Polimorfizmi u genima za čimbenike zgrušavanja i fibrinolize, glikoproteine trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike u djece s ishemijskim moždanim udarom

Čeri, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:792961

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Andrea Čeri

POLIMORFIZMI U GENIMA ZA ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE, GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE I INTERMEDIJARNE RIZIČNE ČIMBENIKE U DJECE S ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Andrea Čeri

POLIMORFIZMI U GENIMA ZA ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE, GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE I INTERMEDIJARNE RIZIČNE ČIMBENIKE U DJECE S ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Andrea Čeri

POLYMORPHISMS OF GENES FOR COAGULATION AND FIBRINOLYSIS FACTORS, PLATELET MEMBRANE GLYCOPROTEINS AND INTERMEDIATE RISK FACTORS IN CHILDREN WITH ISCHEMIC STROKE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Prof Renata Zadro, PhD

Zagreb, 2022

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija u sklopu doktorskoga studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u suradnji s Klinikom za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Klinikom za dječje bolesti Zagreb pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Zadro u sklopu projekta kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ (broj projekta HRZZ-IP-2014-09-2047, voditelj prof. dr. sc. Renata Zadro).

Zahvale

Najiskrenije zahvaljujem mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Renati Zadro na usmjeravanju mojeg znanstvenog razvoja, stručnom vodstvu, dijeljenju svojeg iskustva i znanja te nesebičnoj pomoći, podršci i povjerenju prilikom izrade ovog rada.

Hvala svim suradnicima koji su pomogli pri izradi ovog rada na prenesenom znanju i iskustvu te ugodnom društvu, razgovorima i podršci: prof. dr. sc. Vlasti Đuranović, prof. dr. sc. Nini Barišić, dr. sc. Jasni Leniček Krleža, doc. dr. sc. Désirée Coen Herak i Ani Grzunov, spec. med. biochem. na pomoći u prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka, Marijani Jurak, zdrav. tech. i Jadranki Jerković, med. lab. ing. na pomoći prilikom izdvajanja DNA i korisnim savjetima za rad u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku, dr. sc. Ivani Horvat i Margareti Radić Antolic, spec. med. biochem. na podršci, razmjeni iskustava i savjeta te velikoj pomoći u savladavanju molekularnih metoda korištenih prilikom izrade ovoga rada. Hvala izv. prof. Mariji Grdić Rajković, doc. dr. sc. Tomi Keseru, dr. sc. Domagoju Kiferu i dr. sc. Ivi Hlapčić i na velikoj pomoći prilikom statističke obrade rezultata.

Zahvaljujem svim sadašnjim i bivšim Zavodnicima, to jest, djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju s kojima sam imala prilike surađivati, a posebno onima s kojima sam dijelila asistentsku sobu tijekom godina. Vaše razumijevanje, savjeti i prijateljska podrška su neprocjenjivi. Zaista je čast biti dio takvog kolektiva.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno baki Mariji i malom dlakavcu Buddhi, na ljubavi, utjesi i razumijevanju tijekom godina uloženih u izradu ovog rada i potpori kroz cijeli moj život usprkos svim izazovima.

A sada krećemo u nove životne pobjede!

SAŽETAK

Ishemijski moždani udar (IMU) u djece je relativno rijedak poremećaj miješane etiologije koja je nerazjašnjena u približno 30 % slučajeva. Protrombotički poremećaji prepoznati su kao rizični čimbenik za nastanak IMU-a u djece, ali su potencijalne pozadinske genske varijacije analizirane u oskudnom broju studija u specifičnim populacijama ili u odraslih, dok u djece rijetko ili uopće nisu analizirane. Kako se povezanost protrombotičkih polimorfizama s IMU-om može razlikovati ovisno o geografskoj i etničkoj pripadnosti ispitivane populacije, a poznato je dodatno povećanje rizika u prisutnosti više od jednoga protrombotičkog rizičnog čimbenika, cilj ovoga istraživanja jest ispitati povezanost pojedinačnih polimorfizama u genima za čimbenike zgrušavanja, glikoproteinima trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike te potencijal zajedničke povezanosti s pojavom IMU-a u djece u Hrvatskoj ovisno o tipu, dobi nastanka i lokalizaciji IMU-a. Genotipizacija 21 polimorfizma u 13 gena kandidata provedena je iz uzorka DNA leukocita dobivenih nakon prikupljanja uzoraka ostatne periferne krvi od 185 djece starosne dobi do 18 godina s potvrđenom dijagnozom arterijskog IMU-a ili tromboze venskih sinusa mozga (CSVT) i 185 zdrave djece podudarne po dobi i spolu djeci s IMU-om. Dobiveni rezultati potvrdili su veću zastupljenost dječaka u svim podtipovima bolesti, osim perinatalnog arterijskog IMU-a i CSVT-a te različite genetičke čimbenike za karakterizaciju različitih podtipova IMU-a u djece. Na temelju dobivenih rezultata predložen je i algoritam ispitanih genetičkih čimbenika za IMU u djece za razlikovanje rizika nastanka podtipova bolesti te je uspostavljena baza podataka djece s IMU-om u Hrvatskoj. Rezultati predloženog istraživanja proširili su dosadašnja saznanja o potencijalnoj ulozi ispitanih genskih varijacija u etiologiji IMU-a u djece u Hrvatskoj, ali i u općoj populaciji.

