

## Studio trombofilico nei pazienti dializzati

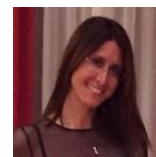
### Articoli originali

**Sandra La Rosa<sup>1</sup>, Stefania Pesce<sup>1</sup>, Chiara Guglielmo<sup>1</sup>, Pasquale Gallerano<sup>2</sup>, Luigi Rizzuto<sup>2</sup>, Antonio Granata<sup>3</sup>**

1 U.O.S.D. Nefrologia e Dialisi, P.O. "Giovanni Paolo II", Sciacca (AG) – Italy

2 U.O.C. Medicina Trasfusionale e Banca del Cordone, P.O. "Giovanni Paolo II", Sciacca (AG) – Italy

3 U.O.C. Nefrologia e Dialisi Azienda Ospedaliera Cannizzaro, Catania (CT) – Italy



Sandra La Rosa

#### Corrispondenza a:

Sandra La Rosa

Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, "Ospedale Giovanni Paolo II"

Via Pompei, Sciacca (AG), Italia

Numero di telefono/Fax 0925/962481

E-mail address: slarosa76@yahoo.it

#### ABSTRACT

La malattia renale cronica è un fenotipo complesso che risulta dall'associazione di malattie renali sottostanti e di fattori ambientali e genetici. In aggiunta ai tradizionali fattori di rischio, nell'eziologia della malattia renale sono coinvolti fattori genetici tra cui i polimorfismi dei singoli nucleotidi che potrebbero giustificare l'aumentata mortalità per patologia cardiovascolare dei nostri pazienti emodializzati. I geni che influenzano lo sviluppo e la velocità di progressione della malattia renale meritano di essere definiti meglio. Noi abbiamo valutato le alterazioni dei geni della trombofilia nei pazienti emodializzati e nei soggetti donatori di sangue e abbiamo messo a confronto i risultati ottenuti. L'obiettivo del presente studio è quello di identificare dei biomarker di morbidità e di mortalità, che ci consentano di individuare i pazienti con malattia renale cronica ad alto rischio, grazie ai quali è possibile mettere in atto delle accurate strategie terapeutiche e delle strategie preventive che abbiano l'obiettivo di intensificare i controlli in questi pazienti.

**PAROLE CHIAVE:** Polimorfismi dei singoli nucleotidi, pannel trombofilico, biomarker di mortalità, scienze omiche, malattia renale cronica, emodialisi

## Introduzione

La malattia renale cronica è definita come una progressiva ed irreversibile perdita della funzione renale, evidenziata con un GFR stimato al di sotto di 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, con la persistente presenza di manifestazioni che sono suggestive di danno renale (proteinuria, sedimento urinario attivo, danni istologici, anomalie strutturali o storia di trapianto renale) o con entrambi, presenti da più di tre mesi [1].

La malattia renale cronica è da sempre considerata un problema di salute pubblica mondiale che richiede un'importante assistenza e significativi oneri economici. È noto che ad una riduzione del GFR fa seguito un incremento degli eventi cardiovascolari, delle ospedalizzazioni e complessivamente della mortalità [2]. La prevalenza della malattia renale cronica varia a seconda delle aree geografiche e per lo più varia tra il 10% e il 20 %, percentuale che aumenta gradualmente soprattutto nei paesi sviluppati [3, 4]. Questo trend potrebbe essere attribuito all'aumentato invecchiamento della popolazione a livello globale [5], oltre che all'incremento di patologie come il diabete mellito, l'ipertensione e l'obesità [6].

Nonostante i miglioramenti tecnologici in ambito dialitico, il tasso di mortalità dei pazienti in emodialisi è molto alto, soprattutto a causa delle patologie cardiovascolari, ma non solo [7]. Recenti studi dimostrano che i fattori genetici come i polimorfismi dei singoli nucleotidi influenzano significativamente la risposta immune, i livelli dei markers infiammatori, così come la prevalenza dell'aterosclerosi in questo gruppo di pazienti [8].

## Ruolo dei polimorfismi dei singoli nucleotidi

Come accade in altre patologie multifattoriali, anche i fattori genetici sono coinvolti nella patogenesi della malattia renale. In questo contesto sono stati individuati, nei soggetti in emodialisi, diversi polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs), caratterizzati dalla variazione di una singola coppia di basi nella sequenza del DNA e alcuni studi hanno dimostrato l'influenza di questi SNPs sul rischio cardiovascolare nei pazienti in emodialisi [9].

Le scienze omiche, negli anni, stanno cominciando a dare grandi risultati. Queste sono discipline che permettono di indagare le diverse classi di componenti biologiche e comprendono la genomica, ovvero lo studio dell'intero set di geni, la trascrittomica o lo studio dei livelli di mRNA, la proteomica, ovvero lo studio della traduzione proteica e la metabolomica o lo studio dell'insieme dei metaboliti [10]. La genomica e lo studio dei polimorfismi dei singoli nucleotidi sono utili nella diagnosi di condizioni predisponenti a fatali eventi tromboembolici e nel determinismo di varianti genetiche correlate alla morte improvvisa come ad esempio la sindrome correlata all'allungamento congenito del tratto QT [11, 12]. I polimorfismi dei singoli nucleotidi possono interessare le regioni non codificanti che alterano la regione del promoter, introni o la sequenza trailer che si trova a valle della sequenza codificante, oppure possono interessare le regioni codificanti ed in questo caso alterano la sequenza degli esoni.

## Materiali e metodi

Sono stati arruolati 31 pazienti in trattamento emodialitico (di cui 21 di sesso maschile e 10 di sesso femminile) e 31 soggetti donatori di sangue (di cui 22 soggetti di sesso maschile e 9 di sesso femminile). Nei nostri pazienti dializzati abbiamo riscontrato un aumento dei valori di omocisteina nel 75 % dei casi (23 pazienti su 31); questo dato lo abbiamo messo in relazione alla tipologia di filtro utilizzato e alla metodica dialitica usata. Altresì abbiamo riscontrato un aumento dei valori medi

della mioglobina a prescindere dal filtro e dalla metodica utilizzati e valori di catene k/λ quasi sempre nel range di normalità (Tabella 1). Considerando che l'iperomocisteinemia spesso è associata a mutazioni del gene MTHFR abbiamo analizzato in questi pazienti i geni del pattern trombofilico riscontrando delle anomalie rispetto ai soggetti donatori.

