипизација полиморфизма G (-308)A TNF- α гена извршена је помоћу PCR-RFLP методе. Анализирани су и нивои TNF- α у серуму и витреусу. Највећи ниво TNF- α у серуму утврђен је код 7 испитаника који су имали AA генотип. Резултати нашег истраживања нису показали повезаност између полиморфизама G(308)A гена за TNF - α - са PDR и NDR у скупини испитаника са DM2.

Кључне ријечи: полиморфизам G(-308)A TNF- α гена , дијабетична ретинопатија, *diabetes mellitus*.

УВОД

Дијабетична ретинопатија (DR) је мултифакторска болест коју карактеризира васкуларна пермеабилност и повећана ткивна исхемија (Petrović и сар., 2008; Liew и сар., 2009). Код дијабетичне ретинопатије као и код других ангиогенеза-припадајућих болести, повишене су рazine цитокина и упалних станица, и

ангиогенских чимбеника (Petrović и сар., 2008; Petrović и сар., 2007; Petrović, 2009). TNF- α је проупални цитокин којег производе углавном моноцити и макрофаги, активирани ендотелне станице, фибробласти, лимфоцити Т, неутрофили. Индукција TNF-алфа може се приписати различитим увјетима који дјелују током дијабетеса, као што су хипергликемија и оксидативни стрес и упалним цитокинима (Jousset и сар. 2009, Limb и сар., 1999; Adamis и сар., 2008). TNF- α игра значајну улогу у неоваскуларизацији и васкуларној реактивности. Своје бројне функције остварује између осталог кроз индукцију TNF- α -везаног цитокина синтетазе, синтези бјеланчевина изванстаничног матрикса, моноцита/фибробласти хемотаксичне стимулације и стимулације топливих адхезијских молекула у крвним жилама мрежнице (Adamis - Groszek и сар., 2008). TNF- α је плејотропни цитокин који има улогу у раним упалним промјенама виђених у мрежници дијабетичара. У мрежници дијабетичара, астроцити и Mullerove станице су потенцијални извор TNF- α . Осим тога, TNF- α се налази у изванстаничном матриксу, ендотелу, фиброваскуларном ткиву, а утврђен је и у витреусу у очима с дијабетичком ретинопатијом (Behl и сар., 2008). TNF- α ген налази се на кратком краку хромосома 6 између класе I и класе II регије HLA комплекса (Guillon и сар., 2006). Маркантна карактеристика цијелог HLA комплекса је висок ступањ генетске варијације. Бројни полиморфизми такођер су описани и у TNF-алфа локусу. TNF- α је уплетен у низ патолошких процеса (Manchanda и сар., 2006). Утврђене су генетске асоцијације тумор некротизирајућег фактора (TNF) с аутоимуним поремећајима, попут мултипле склерозе, системски lupus erythematosus и колоректалног карцинома. (Kumararamanickavel и сар., 2001). Осим у аутоимуним и заразним болестима, такођер игра значајну улогу у претилости, инсулинској резистенцији, дисфункцији ендотела и оксидативном стресу (Um и сар., 2004). Варијације у TNF алфа гену повезане су и с дијабетичком нефропатијом (Manchanda и сар., 2006), ретинопатијом (Kumararamanickavel и сар., 2001) као и кардиоваскуларним и цереброваскуларним болестима (Adamis и сар., 2008; Lindholm, 2008). У овом раду, истраживана је могућа повезаност између полиморфизма G (-308) A TNF- α гена и DR међу пацијентима с дијабетесом типа 2.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је обухватило 359 бијелаца с дијабетесом типа 2 с одређеним окулистичким статусом. Пацијенти су били класифицирани за дијабетес типа 2 у складу с актуалним стручним одбором о дијагнози и класификацији шећерне болести American Diabetes Association Criteria [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*, 1997].

Офталмолошки преглед вршен је након дилатације (tropicamide и phenylephrine 2.5%), и електронски је документован са камером (Topcon-TRC 40-IX, Токуо, Јапан). Стање дијабетичке ретинопатије је одређено према скали студија раног лијечења дијабетичке ретинопатије Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) [1991]. Истраживање је спроведено у Клиничком центру Љубљана и Медицинском факултету Универитета у Љубљани. Испитивана група састојала се од 256 болесника с дијабетичком ретинопатијом: 187 испитаника с напредним обликом пролиферативне дијабетичке ретинопатије (PDR) и 69 испитаника с не-пролиферативном дијабетичком ретинопатијом (NDR). Контролну групу чинило је 103 испитаника с дијабетесом типа 2 у трајању од више од 10 година, који нису имали клиничке знаке дијабетичне ретинопатије. Истраживање је одобрено од стране националног медицинског етичког повјеренства. Након информисања добивен је пристанак за судјеловање у истраживању, и проведен је детаљан интервју.