Ključne riječi: djeca, ishemijski moždani udar, tromboza venskih sinusa mozga, trombofilija, genske varijacije, polimorfizmi, čimbenici zgrušavanja, čimbenici fibrinolize, glikoproteini trombocitne membrane, intermedijarni rizični čimbenici

ABSTRACT

Introduction: Ischemic paediatric stroke (IPS) is a relatively rare disorder of mixed aetiology. To date, a large number of hereditary and acquired risk factors for the occurrence of IPS have been determined, but the aetiology in approximately 30% of cases is still not clarified. Prothrombotic disorders, which can arise due to changes in genes that code for proteins involved in clotting and fibrinolysis processes, are recognized as a risk factor for IPS. So far, the studies have mainly covered the examination of the association of certain thrombophilic genetic changes with the occurrence of IPS and mainly include the prothrombotic polymorphisms *F5* 1601 G/A and *F2* 20210 G/A. Other potential prothrombotic gene variations have been analysed in a limited number of studies in geographically specific populations or in adults, while they have not been analysed in children at all. In addition, an increase in the risk of thrombotic events is known for the presence of more than one prothrombotic risk factor, but the combined influence of prothrombotic polymorphisms within the same gene or within multiple genes located on the same chromosome on the occurrence of IPS has not been investigated so far. Furthermore, previous research included mostly cases of IPS in childhood (CAIS) whereas there are only scarce data for cases of perinatal IPS (PAIS). Also, association of prothrombotic polymorphisms with IPS may differ depending on the geographic and ethnic origin of the population studied. In Croatia, the association of a limited number of prothrombotic polymorphisms has been examined in a small number of children with the diagnosis of arterial IPS (AIS), while children with the diagnosis of cerebral sinovenous thrombosis (CSVT) have not been included in the studies. Also, there are no reported studies including association of possible risk factors with anatomical or pathoanatomical localisation of stroke in children.

Aim: To confirm the hypothesis that different subtypes of IPS are characterized by different genetic risk factors, the aim of this study is to gather new information about the individual and possible joint role of 21 genetic variations in 13 candidate genes coding clotting factors, platelet membrane glycoproteins and intermediate risk factors in the occurrence of IPS in Croatia depending on age, type of IPS and localization of IPS.

Materials and methods: A total of 185 children under the age of 18 with a confirmed diagnosis of AIS or CSVT, admitted to the University Hospital Centre Zagreb, Department of Neourology of the Paediatric Clinic and the Children's Hospital Zagreb, Neuropediatric Department, as well as 185 healthy age- and sex- matched controls were included in this study. Subjects were categorised to subtypes based on gathered information from their

medical records and findings of at least one imaging technique of morphological representations of the brain: computerised tomography, magnetic resonance imaging (MRI) and MRI angiography, according to type of IPS to AIS and CSVT, according to age of IPS onset to PAIS and CAIS and according to lesion localisation to cortical IPS (KIPS) and subcortical IPS (SIPS). Peripheral whole blood samples taken with the anticoagulant K_3EDTA or sodium citrate (0.105 M) remaining after regular laboratory processing of all involved subjects was used to extract genomic DNA and perform molecular genetic analyses. The volume of sampled blood varied from 0.25 mL to a maximum of 8 mL. Depending on the available residual blood volume, DNA was extracted from leukocytes by manual salting-out method or automated DNA extraction was performed from 200 µL of whole blood using the automated nucleic acid isolation device MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) and the associated MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) according to manufacturer's recommendation. The concentration and purity of the isolated DNA were determined with the microvolume spectrophotometer NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Isolated DNA samples were stored at +4 ºC until further genetic analyses. Detection of *F5* 1601 G/A, F5 HR2, F2 20210 G/A, F13A1 Val34Leu and PAI-1 4G/5G was performed using a commercially available CVD StripAssay ® T kit (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria), and detection of *FGB* -455 G/A, HPA-1, *ACE* I/D and APOE ε2-4 was performed using CVD StripAssay ® A kit (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) according to manufacturer's instruction on GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The kits are based on polymerase chain reaction (PCR) with multiple amplification by using biotin-labeled primers, followed by hybridization of the amplified fragments on a hybridization test strip with immobilized allele-specific oligonucleotides, and their visualization using a chromogenic reaction involving streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and a chromogenic substrate. HPA-2, HPA-3, and HPA-5 were genotyped using real-time PCR (Q-PCR) with allele-specific fluorescently labelled hydrolysis probes that enable allelic discrimination based on TaqMan™ technology and TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). DNA from B-lymphoblastoid cell lines were used as positive controls for each genotype. Genotyping of *ITGA2* 807 C/T, 873 G/A, and *GP1BA* (-5) T/C was performed by the Q-PCR method with specific primers, followed by melting curve (MC) analysis based on previously published procedures using LightCycler® 480 Genotyping Master PCR mix (Roche

Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland). Three samples of different genotypes whose exact genotype was confirmed by Sanger sequencing, were used to confirm the method for a particular polymorphism. Heterozygous sample was used as a positive control in each series when analysing samples of unknown genotypes. Genotyping of *SELP* Ser290Asn, Val599Leu and Thr715Pro and *GP6* 13254 T/C was carried out by the Q-PCR method with specific primers using LightCycler® 480 HRM Master PCR mix (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland), followed by high resolution melting (HRM) analysis on LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland). Validation of this method was also performed in this study. Genotyping of *SELP* Asn562Asp polymorphism was performed by the previously described method of allele-specific PCR with sequence specific primers on GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), followed by analysis of the amplified products by electrophoretic separation in a 2% agarose gel. Control samples of known genotypes, obtained from the author of the method, were used as a positive genotyping control. Genotyping of *GP1BA* VNTR was performed using the previously described PCR method with specific primers on GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), followed by analysis of the amplified products by electrophoretic separation in a 2% agarose gel. Due to the unavailability of control samples, to confirm the method, five samples of different genotypes (BB, CC, BC, BD and CD) were sequenced as a quality control step. Association of individual and selected possible joint polymorphisms with IPS depending on the type of IPS, age of onset and lesion localization in relation to the control group was examined using obtained genotyping data through thorough statistical analysis that included Hardy Weinberg testing, logistic regression analysis, linkage disequilibrium testing and haplotype analysis in statistical programs MedCalc, version 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) and SNPStats (Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain) with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing.