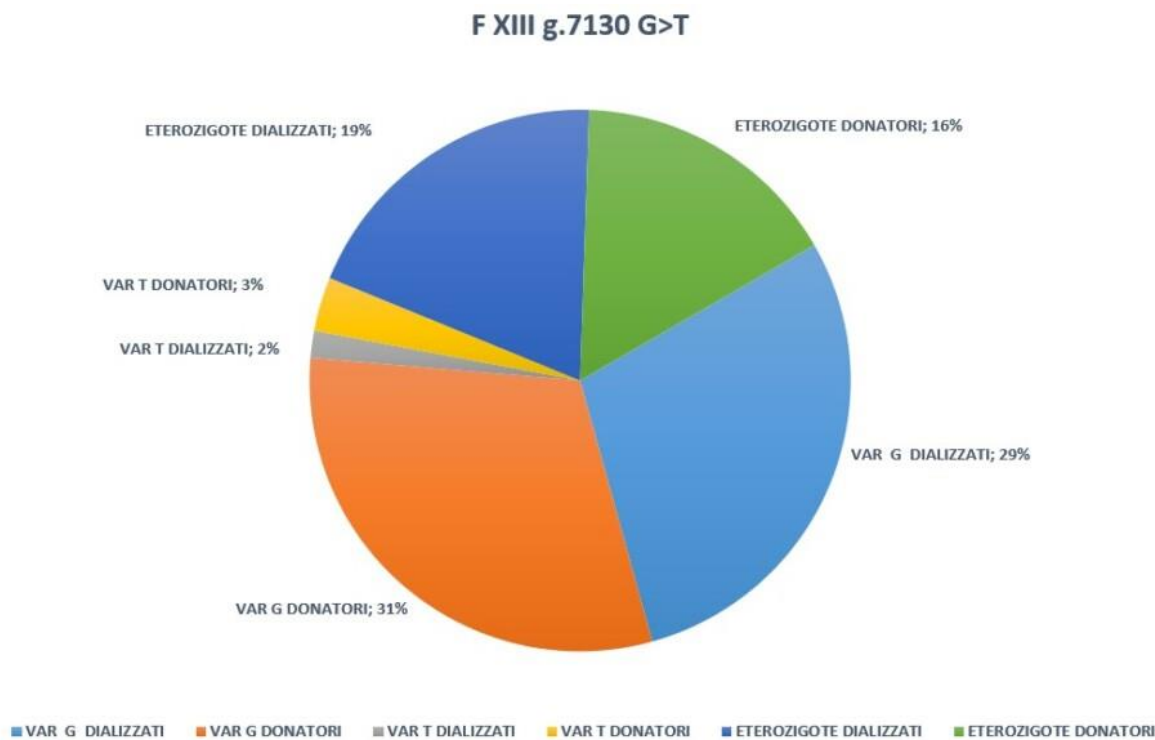
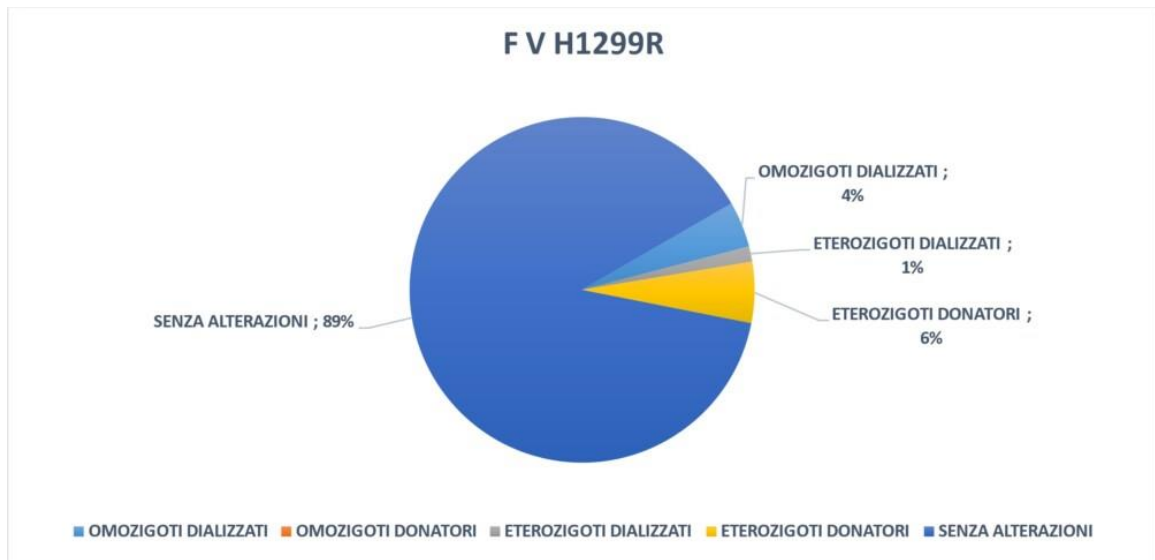
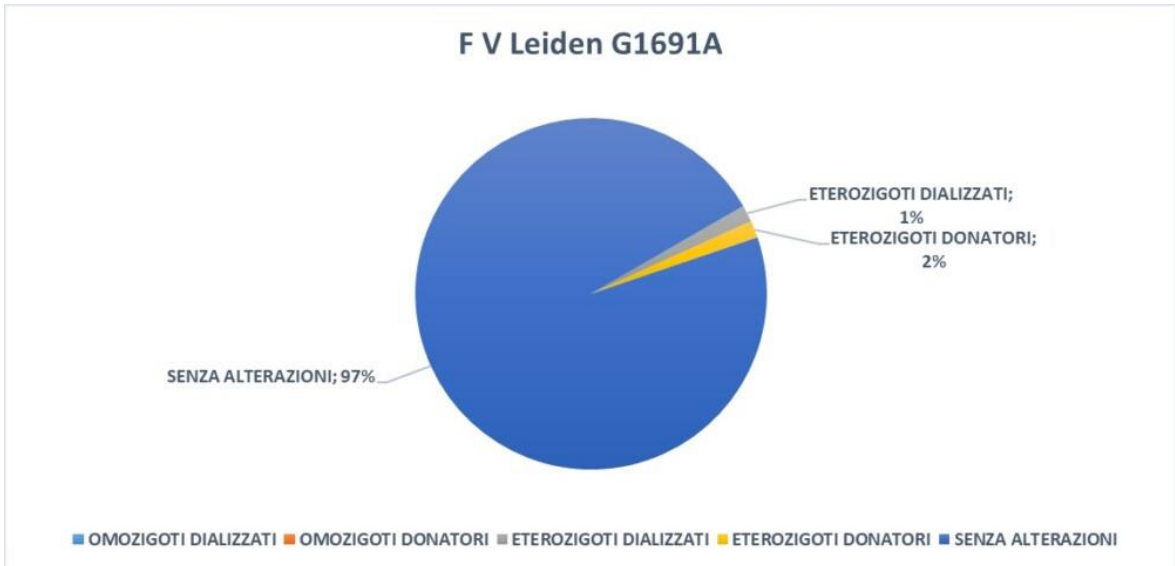
	AN 69 ST1,6/1,6 AFBK n. pz 6	Helixone Plus/1,8 HDF online n. pz 8	Poliarietersulfone 400/1,7 HD n. pz 2	Helixone plus/2,2 HDF online n. pz 3	Polynephron 19 H/1,9 HDF online n. pz 6	Polynephron 17 H/1,7 HDF online n. pz 3	Polynephron 21 H/2,1 HDF online n. 1 pz	AN 69 ST 2,2/2,2 AFBK n. 2 pz
<b>OMOCISTEINA</b> (vn 15-30) (min-max)	34,6 (9-58)	53,8 (22-96)	29,5 (22-37)	34,3 (19-53)	56 (26-100)	52 (39-76)	15	34,5 (9-60)
<b>MIOGLOBINA</b> (vn 25-72) (min-max)	149,2 (86,7-306)	216,2 (142-385)	272 (173-371)	120,3 (115-126)	280,1 (203-363)	112 (85-137)	136	220,5 (143-298)
<b>Catene kappa/lambda</b> (vn<1350/723) <b>Catene K (min- max)</b> <b>Catene λ (min- max)</b>	847,5/594 (630-1570) (363-1070)	1052/534 (545-1720) (257-785)	1181/571 (832-1530) (400-742)	828/512,3 (792-889) (443-637)	750,6/434,6 (458-1080) (251-734)	667/362,3 (375-960) (160-481)	1080/911	813,5/358,5 (743-884) (252-465)