У серуму је анализирана разина TNF-алфа у субпопулацији од 70 DM2 болесника (52 с PDR, 8 са NDR, а 10 без DR) и 23 контролних испитаника без дијабетеса. У скубини од 70 дијабетичара било је 8 пушача и 62 непушача, а просјечна доб била је $62,5 \pm 10,9$ година. Разина TNF- α је мјерена помоћу ELISA kitova (R & D Systems, Minneapolis, MN) у складу с упутама произвођача. Анализа G (-308) A полиморфизма је извршена полимеразном ланчаном реакцијом, уз употребу прајмера: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', и 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3. Услови PCR реакције су били: 2 циклуса 94°C за 3 мин, 60°C за 1 мин, 72°C за 1 мин, 35 циклуса од 94°C 1 мин, 60°C 1 мин, 72°C 1 мин; 2 циклуса од 94°C 1 мин, 60°C 1 мин и 72°C 5 мин. PCR производи 107 bp су третирани рестрикцијским ензимом NcoI (Fermentas) при чему настају два фрагмента (87 bp и 20 bp). Производи 87 и 20 bp представљају G алел док недигестирани PCR продукт представља A алел. Продукти PCR реакције и рестрикције су анализирани електрофорезом на 2% агарозном гелу и визуализирани бојењем етидиум бромидом (Cabrera и сар., 1995). За анализу резултата примјењен је Hi – kvadrat и Student t test. Статистичка анализа проведена је помоћу SPSS програма (SPSS Inc. Illinois).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Особине испитаника и контролне скубине наведени су у Табели 1.

Табела 1. Особине болесника са дијабетичном PDR и NDR и болесника без дијабетичне ретинопатије (контролна скубина). Вриједности представљају просјек + S.D.

Особина	PDR n (%)	NDR n (%)	Контролни испитаници (дијабетичари без DR) n (%)	P
Број	187	69	103	
Година старости	$65,6 \pm 9,5$	$66,9 \pm 11,5$	$66,9 \pm 11,5$	0,3
Мушки спол (%)	91 (48,7)	30 (43,5)	38 (37,0)	0,2
Трајање болести (године)	$19,4 \pm 8,8$	$20,3 \pm 9,2$	$16,5 \pm 6,6$	0,002
Пацијенти на инсулинској терапији (%)	140 (75)	41 (59)	43 (42)	<0,001
Доб појаве дијабетеса	$44,9 \pm 11,8$	$49,2 \pm 10,2$	$53,3 \pm 12,1$	<0,001
HbA _{1c} (%)	$8,0 \pm 1,6$	$8,1 \pm 1,8$	$8,1 \pm 1,6$	0,9
Систолички крвни притисак (mm Hg)	144 ± 242	145 ± 20	145 ± 20	0,9
Дијастолички крвни притисак (mm Hg)	84 ± 10	84 ± 9	84 ± 8	0,5
ВМИ (kg/m ²)	$28,3 \pm 4,6$	$27,3 \pm 4,4$	$27,7 \pm 4,4$	0,9
Хипертензија (%)	144 (77)	45 (65)	70 (68)	0,1
Пушачи (%)	21 (11)	9 (13)	11 (11)	0,9
Укупни холестерол (mmol/l)	$5,4 \pm 1,2$	$5,0 \pm 1,2$	$5,5 \pm 1,2$	0,1
HDL холестерол (mmol/l)	$1,1 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$	0,1
LDL холестерол (mmol/l)	$3,1 \pm 1,1$	$2,9 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,9$	0,2
Триглицериди (mmol/l)	$2,3 \pm 1,4$	$2,1 \pm 1,1$	$2,5 \pm 1,9$	0,1

Испитаници су имали и друге посљедице од дијабетеса и дуље трајање дијабетеса типа 2 у односу на дијабетичаре без дијабетичне ретинопатије. Осим тога, имали су већу учесталост лијечења инсулином него контроле (дијабетес без дијабетичке ретинопатије). Није било значајне разлике у хипертензији, пушењу, укупном LDL и HDL холестеролу и триглицеридима између испитиване и контролне скубине.