Results: This research determined the equal prevalence of PAIS and CAIS and a five times greater frequency of AIS compared to CSVT in children in Croatia. A higher incidence of the stroke was found in boys in the total group of children with IPS and in all examined subgroups of IPS according to type, age and localization of IPS, except in the group of children with PAIS and CSVT where no significant difference in gender representation was observed. The highest ratio of boys compared to girls was observed in children with SIPS. The results of statistical analysis of the obtained genotyping data for individual polymorphisms in children with IMU showed two times increased risk of developing IPS in

children with *ACE* ID or DD genotype according to the dominant model compared to II genotype carriers, but also possible additional almost three times increased risk for the occurrence of IPS in carriers the *F5* 1601 GA genotype obtained by the multivariate model. Statistical analysis performed according to the type of IPS showed three times increased risk of AIS in children carrying the *F5* 1601A allele and two times increased risk in children carrying genotypes *ACE* ID or DD according to the dominant model compared to carriers of genotype II, but also protective effect of HPA-3 ab and bb genotypes according to the dominant model compared to aa genotype. Multivariate model revealed possible additional four times increased risk for the occurrence of AIS in children carrying the *F5* 1601 GA genotype. HPA-1 bb genotype according to the predominant model compared to the homozygous genotypes aa or bb, increased the risk of developing CSVT in children 2.5 times, whereas for the dominant model and allele statistical results was close to reaching significance. Statistical analysis performed according to the age of IPS onset showed a four times increased risk of developing PAIS in the carriers of the F5 1601A allele and moderately reduced risk for the occurrence of PAIS according to the overdominant model in carriers of the HPA-3 ab genotype compared to carriers of homozygous genotypes, but also possible additional six times increased risk for the occurrence of PAIS in children carrying the *F5* 1601 GA genotype obtained by the multivariate model. Increased risk of developing CAIS was found in carriers of *ACE* ID or DD genotypes compared to carriers of genotype II where according to the dominant model it increases the risk 2.5-fold, and also for carriers of the *GP1BA* VNTR B allele where it increases the risk 1.87 times. Also moderately reduced risk for CAIS was found in HPA-3b or HPA-5b allele carriers compared to reference allele carriers. Multivariate model revealed possible additional 2.43-fold increased risk in carriers of the *GP1BA* VNTR genotype containing at least one B allele and a moderate protective effect of the HPA-5 ab and bb genotypes for the occurrence of CAIS. Statistical analysis performed according to the IPS localization showed four and five times increased risk of developing KIPS in children carrying *F5* 1601 GA genotype and *F5* 1601A allele compared to carriers of GG genotype and G allele which was additionally confirmed by the multivariate model. In children carrying the HPA-2 bb genotype according to the recessive model compared to the aa or bb genotypes, or the *GP1BA* VNTR BB genotype according to the codominant model compared to the referent CC genotype, 13 times increased risk for the occurrence of SIPS was found. Furthermore, reduced risk of SIPS carrying the *FGB* -455 AA genotype according to the recessive model was found compared to the GG and GA genotype carriers, with very wide confidence intervals because the *FGB* -455 AA genotype was recorded only in the control

group, but not in children with SIPS. Multivariate model was proven to be unreliable in subtype of SIPS since conflicting results were obtained, as a possible additional protective effect of the *ITGA2* 807 TT genotype, but now also unexpectedly of the HPA-2 bb genotype, according to the recessive model in comparison to the CC and CT genotypes, i.e. aa and ab, was determined, while for genotype 873 AA according to the recessive model in relation to genotypes GG and GA was determined a rather increased risk of SIPS in children, with a note that in this case certain gene variants included in the multivariate analysis are relatively rare (genotypes *GP1BA* HPA-2 bb, *ITGA2* 807 TT and 873 AA) which can significantly affect the reliability of statistical analysis results. The existence of three groups of haplotypes located on the 1st, 5th and 17th chromosomes was established in the examined population. The results of the statistical analysis of haplotypes with IPS showed 20 times increased risk for CSVT in children carrying the rare haplotype *F5* 1601 G/HR2 A/ *SELP* 290Ser/562Asp/599Leu/715Thr, while its presence was not recorded in the group of children with AIS, with cautious interpretation of the results due to the small number of included subjects and low frequency of the specified haplotype. Also, moderate protective effect of haplotype *ITGA2* 807C/873G/HPA-5b on occurrence of CAIS was demonstrated. Rare *ITGA2* haplotypes C/A/a, T/G/a and T/A/b were present only in a few cases of CAIS and CSVT, but not in the group of children with KIPS or PAIMU nor in the control group.

Conclusions: The results of this case-control study confirmed specific genetic factors for the characterization of different subtypes of IPS. Based on the obtained results, an algorithm of tested genetic risk factors for IPS was proposed to distinguish the susceptibility to stroke subtypes, which, together with the established database of IPS in Croatia, can represent the basis for directing further research of this disease. The eventual inclusion in the international databases on IPS will provide a clearer insight into the peculiarities of the aetiology of IPS in Croatia and will contribute to the understanding of the aetiology of this disease at the local and global level. Based on the above and taking into account the possibility of transferring knowledge about IPS to the occurrence of ischemic stroke in adults, the results of this study represent a significant scientific contribution to the research of the potential role of genetic variations in the aetiology of IPS in Croatia, but also ischemic stroke in the general population.