Tabella 1: Valori medi di omocisteina, mioglobina e catene k/λ nei pazienti dializzati.

## Risultati dello studio

Abbiamo esaminato le principali mutazioni e polimorfismi interessanti i geni dei fattori della coagulazione (Fattore V, Fattore II e Fattore XIII) (Grafico 1), della metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR) (Grafico 2) e della cistationina beta-sintetasi (CBS) di cui non si è registrata nessuna mutazione, della Glicoproteina IIIa piastrinica (GP IIIa) dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) e dell'apolipoproteina E per i quali emergono dati sovrapponibili tra i due gruppi di pazienti, dell'inibitore dell'attivazione del plasminogeno (PAI-1) dell'angiotensinogeno (AGT) del recettore dell'angiotensina II (ATR-1) e del Beta Fibrinogeno (FGB) (Grafico 3), in 31 pazienti emodializzati e i risultati sono stati messi a confronto con 31 soggetti donatori.

La tecnica utilizzata è stata quella dell'amplificazione delle sequenze bersaglio, dopo l'isolamento del DNA, con successiva ibridazione inversa su striscia e rivelazione colorimetrica, ed il kit impiegato è stato il CVD 14.



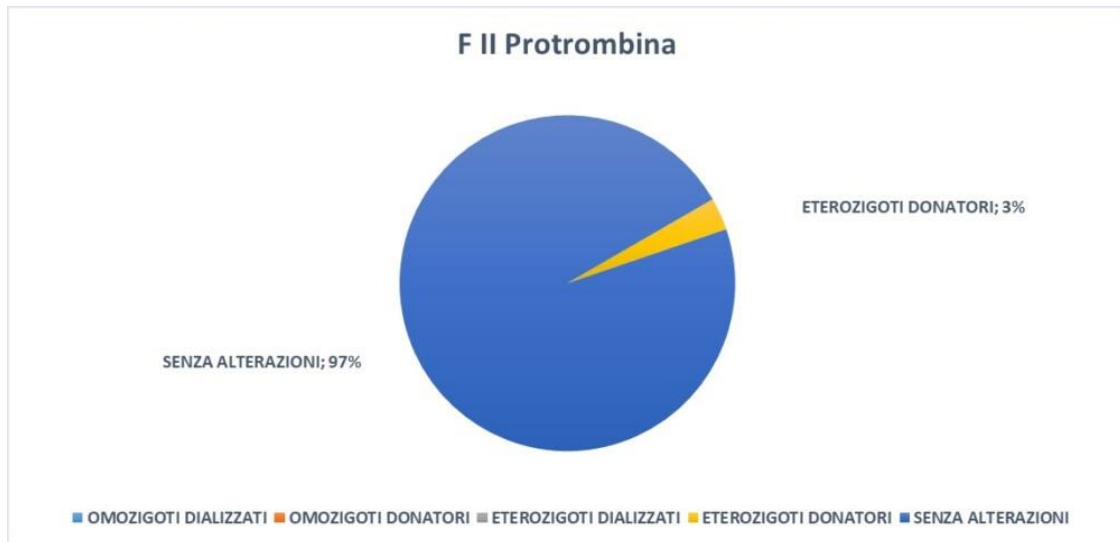


Grafico 1: Mutazioni dei fattori della coagulazione.