Дистрибуција TNF-алфа генотипова у болесника (PDR, NDR) и контролној скубини (субјекти без DR) били су у складу с Hardy-Weinberg - овим очекивањем

(PDR: $\chi^2 = 3,3$, $p = 0,07$; NDR: $\chi^2 = 2,58$, $p = 0,1$ дијабетес без DR: $\chi^2 = 2,67$, $p = 0,1$; Табела 2).

Табела 2. Дистрибуција генотипова и алела полиморфизма TNF-alfa гена у пацијената PDR и NDR те у болесника без DR.

	PDR	NDR	DM2 без DR	P
TNF- α				
Генотип AA (%)	13 (7,0)	5 (7,2)	6 (5,8)	0,9 ¹
Генотип AG (%)	55 (29,4)	18 (26,1)	26 (25,3)	
Генотип GG (%)	119 (63,6)	46 (66,7)	71 (68,9)	
Укупно	187	69	103	
Алел G (%)	293 (78)	110 (80)	168 (82)	0,6 ²
Алел A (%)	81 (22)	28 (20)	38 (18)	

¹p-вриједност за генотипску дистрибуцију, ²p-вриједност за алелску дистрибуцију

Није било повезаности између полиморфизма ни са PDR или NDR (Табела 2). Фреквенције алела у болесника с PDR су: G 293 (78,0%) и A 81 (22,0%), с NDR: G 110 (80,0%) и A 28 (20,0%) и фреквенције алела у болесника без DR (контроле) били су: G 168 (82,0%) и A 38 (18,0%), разлика није била статистички значајна. Анализирали смо разину TNF-алфа у серуму у 70 узастопних испитаника са дијабетесом типа 2. Највише серумске TNF-алфа утврђене су у 7 болесника с генотипом AA, средње разине TNF-алфа у серуму у 16 болесника с AG, а најмања разина TNF-алфа у серуму у 47 болесника с генотипом GG, консекутивно (AA генотип: $2,39 \pm 1,68$ ng/l; генотип AG: $1,58 \pm 1,3$ ng/l; GG генотип $0,84 \pm 0,65$ ng/l, $p < 0,01$). Установили смо да нема статистички значајне разлике између 70 испитаника с дијабетесом типа 2 и дијабетичном ретинопатијом и 23 недијабетичара ($1,33 \pm 0,72$ ng/l; $1,04 \pm 1,18$ ng/l, $p = ns$). Осим тога, нисмо успјели показати статистички значајне разлике у серумским разинама TNF-алфа између 8 пушача и 62 непушача ($1,35 \pm 0,8$ ng/l ; $1,11 \pm 1,22$ ng/l, $p = ns$).

Осим тога, нисмо успјели показати статистички значајне разлике у витреусним разинама TNF-алфа у 70 дијабетичара с DR (60 с PDR, 10 с NDR) између три генотипа (8 испитаника с AA генотипом: $1,78 \pm 1,16$ ng/l, 17 испитаника с AG генотипом: $1,91 \pm 1,23$ ng/l, 45 испитаника с генотипом GG $1,51 \pm 0,95$ ng/l, $p = ns$). Утврђене су статистички значајне разлике у витреусним разинама TNF-алфа између 70 дијабетичара с DR и 15 субјеката с макуларном дегенерацијом ($1,73 \pm 1,17$ ng/l vs $1,15 \pm 0,65$ ng/l, $p < 0,01$).

У нашем истраживању анализирали смо полиморфизам гена TNF-алфа на позицији G (-308) као потенцијални генетски маркер за дијабетичну ретинопатију DR (или PDR или NDR). Није утврђена повезаност TNF- α G (-308) полиморфизма нити са пролиферативном нити са непролиферативном дијабетичном ретинопатијом у скупини бијелаца с типом 2 шећерне болести. Наши резултати су у складу са резултатима које су објавили Yoshioka и сурадници (2006) који нису успјели доказати повезаност између полиморфизма G (-308) TNF-алфа гена и DR у јапанској популацији болесника с дијабетесом типа 2. У наведеном истраживању аутори су извели испитаник – контролну студију која је обухватала 251 јапанских болесника с типом 2 шећерне болести. Фреквенција алела G (-308) у промоторском региону TNF-алфа гена била је идентична код дијабетичара без DR, NDR, или PDR скупине (Yoshioka и сар., 2006). Wang и сурадници (2008) провели су истраживање повезаности промоторских варијанти TNF-алфа гена и DR у кинеских болесника с шећерном болести типа 2. Они су навели да промоторске варијанте TNF-алфа гена вјероватно немају важну улогу у подложности дијабетичној ретинопатији кинеских пацијената с дијабетесом типа 2