Keywords: children, paediatric ischemic stroke, cerebral sinovenous thrombosis, thrombophilia, genetic polymorphisms, coagulation factors, fibrinolysis factors, platelet membrane glycoproteins, intermediate risk factors

POPIS KRATICA

ACE	angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*)
AIC	parametar za procjenu prediktivne mogućnosti pogreške i kvalitete modela (engl. *Akaike information criterion*)
AIMU	arterijski ishemijski moždani udar
AK	aminokiselina
APC	aktivirani protein C
apoE	apolipoprotein E
CI	interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
ClinVar	baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa
CSVT	tromboza venskih sinusa mozga (engl. *cerebral sinovenous thrombosis*)
CT	kompjutorizirana tomografija
DAIMU	arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi
dbSNP	baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ddNTP	dideoksinukleozid-trifosfati
dNTP	deoksinukleozid-trifosfati
F	nizvodna početnica (engl. *forward*)
FV	čimbenik zgrušavanja V
FVa	aktivirani čimbenik zgrušavanja V
FVII	čimbenik zgrušavanja VII
FVIII	čimbenik zgrušavanja VIII
FVIIIa	aktivirani čimbenik zgrušavanja VIII
FII	čimbenik zgrušavanja II, protrombin
FXa	aktivirani čimbenik zgrušavanja X
FXI	čimbenik zgrušavanja XI
FXIII	čimbenik zgrušavanja XIII
FXIIIa	aktivirani čimbenik zgrušavanja XIII
FAM	6-karboksifluorescein
Fl	fluorescein
GP	glikoprotein
HDL	lipoprotein velike gustoće (engl. *high density lipoprotein*)

HGVS	Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*)
HPA	ljudski trombocitni aloantigeni (engl. *human platelet alloantigens*)
HRM	krivulja taljenja visoke razlučivosti (engl. *high resolution melting*)
I/D	insercijsko-delecijski polimorfizam
IDL	lipoprotein srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoprotein*)
IMU	ishemijski moždani udar
IPSS	Međunarodna studija o moždanom udaru u djece (engl. *International Pediatric Stroke Study*)
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
KIMU	kortikalni ishemijski moždani udar
LDL	lipoprotein male gustoće (engl. *low density lipoprotein*)
LCRed640	LightCycler® Red 640
M-PCR	PCR s višestrukim umnažanjem (engl. *multiplex PCR*)
MC	krivulja taljenja (engl. *melting curve*)
MELAS	mitohondrijska encefalopatija s laktatnom acidozom i epizodama koje nalikuju moždanom udaru
MGB	molekula koja se veže za mali utor (engl. *minor groove binder*)
Mr	relativna molekularna masa
MRI	magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance imaging*)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
NCBI	Nacionalni centar za biotehnološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*)
OR	omjer rizika (engl. *odds ratio*)
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*)
PAIMU	perinatalni arterijski ishemijski moždani udar
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
Ph	fosfat
bp	bazni par
R	uzvodna početnica (engl. *reverse*)
Rn	normalizirani izvjestiteljski signal
ROX	karboksi-x-rodamin
SDS	natrijev dodecil-sulfat

SIMU	subkortikalni ishemijski moždani udar
SNP	polimorfizam jednoga nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
SSP	početnice specifičnoga slijeda (engl. *sequence specific primer*)
SŽS	središnji živčani sustav
pufer TBE	pufer tris-(hidroksimetil)-aminometana, borne kiseline i etilendiamintetraoctene kiseline
pufer TE	pufer Trisa i Na_2EDTA
Tm	temperatura taljenja (engl. *melting temperature*)
tPA	tkivni aktivator plazminogena
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
uPA	urokinazni aktivator plazminogena
UTR	nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*)
VIC	2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescein
VLDL	lipoprotein vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoprotein*)
VNTR	varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*)
VWF	von Willebrandov čimbenik
χ^2	hi-kvadrat

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Ishemijski moždani udar u djece 1