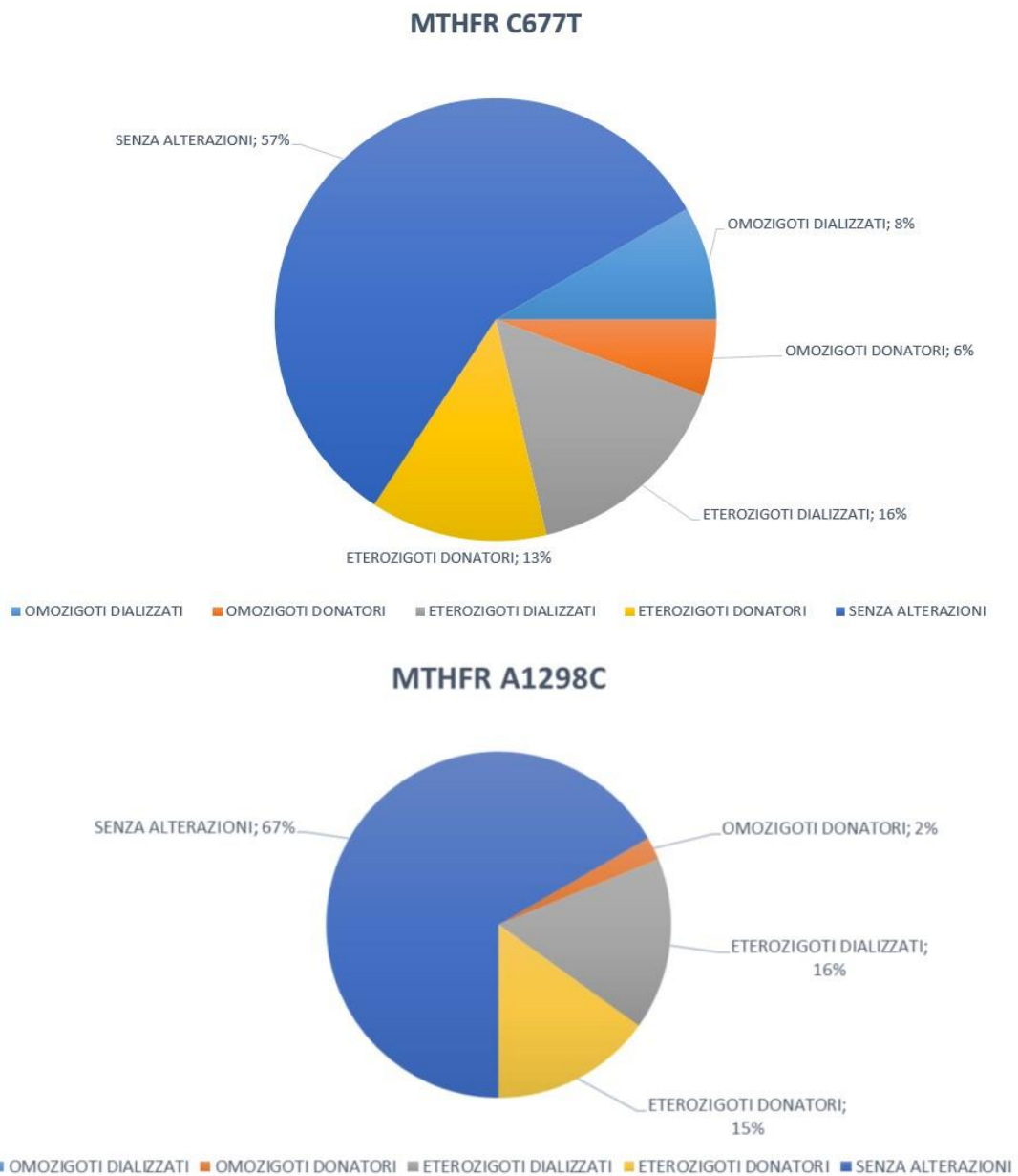
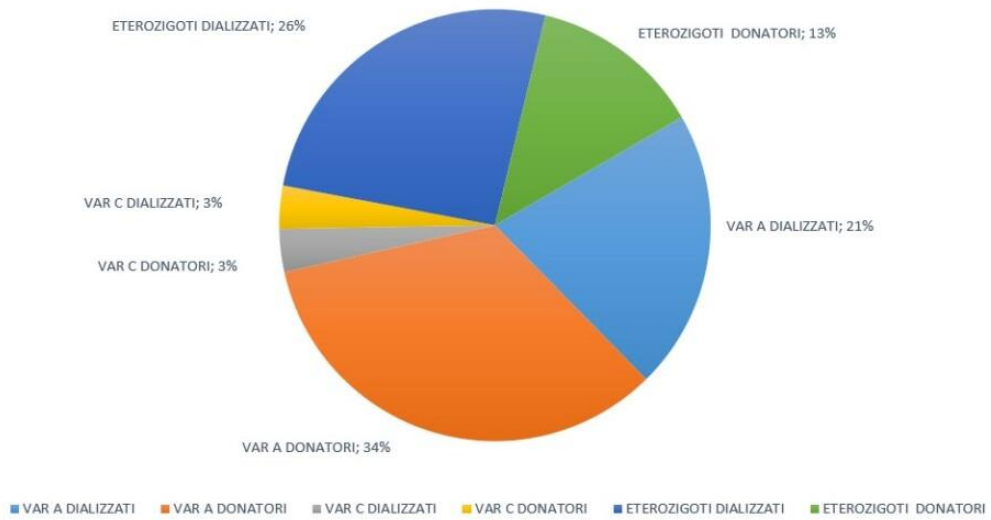
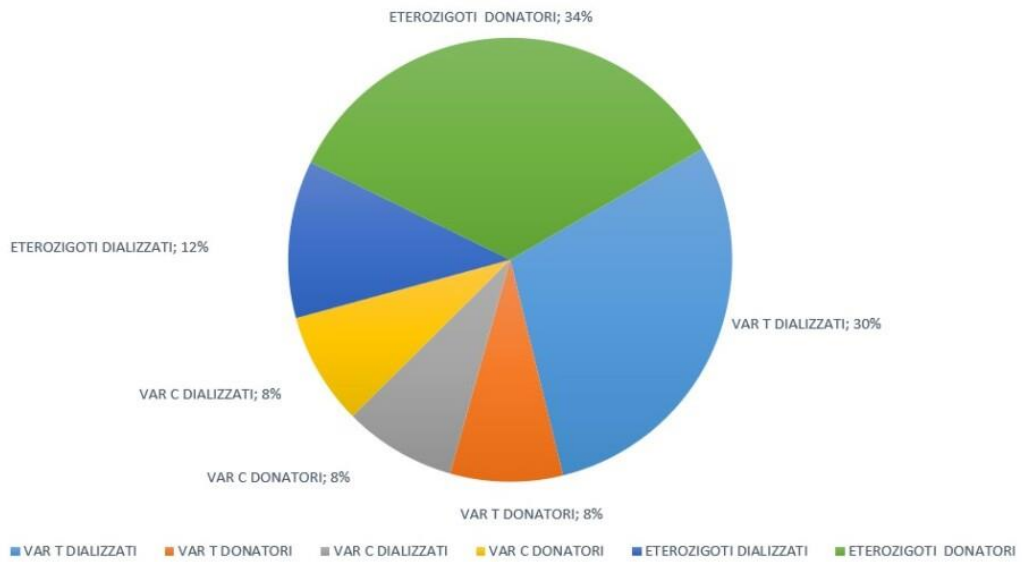