(Wang и сар., 2008). У нашем истраживању, утврђено је да су серумске разине TNF-алфа под утицајем генетских фактора (TNF- α G (-308) полиморфизам). Анализирали смо разине TNF-алфа у серуму 70 дијабетичара и пронашли највише вриједности у испитаника с АА генотипом, средње серумске разине TNF-алфа у испитаника с генотипом АG, а најмање разине у испитаника с GG генотипом. Транзиција гуанин – аденин у базном пару на позицији – 308 у промоторском региону гена представља диморфизам с потенцијалном функционалном важношћу (Um и сар., 2004; Abraham и сар., 1999). Алел А је повезан с повећаном експресијом TNF-алфа гена након ин витро стимулације (Um и сар., 2004). Наведена транзиција сматра се важним појачивачем транскрипцијске активности и повишеним разинама TNF-алфа (Abraham и сар., 1999; Wilson и сар., 1997), које су како се показало укључене у повећану осјетљивости на различите болести ока, укључујући дијабетичну ретинопатију и глауком (Khan и сар., 2009).

Ова генетска варијација може резултирати измијењеном експресијом TNF-алфа гена и тиме утицати на осјетљивост и клиничку тежину упалних болести (Aguillon и сар., 2006; Um и сар., 2004). Серумске разине TNF-алфа код 70 дијабетичара с дијабетичном ретинопатијом нису биле знатно веће од оних код 10 дијабетичара с непролиферативном дијабетичном ретинопатијом. Више срединских и генетских чимбеника (нпр. доб, пушење, или исхемија) могу утицати на серумске разине TNF-алфа (Reschner и сар., 2008).

У нашем истраживању, нисмо успјели показати статистички значајне разлике у разини TNF-алфа у витреусу између 3 генотипа. Ипак постоји статистички значајна разлика, у разинама TNF-алфа у витреусу између дијабетичара с дијабетичном ретинопатијом и 15 испитаника с макуларном дегенерацијом. Jousseaume и сарадници (2009) су показали да се разина TNF- α повећава рано током DR. Истраживање које су провели Limb и сарадници (1996) показује да је TNF- α широко дистрибуиран у фиброваскуларне мембране код PDR. Demicran и сарадници (2006) су извијестили да витрусне разине TNF-алфа могу играти важну улогу у патогенези PDR. Doganay и сарадници (2002) наводе да је серумска разина TNF- α виша у болесника с PDR.. Gustavsson и сарадници (2008) утврдили су да је TNF- α неовисан серумски маркер за PDR код дијабетеса тип 1.

У овој студији смо показали да полиморфизам гена за TNF- α утиче на серумске разине TNF -алфа код пацијената с генотипом АА, с друге стране, није доказана веза између G (-308) А полиморфизма TNF -алфа гена и PDR. Претпоставка је да и други фактори могу утицати на витреусне разине TNF -алфа, будући да витрусне разине TNF -алфа нису повезане с G (-308) А полиморфизмом.