1.1.1. Definicija, podjele, osnovni simptomi i dijagnostički kriteriji IMU-a u djece 1

1.1.2. Epidemiologija 3

1.1.2.1. Prevalencija i incidencija 3

1.1.2.2. Dob 4

1.1.2.3. Spol 5

1.1.2.4. Geografska i etnička pripadnost 6

1.1.3. Lokalizacija IMU-a u djece 6

1.1.4. Etiologija i patogeneza IMU-a u djece 8

1.1.4.1. Posebnosti perinatalnoga IMU-a u odnosu na IMU u dječjoj dobi 10

1.1.4.2. Posebnosti CSVT-a u djece 12

1.1.4.3. Trombofilija kao čimbenik rizika za nastanak IMU-a u djece 12

1.2. Promjene u genima za čimbenike zgrušavanja i fibrinolize 15

1.2.1. Čimbenik zgrušavanja V 15

1.2.2. Protrombin 18

1.2.3. Fibrinogen 20

1.2.4. Čimbenik zgrušavanja XIII 21

1.2.5. Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) 24

1.3. Promjene u genima za glikoproteine trombocitne membrane 26

1.3.1. Kompleks GPIa/IIa 27

1.3.2. Kompleks GPIb/IX/V 29

1.3.3. Kompleks GPIIb/IIIa 31

1.3.4. GPVI 34

1.3.5. P-selektin 36

1.4. Polimorfizmi gena koji kontroliraju intermedijarne rizične čimbenike 38

1.4.1. Angiotenzin-konvertirajući enzim 38
1.4.2. Apolipoprotein E 39
2. OBRAZLOŽENJE TEME 42
3. MATERIJALI I METODE 45
3.1. Ispitanici 45
3.2. Molekularno-genetičke metode 48
3.2.1. Izdvajanje genomske DNA 48
3.2.1.1. Metoda isoljavanja 48
3.2.1.2. Automatizirano izdvajanje DNA 51
3.2.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA 51
3.2.3. Dokazivanje skupine polimorfizama pomoću kompleta CVD StripAssay ® T i A 52
3.2.3.1. M-PCR 53
3.2.3.2. Elektroforeza DNA na 2 % agaroznom gelu 55
3.2.3.3. Hibridizacija, razvijanje boje i očitavanje rezultata 57
3.2.4. Dokazivanje polimorfizama HPA-2, HPA-3 i HPA-5 60
3.2.5. Dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C 65
3.2.5.1. Genotipizacija metodom Q-PCR-MC 66
3.2.5.2. Kontrolna elektroforeza umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC 69
3.2.5.3. Sangerovo sekvenciranje umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC 70
3.2.6. Dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C 74
3.2.6.1. Dizajn početnica za Q-PCR-HRM 78
3.2.6.2. Genotipizacija metodom Q-PCR-HRM 79
3.2.6.3. Kontrolna elektroforeza umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM 81
3.2.6.4. Sangerovo sekvenciranje umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM 82
3.2.6.5. Validacija metode Q-PCR-HRM 83
3.2.7. Dokazivanje polimofrizma *SELP* Asn562Asp 87

3.2.8. Dokazivanje polimorfizma *GP1BA* VNTR 91
3.3. Statistička obrada prikupljenih podataka 95
4. REZULTATI 98
4.1. Karakteristike skupina ispitanika te raspodjela IMU-a i podtipova bolesti s obzirom na spol i dob 98
4.2. Povezanost pojedinačnih ispitivanih polimorfizama s IMU-om u djece i s podtipovima bolesti 99
4.2.1. Ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini 99
4.2.2. Pojedinačni polimorfizmi i IMU u djece 101
4.2.3. Pojedinačni polimorfizmi i AIMU u djece 105
4.2.4. Pojedinačni polimorfizmi i PAIMU 109
4.2.5. Pojedinačni polimorfizmi i DAIMU 113
4.2.6. Pojedinačni polimorfizmi i CSVT u djece 118
4.2.7. Pojedinačni polimorfizmi i KIMU u djece 121
4.2.8. Pojedinačni polimorfizmi i SIMU u djece 125
4.3. Povezanost odabranih haplotipova s IMU-omt u djece i podtipovima bolesti 130
4.3.1. Ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama 130
4.3.2. Haplotip *F5/SELP* na 1. kromosomu i IMU udjece 132
4.3.3. Haplotip *ITGA2* na 5. kromosomu i IMU u djece 135
4.3.4. Haplotip *GP1BA* na 17. kromosomu i IMU u djece 137
5. RASPRAVA 139
6. ZAKLJUČCI 157
7. LITERATURA 160
8. PRILOZI 183
9. ŽIVOTOPIS 202

1. UVOD

1.1. Ishemijski moždani udar u djece

Ishemijski moždani udar (IMU) je poremećaj koji se prvenstveno veže uz stariju dob, ali se relativno rijetko može pojaviti i u dječjoj populaciji gdje predstavlja značajan uzrok invaliditeta, morbiditeta i mortaliteta (1). Neurološke promjene u djece mogu se pojaviti kao posljedica višestrukih poremećaja i uzrokovati različite kliničke simptome i znakove pa je IMU u djece često neprepoznat, dijagnosticira se pogrešno ili sa zakašnjenjem (2–4). Etiologija IMU-a u djece razlikuje se od etiologije IMU-a u odraslih, prije svega jer u djece obično nisu prisutni tradicionalni vaskularni čimbenici rizika za nastanak IMU-a, a djeca s dijagnozom moždanoga udara imaju povećan rizik za ponovljeni moždani udar kasnije tijekom života, posebice nakon IMU-a u dječjoj dobi (5–7). Međutim, zbog nedostatka sveobuhvatnih istraživanja IMU-a u djece, današnji dijagnostički i terapijski postupci za djecu uglavnom se temelje na podacima i iskustvu s IMU-om u odrasloj populaciji (8). Broj objavljenih radova vezanih uz IMU u djece se tijekom posljednjih godina značajno povećao, ali zbog velikih razlika u dizajnu studija, što prije svega uključuje razlike u dijagnostičkim kriterijima, razlike u obuhvaćenim dobnim skupinama i vrstama moždanoga udara, te geografske i etničke razlike, kao i druge uključene parametre, njihov je doprinos u razumijevanju ovog poremećaja i dalje ograničen.

1.1.1. Definicija, podjele, osnovni simptomi i dijagnostički kriteriji IMU-a u djece

Svjetska zdravstvena organizacija definirala je moždani udar kao „naglo razvijanje kliničkih znakova žarišnoga ili globalnoga poremećaja moždanih funkcija, sa simptomima koji traju 24 sata ili duže, ili vode k smrti, bez drugog jasnog uzroka, osim znakova oštećenja krvnih žila“ (9). Žarišni simptomi odražavaju poremećaj funkcije zahvaćenoga dijela mozga poput hemipareze, a generalizirani simptomi uključuju glavobolju, mučninu, povraćanje, poremećaje svijesti, generalizirane epileptičke napadaje i poremećaje govora. Međutim, u djece s prolaznim simptomima karakterističnim za prolazni ishemijski napadaj također je moguće dokazati postojanje moždanoga udara slikovnim prikazima mozga, dok je u perinatalnom periodu moguće i potpuno izostajanje akutne prezentacije simptoma (6, 10, 11). Stoga se moždani udar u djece češće definira kao bilo kakav neurološki događaj povezan s akutnim infarktom i potvrđen slikovnim prikazima mozga što omogućava njegovo

razlikovanje od drugih neuroloških poremećaja (1, 12, 13). Unatoč čestoj i širokoj upotrebi kompjutorizirane tomografije koja može pomoći u prepoznavanju bolesti akutnoga tijeka, za potvrdu dijagnoze preporučena je magnetna rezonancija mozga (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) s ili bez angiografije zbog svoje veće osjetljivosti i specifičnosti u dijagnostici IMU-a (11, 14).