Grafico 2: Mutazioni del gene MTHFR.

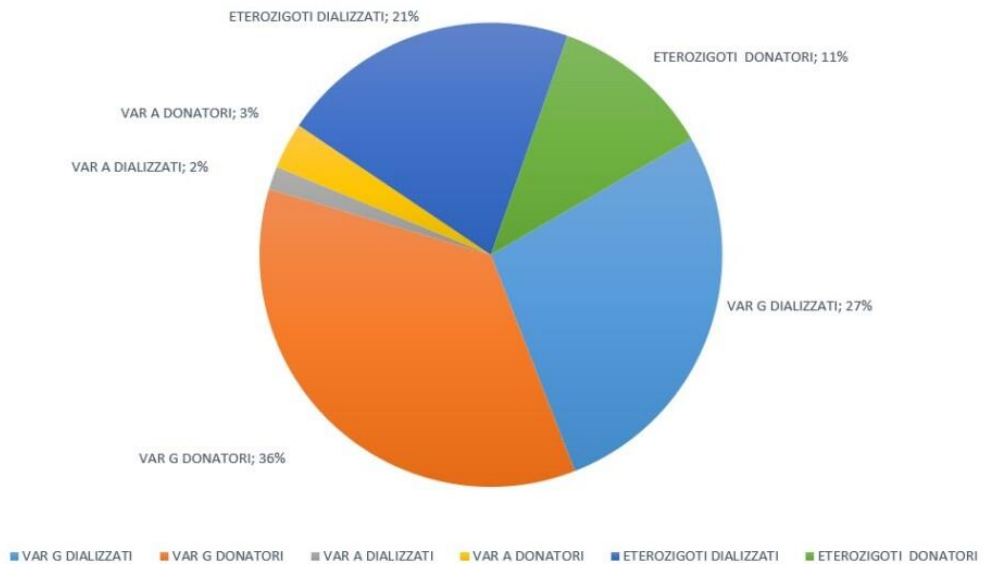
**ATR -1 A1166C**

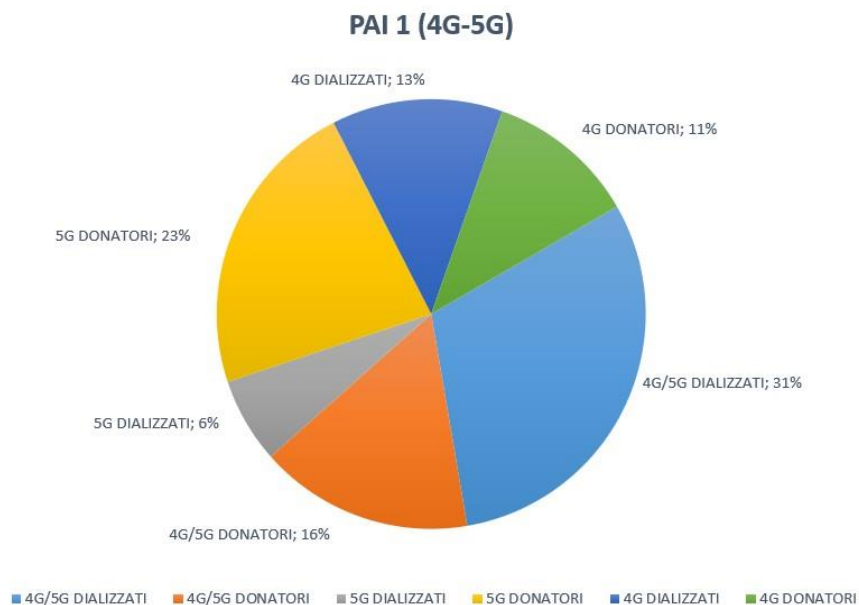


**AGT g.9543 T>C**



**FGB-455 G>A**





**Grafico 3: Mutazioni del gene ATR-1, AGT, FGB-455 e PAI 1.**

## Discussione

Analizzando i dati raccolti è emerso nei dializzati un aumento della variante T del gene AGT. Molti studi hanno dimostrato che mutazioni dei geni RAAS e i loro polimorfismi causano l'insorgenza di una maggiore suscettibilità a svariate malattie come l'ipertensione, il diabete mellito tipo 2, la malattia renale cronica allo stadio terminale [13]. Il gene AGT è considerato uno dei geni componenti di RAAS che include oltre ad AGT anche ACE, ACE2, AGTR1 (recettore tipo 1 dell'angiotensina II), AGTR2 (recettore tipo 2 dell'angiotensina II) e la renina (REN) [14]. Questo gene consiste di 4 introni e cinque esoni che sono localizzati sul braccio lungo del cromosoma 1. Come parte di RAAS codifica per 485 aminoacidi. Sono stati studiati due missense SNP del gene AGT (SNPs; l'rs699, Met268Thr ovvero M268T e l'rs4762, Thr207Met ovvero T207M) [15]. L'rs699 (M268T) precedentemente noto come M235T è un missense polimorfismo sull'esone 2 che codifica per la variante treonina (l'aminoacido metionina è sostituito dall'aminoacido treonina nella posizione 235) che è associata ad aumentati livelli di angiotensinogeno.