ЗАКЉУЧАК

У закључку, TNF - α је важан цитокин у прогресији DR. Полиморфизам TNF - α гена утиче на серумске разине TNF -алфа, али не и на разине TNF -алфа у витреусу код дијабетичара. Међутим, унаоч учинку полиморфизма TNF -алфа гена на серумске разине TNF -алфа није могуће потврдити генетску подложност дијабетичној ретинопатији. Наша студија показује да истраживани полиморфизам TNF - α G(-308)A не представља генетски фактор ризика за дијабетичну ретинопатију. Стога, не може се користити као генетски маркер нити за пролиферативну дијабетичну ретинопатију нити за не-пролиферативни облик DR у бијелаца с шећерном болести типа 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham, L.J., KM. Kroeger (1999): Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol*;66(4):562-6.
2. Adamis, AP., AJ. Berman (2008): Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol*;30(2):65-84.
3. Adamiec-Mroczek, J, J. Oficjalska-Młyńczak (2008): Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes--role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*;246(12):1665-70.
4. Aguillón, JC., A. Cruzat, O. Aravena, L. Salazar, C. Llanos, M. Cuchacovich (2006): Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology*;211(1-2):75-84.
5. Behl, Y., P. Krothapalli, T. Desta, A. DiPiazza, S. Roy, DT. Graves (2008): Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *Am J Pathol*;172(5):1411-8.
6. Demircan, N., Safran BG., M. Soylu, AA. Ozcan, S. Sizmaz (2006): Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*;20(12):1366-9.
7. Doganay, S., C. Evereklioglu, H. Er, Y. Türköz, A. Sevinç, N. Mehmet, H. Savli (2002): Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)*;16(2):163-70.
8. Gustavsson, C., E. Agardh, B. Bengtsson, CD. Agardh (2008): TNF-alpha is an independent serum marker for proliferative retinopathy in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*;22(5):309-16.
9. Jousen, AM., S. Doehmen, ML. Le, K. Koizumi, S. Radetzky, TU. Krohne, V. Poulaki, I. Semkova, N. Kociok (2009): TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis*;15:1418-28.
10. Khan, MI, S Micheal, N Rana, F Akhtar, AI den Hollander, A Ahmed, R Qamar (2009): Association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphism G-308A with pseudoexfoliative glaucoma in the Pakistani population. *Mol Vis*;15:2861-7.
11. Kumaramanickavel, G, S. Sripriya, RN. Vellanki, NK. Upadyay, SS. Badrinath, T. Arokiasamy, B. Sukumar, A. Vidhya, B. Joseph, T. Sharma, L. Gopal (2001): Tumor necrosis factor allelic polymorphism with diabetic retinopathy in India. *Diabetes Res Clin Pract*;54(2):89-94.
12. Lindholm, E., E. Bakhtadze, C. Cilio, E. Agardh, L. Groop, CD. Agardh (2008): Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. *PLoS One*;3(6):e2546.
13. Liew, G., R. Klein, TY. Wong (2009): The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin*; 9:35-52.
14. Limb, GA., H. Soomro, S. Janikoun, RD. Hollifield, J. Shilling (1999): Evidence for control of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) activity by TNF receptors in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Clin Exp Immunol*;115(3):409-14.

15. Limb, GA., AH. Chignell, W. Green, F. LeRoy, DC. Dumonde (1996): Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*;80(2):168-73.
16. Lee, JH., W. Lee, OH. Kwon, JH. Kim, OW. Kwon, KH. Kim, JB. Lim (2008): Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy. *Ann Clin Lab Sci*; 38: 361-7.
17. Manchanda, PK., A. Kumar, A. Kaul, RD. Mittal (2006): Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor-alpha (G/A) and end-stage renal disease: a pilot study from north India. *Clin Chim Acta*; 370(1-2):152-7.
18. Petrovic, MG., P. Korosec, M. Kosnik, J. Osredkar, M. Hawlina, B. Peterlin, D. Petrovic (2008): Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*;14:1382-7.
19. Petrovic, MG., M. Krkovic, J. Osredkar, M. Hawlina, D. Petrovic (2008): Polymorphisms in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene and proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol*;36(2):168-72.
20. Petrovic, MG., P. Korosec, M. Kosnik, M. Hawlina (2007): Vitreous levels of interleukin-8 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*;143(1):175-6.
21. Petrovic, D. (2009): Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and myocardial infarction. *Cardiology*;114(1):8-10.
22. Petrovic, D., R. Verhovc, GM. Petrovic, J. Osredkar, B. Peterlin (2007): Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphism with myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Cardiology*;107(4):291-5.
23. Reschner, H., K. Steblovnik, A. Milutinović, D. Petrovič (2008): The TNF α gene G(-308)A polymorphism as a marker for myocardial infarction in type 2 diabetes. *BJMG*;11-16.
24. Um, JY., HM. Kim (2004): Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism is associated with cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res*;122(1):99-102.
25. Yoshioka, K., T. Yoshida, Y. Takakura, T. Umekawa, A. Kogure, H. Toda, T. Yoshikawa (2006): Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin-alpha gene and -308G/A of tumor necrosis factor alpha gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*;55(10):1406-10.
26. Wang, N., K. Huang, H. Zou, Y. Shi, J. Zhu, W. Tang, X. Xu (2008): No association found between the promoter variants of TNF-alpha and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Curr Eye Res*;33(4):377-83.
27. Wilson, AG., JA. Symons, TL. McDowell, HO. McDevitt, GW. Duff. (1997): Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*;94(7):3195-9.

Примљено: 09. 12. 2010.

Одобрено: 19. 07. 2011.