Pojedini tipovi i podtipovi moždanoga udara, kako u djece tako i u odraslih, imaju različite uzroke, rizične čimbenike, kliničku sliku, tijek i ishod bolesti, iako se ponekad mogu i preklapati. Stoga je radi poboljšanja zdravstvene skrbi od velike važnosti proučavati IMU u djece kao zaseban poremećaj te razlikovati i zasebno proučavati i pojedine tipove i podtipove bolesti.

Prema patofiziološkom uzroku nastanka moždani udar se može podijeliti na dva osnovna tipa bolesti, IMU, kod kojeg dolazi do prekida dotoka krvi, odnosno, neodgovarajuće opskrbe moždanoga tkiva kisikom, i hemoragijski moždani udar, kojeg uzrokuje krvarenje iz puknute krvne žile mozga (15). IMU se nadalje može podijeliti prema zahvaćenom dijelu cirkulacije mozga na arterijski IMU (AIMU) u slučaju okluzije unutar arterijskoga sustava mozga, i trombozu venskih sinusa mozga (engl. *cerebral sinovenous thrombosis*, CSVT) u slučaju okluzije unutar venskoga sustava mozga.

Postavljanje dijagnoze AIMU-a u djece temelji se na akutnoj pojavi neurološkoga deficita, a u slučaju novorođenčeta, pojavi napadaja ili drugih znakova neonatalne encefalopatije, uz slikovnu potvrdu prisutnosti parenhimskih infarkta u moždanim arterijama koji odgovaraju kliničkim znakovima i simptomima. Postavljanje dijagnoze pedijatrijskoga CSVT-a temelji se na prisutnosti karakterističnih simptoma koji uključuju glavobolju, napadaj, letargiju i žarišni ili generalizirani neurološki deficit uz obveznu potvrdu prisutnosti tromba ili prekida protoka cirkulacije u moždanim venama ili duralnim sinusima pomoću slikovnih tehnika (14).

U djece je posebno važna podjela IMU-a prema dobi nastanka bolesti jer su za pojedina dobna razdoblja u djece karakteristični različiti rizični čimbenici za pojavu bolesti, različiti klinički simptomi i ishod bolesti (12). Tako se razlikuju perinatalni IMU, koji nastaje u razdoblju između 20. gestacijskog tjedna i 28. dana postnatalno, te IMU u dječjoj dobi, koji nastupa između 28. dana postnatalno i 18. godine života (6, 16).

Perinatalni IMU se prema načinu prezentacije može podijeliti na akutni perinatalni moždani udar, koji se u literaturi često naziva i neonatalni IMU, i pretpostavljeni perinatalni IMU (6). Akutni perinatalni IMU javlja se u novorođenčadi pri rođenju ili oko vremena poroda i obično se manifestira odmah nakon početka žarišnim napadajima ili encefalopatijom

(6, 17). U sklopu akutnoga perinatalnog IMU-a u literaturi se spominje i fetalni IMU koji nastaje i dijagnosticira se prije samoga rođenja djeteta (17). Pretpostavljeni perinatalni moždani udar uključuje kronične infarkte dijagnosticirane s odgodom za koje se zapravo ne može utvrditi točno vrijeme nastanka, ali se pretpostavlja da su se dogodili u perinatalnom razdoblju. Simptomi u djeteta kod kojega se pretpostavlja perinatalni moždani udar uočavaju se kasnije te su blaži, a najčešće uključuju asimetriju, to jest, nejednako korištenje ekstremiteta poput štednje jedne ruke ili napadaje, nakon čega je slikovnim prikazima mozga moguće dokazati ostatne ranije infarkte čije se vrijeme nastanka ne može točno utvrditi (6, 18).

Perinatalni IMU i IMU u dječjoj dobi se također mogu dalje podijeliti prema dijelu zahvaćene cirkulacije na perinatalni arterijski IMU (PAIMU), arterijski IMU u dječjoj dobi (DAIMU), odnosno perinatalnu CSVT i CSVT u dječjoj dobi.

U literaturi se također spominje i takozvani tihi moždani udar koji se najčešće slučajno dijagnosticira u starije djece nalazom infarkta na slikovnim prikazima mozga. Takav moždani udar, unatoč asimptomatskoj manifestaciji, kasnije tijekom života može biti prepoznat kao uzrok određenih vaskularnih ili kognitivnih oštećenja (6).

1.1.2. Epidemiologija

Do danas je objavljeno više različitih epidemioloških studija o IMU-u u djece. Glavna ograničenja tih studija predstavljaju relativno malen broj uključenih slučajeva, različito definirane dobne skupine te različita etnička i geografska pripadnost uključenih slučajeva. Osim toga, istraživanja se obično češće provode u razvijenijim državama, dok su slabije razvijene države svijeta značajno manje uključene. Zbog svih navedenih razloga rezultate epidemioloških studija treba oprezno interpretirati.