Recentemente è stata indagata, per dimostrarne il coinvolgimento nell'ESRD, la relazione tra il polimorfismo dei geni RAAS (determinante un'aumentata concentrazione dell'angiotensinogeno) e l'insufficienza renale cronica allo stadio terminale [16]. A causa dell'aumentata attività di RAAS, dopo l'induzione dell'angiotensina II iniziano la vasocostrizione e la sintesi dell'aldosterone che portano all'espansione del volume plasmatico e all'ipertensione. Il RAAS è sempre stato fortemente implicato nella patogenesi dell'ipertensione essenziale, delle patologie cardiovascolari e dell'insufficienza renale progressiva. RAAS gioca un ruolo centrale nella regolazione della pressione arteriosa, del metabolismo del sodio e dell'emodinamica renale, con le sue azioni mediate principalmente dall'angiotensina II [17]. L'angiotensina II può influenzare anche il metabolismo del glucosio attraverso dei meccanismi a cascata che interessano l'attivazione del segnale insulinico, l'adipogenesi, la circolazione sanguigna e lo stress ossidativo [18]. L'angiotensina II svolge un importante ruolo nei processi di rimodellamento tissutale, promuovendo la sintesi e la deposizione delle proteine della matrice extracellulare in diversi organi come il cuore, i vasi ed il rene, favorendo la fibrosi a sua volta responsabile del danno d'organo cardiovascolare e renale [19, 20].



Recenti studi hanno dimostrato la correlazione tra la presenza della variante rs699 del gene AGT con la cardiopatia ischemica [21] e l'arteriopatia periferica [22]. Alcuni studi suggeriscono che il polimorfismo M235T (genotipo TT) potrebbe essere un bio-marcatore utile per lo screening degli individui suscettibili all'infarto del miocardio, almeno per quanto riguarda la popolazione asiatica [23]. Studi effettuati su popolazione giapponese [24], cinese [25], italiana [26] e spagnola [27] rivelano una significativa associazione tra M235T e l'infarto del miocardio. Altri studi non hanno osservato tale associazione [28] e ciò potrebbe essere dovuto alle varianti geografiche e all'etnia, oppure perché i gruppi di pazienti selezionati non erano appropriati per gli studi genetici. Il polimorfismo del gene ATR1 (recettore tipo 1 dell'angiotensina II) è stato anch'esso analizzato per spiegare l'associazione con il tasso di progressione della malattia renale. Nei nostri pazienti è stato dimostrato un aumento del polimorfismo dell'ATR1 in eterozigosi A/C.

In letteratura sono presenti alcuni studi che indicano che la presenza dell'allele C polimorfico dell'ATR1 (genotipo AC/CC) potrebbe essere associata a più rapido peggioramento della funzione renale [29]. Altro polimorfismo da noi studiato è quello del gene PAI-1. PAI-1 è una serina proteasi con feedback negativo sulla fibrinolisi grazie al legame con l'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) di cui ne inibisce l'attivazione. Elevati livelli di questo inibitore sono stati associati ad un maggior rischio trombotico sia di tipo arterioso (infarto miocardico e malattia coronarica) che venoso (tromboembolismo) specie nei soggetti fumatori ed ipertesi [30]. Il polimorfismo PAI-1 4G/5G è significativamente associato ad alti livelli di omocisteina soprattutto nei giovani pazienti con trombosi del seno venoso cerebrale [31]. Nei nostri pazienti dializzati è stato riscontrato un aumento dei casi del polimorfismo del gene PAI 4G/5G. I pazienti con trombosi hanno principalmente uno squilibrio tra i sistemi di coagulazione e di fibrinolisi e questo squilibrio è spesso attribuito ad alti livelli di espressione e di attività del gene PAI-1 [32]. Il polimorfismo del gene PAI-1 4G/5G è associato ad alti livelli di PAI-1 nel plasma. Diversi studi hanno valutato la relazione tra il polimorfismo PAI-1 4G/5G ed il rischio di trombosi venosa [33]. È stato dimostrato altresì che il polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1 potrebbe essere considerato come un fattore che possa portare ad una maggiore suscettibilità al tromboembolismo venoso soprattutto nei pazienti con altri disordini genetici del pattern trombofilico [34].

Il tromboembolismo venoso è la terza maggiore causa di malattie cardiovascolari e di morte e rappresenta un problema sociale e medico rilevante per la sua alta frequenza. Il tromboembolismo venoso può essere prevenuto e trattato; per tale motivo la ricerca dei fattori di rischio è un obiettivo importante [35]. Varianti di geni che determinano un effetto pro-coagulante giocano un ruolo importante in condizioni di ipercoagulabilità. Oltre alle note varianti dei geni con attività protrombotica (fattore V di Leiden, MTHFR C677T) vi sono altre varianti che giocano un ruolo in alcune forme di trombosi venosa che includono il Fattore V H1299R, MTHFR A1298C, Fattore XIII e l'FGB 455 G>A [36].

Nei nostri pazienti dializzati è stato riscontrato anche un aumento del polimorfismo FGB-455 G/A in eterozigosi. Diversi studi hanno dimostrato che tale fattore potrebbe essere un predittore suscettibile di ictus ischemico [37]. Nei nostri pazienti emodializzati è stato riscontrato un aumento anche delle mutazioni a carico del gene MTHFR e la più comune è la mutazione C677T che potrebbe essere responsabile dell'iperomocistemia [38]. Vi è una chiara evidenza di iperomocistemia e mortalità cardiovascolare ed eventi aterotrombotici in pazienti in emodialisi [39, 40]. La malattia renale cronica rappresenta un fattore di rischio accertato per tromboembolismo (TE) arterioso e venoso. Mentre il rischio di TE risulta essere di 2,5 volte più alto nei pazienti con IRC moderata, non in dialisi, rispetto alla popolazione normale, il rischio aumenta di 5,5 volte nei pazienti con severa insufficienza renale [41]. Le complicanze trombotiche sono descritte in più del 25% dei pazienti che si sottopongono a dialisi [42] e sono a carico soprattutto dell'accesso vascolare che rappresenta



l'ancora di salvezza nei pazienti in dialisi ed il suo malfunzionamento è associato ad una incrementata morbidity, mortalità e ad elevati costi. Numerosi studi sono stati pubblicati sull'associazione tra trombofilia acquisita/congenita e complicanze dell'accesso vascolare e i risultati sono stati contrastanti, ovvero alcuni studi hanno suggerito la loro significativa associazione [43], mentre in altri questa associazione non è stata documentata [44, 45]. Nel 2005 Knoll e i suoi collaboratori hanno dimostrato in uno studio prospettico canadese che 107 dei 419 pazienti in emodialisi arruolati hanno sviluppato una trombosi dell'accesso vascolare e la percentuale di trombosi aumentava nei pazienti che avevano di base una condizione di trombofilia [46]. I dati di questo studio sono in linea con i risultati ottenuti da Klamroth in Germania e con quelli documentati su pazienti svedesi [47, 48]. Le discrepanze sono principalmente dovute alla tipologia di studi differenti (retrospettivi versus prospettici), al fatto che questi studi sono stati eseguiti su piccoli campioni di pazienti, all'assenza di gruppi di controllo e al fatto che sono stati condotti su differenti fattori di rischio trombofilici. Sono sicuramente necessari studi di coorte prospettici, multicentrici, ampi, per dimostrare il ruolo della trombofilia nella trombosi dell'accesso vascolare.

Per quanto riguarda lo stato di ipercoagulabilità presente prima del trapianto renale, questa condizione può essere considerata uno dei maggiori fattori di rischio per sviluppare eventi immediati trombotici post-trapianto. Il trapianto renale può correggere con successo uno stato di ipercoagulabilità acquisita nei pazienti in emodialisi. Screening pre-trapianto per i fattori correlati all'ipercoagulabilità sono necessari per prevenire eventi protrombotici post-trapianto e sono raccomandati nei pazienti che hanno in prospettiva la possibilità di essere sottoposti a un trapianto renale [49]. Per concludere, la trombofilia congenita non è da considerare un fattore di rischio per lo sviluppo di trombosi nei pazienti con sindrome nefrosica [50], ma anche a tal riguardo sarebbero necessari ulteriori studi.

## Conclusioni

Nonostante gli sviluppi e i miglioramenti delle tecniche dialitiche, i pazienti con malattia renale cronica allo stadio terminale continuano ad avere un aumento marcato della morbidity e mortalità cardiovascolare. Recentemente molto interesse è stato focalizzato sul ruolo dei fattori di rischio cardiovascolari non tradizionali come l'infiammazione, le calcificazioni vascolari e lo stress ossidativo. Recenti studi dimostrano che i fattori genetici, come i polimorfismi, possono influenzare significativamente la risposta immune, come anche la prevalenza dell'aterosclerosi in questi pazienti.

Sembra ipotizzabile che nel prossimo futuro test di DNA prognostici o predittivi possano fornire, alla comunità nefrologica, un più preciso approccio terapeutico e possano aiutarci nel mettere in atto delle adeguate strategie preventive. In definitiva, servono dei biomarker di morbidity e mortalità per identificare tempestivamente i pazienti ad alto rischio, perché l'aumentato rischio cardiovascolare dei nostri pazienti dializzati potrebbe essere messo in relazione, in definitiva, ad un insieme di mutazioni genetiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 2013, 3, 1-150.
2. Tonelli M, Wiebe N et al. Chronic Kidney disease and mortality risk: a systematic review. *Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2034-2047. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005101085>.
3. Hill NR, Fatoba SR et al. Global Prevalence of Chronic kidney disease- a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2016 11, e0158765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158765>.
4. Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S et al. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Rev. Nephrol.* 2020, 16, 269-288. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0248-y>.
5. Stevens LA, Viswanathan G et al. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections and clinical significance. *Chronic Kidney Disease* 2010, 17, 293-301. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2010.03.010>.
6. Duan J, Wang C et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey. *Sci Rep* 2019 Jul 18 (1):10408. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46857-7>.
7. Ishimitsu T, Tsukada K et al. Increased cardiovascular risk in long-term hemodialysis patients carrying deletion allele of ACE gene polymorphism. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 466-475. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.04.050>.
8. Nordfors L, Lindholm B et al. End-stage renal disease-not an equal opportunity disease: the role of genetic polymorphisms. *Journal of Internal Medicine* 2005; 258: 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01516.x>.
9. Balbino KP, Hermsdorff HHM et al. Polymorphism related to cardiovascular risk in hemodialysis subjects: a systematic review. *Braz. Nephrol.* 2018; 40 (2): 179-192. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-3857>.
10. Cervasato A, Raucci R et al. La proteomica e la metabolomica nello studio delle malattie genetiche del rene: dai big data alla medicina di precisione. *GIN* 2020. Anno 37 Volume 6 n°5.
11. Santurro A, Vullo AM et al. Personalized medicine applied to forensic sciences: new advances and perspectives for a tailored forensic approach. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2017, 18(3):263-273. <https://doi.org/10.2174/1389201018666170207141525>.
12. Zhao Z, Fu YX et al. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 2003; 312: 207-213. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00670-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00670-x).
13. Buraczynska M, Ksiazek P et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Dial. Transplant.* 2005, 21, 979-983. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfk012>.
14. Smyth LJ, Canadas-Garre M et al. Genetic associations between genes in the renin-angiotensin-aldosterone system and renal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2019; 9: e026777. <https://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026777>.
15. El-Garawani IM, Shaheen EM et al. Angiotensinogen Gene Missens Polymorphisms (rs699 and rs4762): the association of end-stage renal failure risk with type 2 diabetes and hypertension in Egyptians. *Genes* 2021, Feb 25; 12(3): 339. <https://doi.org/10.3390/genes12030339>.
16. Zhou T, Yin S-S et al. Association of angiotensinogen M235T gene polymorphism with end-stage renal disease risk: a meta-analysis. *Biol. Rep.* 2012, 40, 765-772. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2114-x>.
17. M Angels ORTIZ, Anna DE PRADO et al. Angiotensin-converting enzyme polymorphism gene and evolution of nephropathy to end-stage renal disease. *Nephrology Vol 8 (4), 2003, 171-176.* <https://doi.org/10.1046/j.1440-1797.2003.00165.x>.
18. Muscogiuri G, Ghavez A.O. et al. The crosstalk between insulin and renin-angiotensin-aldosterone signaling systems and its effect on glucose metabolism and diabetes prevention. *Vasc. Pharmacol.* 2008, 6, 301-312. <https://doi.org/10.2174/157016108785909715>.
19. Ruperez M, Lorenzo O et al. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 108; 1499-1505. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089129.51288.BA>.
20. Ma L, Fogo A et al. Modulation of glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2007; 29, 385-395. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0087-y>.
21. Hongyan Zhao, Ranzun Zhao et al. Gene polymorphism associated with angiotensinogen (M235T), endothelial lipase (584 C/T) and susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2020 Jul 31; 40 (7): BSR20201414. <https://doi.org/10.1042/BSR20201414>.
22. Yerik Junusbekov, Burcu Bayoglu et al. AGT rs699 and AGTR1 rs5186 gene variants are associated with cardiovascular-related phenotypes in atherosclerotic peripheral arterial obstructive disease. *Ir J Med Sci.* 2020 Aug; 189 (3): 885-894. <https://doi.org/10.1007/s11845-019-02166-6>.