1.1.2.1. Prevalencija i incidencija

Krishnamurthi i sur. su na temelju dostupnih podataka opisali globalnu i regionalnu prevalenciju i mortalitet IMU-a u djece od 0 do 19 godina tijekom perioda od 1990. do 2013. (13). Globalna prevalencija za 2013. iznosila je 97 792 slučajeva IMU-a što se odrazilo kao porast prevalencije IMU-a za otprilike 35 % tijekom ispitivanoga perioda, s većom prevalencijom u razvijenim zemljama u odnosu na zemlje u razvoju. U istom vremenskom periodu smrtnost je smanjena na 4 043 slučajeva (od 7 do 28 % svih slučajeva IMU-a) što

predstavlja smanjenje smrtnosti od otprilike 200 %, iako je tijekom cijeloga ispitivanog perioda bila značajno niža u razvijenim zemljama u odnosu na zemlje u razvoju. Porast prevalencije i pad smrtnosti uzrokovani su razvojem neinvazivnih slikovnih tehnika za prikazivanje mozga koje omogućuju lakšu diferencijalnu dijagnostiku i klasifikaciju bolesti te općenitim poboljšanjem zdravstvene skrbi.

Globalna incidencija moždanoga udara procijenjena na temelju epidemioloških istraživanja u različitim populacijama iznosila je od 1,3 do 13 slučajeva na 100 000 živorođene djece, dok u perinatalnom periodu iznosi jedan slučaj na 2500 do 5000 živorođene djece (20 do 40 slučajeva na 100 000 djece) (16, 19–21). Nedavno je objavljena i velika meta-analiza i sistematizirani pregled u kojem je objavljena ukupna incidencija akutnoga IMU-a od 5,61 slučaj na 100 000 djece, a u slučaju analize samo onih istraživanja koja su bila ograničena na ukupni raspon dobi od 0 do 18 godina, incidencija iznosi 4,58 slučaj na 100 000 djece (22). U istom radu objavljena je incidencija za perinatalni IMU od 24,55 slučajeva na 100 000 djece. Najviša objavljena incidencija perinatalnoga moždanog udara, koja uključuje i ishemijski i hemoragijski moždani udar, iznosi jedan slučaj na 1100 djece (21). Do danas objavljene incidencije DAIMU-a iznose od 1,2 do 8 na 100 000, dok su incidencije PAIMU-a značajno više te iznose od 2500 do 4000 na 100 000 djece zbog čega je PAIMU najučestaliji tip IMU-a u djece (23, 24). CSVT je najrjeđi oblik moždanoga udara u djece; objavljene su godišnje incidencije od svega 0,67 slučajeva na 100 000 djece (25–27), a u perinatalnom periodu objavljena je incidencija od jednoga slučaja na 9100 djece (21). Objavljene incidencije treba tumačiti s oprezom zbog ograničenja geografskih područja koje su uključile. U Hrvatskoj je do danas objavljena samo godišnja incidencija za AIMU utvrđena tijekom perioda od 1998. do 2005. te iznosi 0,67 slučajeva na 100 000 djece (28).

1.1.2.2. Dob

Sažetak pojedinačnih istraživanja pokazao je da djeca mlađa od jedne godine starosti imaju najveći rizik za nastanak moždanoga udara, a posebno je velik rizik u djece mlađe od godinu dana starosti gdje je zabilježeno između 8 i 35 % svih slučajeva moždanoga udara (20). Rezultate sukladne ovima dalo je i veliko ispitivanje koje je pokazalo da se četvrtina svih slučajeva AIMU-a javlja u perinatalnom periodu (PAIMU), a gotovo polovica svih zabilježenih slučajeva AIMU-a javlja se do druge godine starosti djeteta (24). Najveću učestalost IMU-a u perinatalnom periodu potvrdila je i nedavno objavljena meta-analiza (22).

Konačno, smatra se da je učestalost IMU-a gotovo 6 puta veća u novorođenčadi nego kod starije djece (6). U perinatalnom periodu javlja se 30 do 50 % slučajeva CSVT-a u djece (29).

Što se tiče starijih dobnih skupina, rezultati nisu dosljedni. U velikom istraživanju koje je obuhvatilo period od 1990. do 2013. i djecu u dobi od 0 do 19 godina, najveća učestalost pojave IMU-a za oba spola bilježena je u dobi od 15 do 19 godina, podjednako u razvijenim zemljama kao i u zemljama u razvoju (13). Nedavno objavljena meta-analiza koja je uključila objavljene radove u vremenskom periodu od 1984. do 2018. je pokazala smanjenje pojave IMU-a s porastom dobi nakon perinatalnoga perioda, s najnižom incidencijom u dobnoj skupini od 5 do 9 godina, a zatim blago povećanje incidencije u dobnoj skupini od 10 do 18 godina, to jest, oblik krivulje incidencije ovisne o dobi u obliku obrnutog slova J (22). Ovakav je rezultat u skladu s većinom prethodno objavljenih rezultata iako nekoliko autora u ranijim istraživanjima nije utvrdilo porast rizika za IMU u adolescenata (30, 31).

Istraživanja provedena u Hrvatskoj tijekom perioda 1998. do 2005. pokazala su najveću učestalost DAIMU-a u dobi od 4. do 9. godine života djeteta te podjednaku zastupljenost PAIMU-a i DAIMU-a (28, 32).

1.1.2.3. Spol

Velike međunarodne multicentrične studije utvrdile su veću učestalost pojave IMU-a u dječaka nego u djevojčica. Prva velika međunarodna multicentrična studija (engl. *International pediatric stroke study*, IPSS) koja je uključivala 1187 djece utvrdila je omjer dječaka u odnosu na djevojčice od 1,49 prema jedan (33). Veća učestalost IMU-a u dječaka potvrđena je i u kasnijoj većoj studiji u kojoj je uključeno 97 792 slučajeva IMU-a te je utvrđena i viša smrtnost u dječaka u odnosu na djevojčice (1,5 smrtni slučaj na 100 000 dječaka prema 1,1 smrtni slučaj na 100 000 djevojčica), iako razlozi za takav rezultat ostaju nejasni (13). Također je utvrđena i veća učestalost CSVT-a u dječaka (60 – 70 %) nego u djevojčica (29).