23. Fariba R, Mohamed K et al. Angiotensinogen-M235T as a risk factor for myocardial infarction in asian populations: a genetic association study and a bioinformatics approach. *Croat Med J*. 2016 Aug; 57 (4): 351-362. <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.351>.
24. Kamitani A, Rakugi H et al. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis. 1995; 25: 950-3 <https://doi.org/10.1161/01.HYP.25.5.950>.
25. Chen D, Zhang M et al. A molecular variant of angiotensinogen gene is associated with myocardial infarction in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1998; 15: 133-5 Medline:9621117.
26. Olivieri O, Stranieri C et al. Homozygosity for angiotensinogen 235T variant increases the risk of myocardial infarction in patients with multi-vessel coronary artery disease. *J Hypertens*. 2001; 19: 879-84. <https://doi.org/10.1097/00004872-200105000-00007>.
27. Fernandez-Arcas N, Dieguez-Lucena JL et al. Both alleles of the M235T polymorphism of angiotensinogen gene can be a risk factor for myocardial infarction. *Clin Genet*. 2001; 60:52-7. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2001.600108.x>.
28. Tiret L, Ricard S et al. Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction: the ECTIN study. *J Hypertens*. 1995; 13: 311-7.
29. Buraczynska M, Ksiazek P et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in end-stage renal disease. *Nephron* 2002; 92:51-55. <https://doi.org/10.1159/000064455>.
30. Qiang Zhang, YunRui Jin et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism- a meta-analysis and systematic review. *Vasa* (2020), 49 (2), 141-146. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000839>.
31. Gogu AE, Motoc AG et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphisms associated with cardiovascular risk factors involved in cerebral venous sinus thrombosis. *Metabolites* 2021, 11, 266. <https://doi.org/3390/metabo11050266>.
32. Xu H, Wang L et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 promoter gene polymorphism and venous thromboembolism. *Pharm Clin Res*. 2018; 26: 261-4
33. Pradhudesai A, Shetty S et al. Investigation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism in Indian venous thrombosis patients: a case control study. *Eur J Haematol*. 2017; 99: 249-54. <https://doi.org/10.1111/ejh.12912>.
34. Wang J, Wang C et al. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Thromb Res*. 2014; 134:1241-8. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.09.035>.
35. Rosendaal F, Reitsma P et al. Genetics of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2009, 7, 301-304. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03394.x>.
36. Cerner G, Di Minno A et al. Molecular analysis of prothrombotic gene variants in venous thrombosis: a potential role of sex and thrombotic localization. *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9, 1008. <https://doi.org/10.3390/jcm9041008>.
37. Seung-Han Lee, Myeong-Kyu Kim et al. Beta-Fibrinogen gene -455 G/A polymorphism in Korean ischemic stroke patients. *J Clin Neurol*. 2008 Mar; 4 (1): 17-22.
38. Moll S, Varga EA et al. Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation* 2015; 132: e6-e9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311>.
39. Mallamaci F, Zoccali C et al. Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney International* (2002) Vol. 61, 609-614. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00144.x>.
40. Wrone EM, Zehender JL et al. An MTHFR variant, homocysteine, and cardiovascular comorbidity in renal disease. *Kidney International* (2001) Vol. 60 1106-1113. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0600031106.x>.
41. Bauer Alexander, Limperger Verena et al. End-stage renal disease and thrombophilia. *Hamostaseologie* 2016. <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-11-0063>.
42. Danis R, Ozmen S et al. Trombophilias and arteriovenous fistula dysfunction in maintenance hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 27: 307-315. <https://doi.org/10.1007/s11239-008-0216-z>.
43. Samela B, Hartman J et al. Trombophilia and arteriovenous fistula survival in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 962-8. <https://doi.org/10.2215/CJN.03860412>.
44. Palomo I, Pereira J et al. Vascular access thrombosis is not related to presence of anti-phospholipid antibodies in patients on chronic hemodialysis. *Nephron* 2002; 92: 957-958. <https://doi.org/10.1159/000065580>.
45. Meyer M, Laux G et al. No association of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T gene polymorphisms with kidney allograft survival: a multicenter study. *Transplantation* 2007; 83:1055-1058. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000259556.99281.47>.

46. Greg A. Knoll, Philip S. Wells et al. Thrombophilia and the risk for hemodialysis vascular access thrombosis. *J Am Soc Nephrol* 16: 1108-1114, 2005. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004110999>.
47. Klamroth R, Orlovic M et al. The influence of thrombophilic risk factors on vascular access survival in chronic dialysis patients in a retrospective evaluation. *VASA* 2013; 42: 32-39. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000245>.
48. Salmela B, Hartman J et al. Thrombophilia and arteriovenous fistula survival in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 962-8. <https://doi.org/10.2215/CJN.03860412>.
49. Mangalathillam R.N. Nampoory, Kshitish C. Das et al. Hypercoagulability, a serious problem in patients with ESRD on maintenance hemodialysis, and its correction after kidney transplantation. *Am J of Kidney Disease* Vol 2 N° 4 (October) 2003: pp 797-805 [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(03\)00860-6](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(03)00860-6).
50. Fabri, V.M.S. Belangero et al. Inherited risk factors for thrombophilia in children with nephrotic syndrome. *Eur J Pediatr* (1998) 157: 939-942. <https://doi.org/10.1007/s004310050972>.