Tri rada ograničena na Hrvatsku također su pokazala veću učestalost AIMU-a u dječaka nego u djevojčica (28, 32, 34). Omjer dječaka prema djevojčicama u Hrvatskoj tijekom perioda 1998. do 2010. za PAIMU iznosio je 1,33 prema jedan, a za DAIMU 2,8 prema jedan (32).

1.1.2.4. Geografska i etnička pripadnost

Ograničenje u interpretaciji zastupljenosti IMU-a s obzirom na geografsku i etničku pripadnost predstavlja činjenica što se pojedinačna istraživanja uključena u velike epidemiološke studije uglavnom provode u ekonomski razvijenijim državama gdje prevladava bjelačka populacija. Autori jedne etnički heterogene populacijske studije s dovoljno podataka za daljnju analizu utvrdili su veći rizik za nastanak moždanoga udara u crne afroameričke djece i u Azijata u odnosu na bijelce, a smanjeni rizik u Latinoamerikanaca (35). Povećana učestalost IMU-a u afroameričke djece može se pripisati anemiji srpastih stanica koja u ovoj populaciji povećava rizik za nastanak IMU-a više od 200 puta (6). Već spomenuta studija u kojoj su autori opisali globalnu i regionalnu prevalenciju i mortalitet IMU-a u djece od 0 do 19 godina tijekom perioda od 1990. do 2013. godine, pokazala je 4 do 5 puta veću prevalenciju IMU-a u zemljama u razvoju u odnosu na razvijene zemlje iako je najniža prevalencija IMU-a tijekom 2013. zabilježena je u Latinskoj Americi, Aziji i Oceaniji (Kolumbija, Kostarika, Salvador, Gvatemala, Honduras, Meksiko, Nikaragva, Panama, Venezuela i Libija), a najviša u visokorazvijenim regijama Sjeverne Amerike (SAD), prije svega zbog razlika u dostupnosti i kvaliteti zdravstvenog sustava (13). Nedavno objavljena meta-analiza koja je uključila objavljene studije u vremenskom periodu od 1984. do 2018. godine, pokazala je nižu incidenciju IMU-a u Danskoj, Švedskoj, Tajvanu i Kanadi (od 1,33 do 2,51 na 100 000 djece) nego u SAD-u, Francuskoj, Španjolskoj, Italiji, Ujedinjenom Kraljevstvu i Njemačkoj (od 5,6 do 7,02 na 100 000 djece), iako su združene incidencije europskih zemalja slične incidencijama u Sjevernoj Americi (22). U ovim radovima nisu obuhvaćene detaljnije analize povezanosti geografske ili etničke pripadnosti s rizikom od nastanka IMU-a.

1.1.3. Lokalizacija IMU-a u djece

Slično kao i kod odraslih, simptomi i ishod akutnoga IMU-a u djece odgovaraju disfunkciji mozga na mjestu ishemijske lezije (36). Unatoč uvjerenju da povećana plastičnost mozga djeteta štiti od posljedica IMU-a, postoje dokazi da rane ozljede mozga rezultiraju dugoročnim neurološkim oštećenjima i utječu na ukupnu kognitivnu sposobnost, akademske vještine, verbalnu sposobnost i pažnju, što se može objasniti tvrdnjom da je mozak u razvoju posebno osjetljiv na moždani udar koji dovodi do poremećenoga mozga i kognitivnoga razvoja (37–39). Vjerojatno je kognitivni ishod nakon moždanog udara određen s više

različitih čimbenika kao što su dob pojave IMU-a, karakteristike ishemijske lezije, te različiti etiološki i sociodemografski čimbenici. Kako je MRI nužan korak u dijagnozi IMU-a u djece, korelacija između nalaza slikovnih prikaza mozga i određene etiologije mogla bi biti od pomoći u donošenju daljnjih dijagnostičkih i terapijskih odluka te predviđanju ishoda bolesti (40).

U literaturi je navedeno nekoliko različitih načina kategorizacije ishemijskih lezija prema njenoj lokalizaciji. Ovisno o zahvaćenim moždanim polutkama razlikuju se lijevostrani, desnostrani i obostrani IMU (41, 42). Važnijom se pokazala podjela ovisna o djelu zahvaćenoga moždanog tkiva na subkortikalni IMU (SIMU), koji uključuje bijelu tvar i duboku sivu tvar te zahvaća bazalne ganglije i⁄ili talamus, kortikalni IMU (KIMU), koji se odnosi na površinsku sivu tvar i zahvaća moždanu koru, te kombinirani kortikalno-subkortikalni IMU, koji zahvaća i moždanu koru i bazalne ganglije i/ili talamus (37, 40, 42–44).

Uloga lokalizacije ishemijske lezije u procjeni ishoda nakon epizode IMU-a u djece do danas je ispitana u nekoliko studija. Kohortna studija provedena u djece s jednostranim AIMU u Kanadi pokazala je različitu lokalizaciju ishemijske lezije ovisno o dobi (37). Subkortikalna lokalizacija ishemijskih lezija bila je češća u DAIMU dok je za PAIMU bila karakteristična kortikalna lokalizacija ishemijske lezije (37, 39). Međutim, nepovoljniji ishod češće je bilježen u slučaju subkortikalne lezije u perinatalnom periodu, a u slučaju kortikalne lezije u dobi od jednog mjeseca do 5 godina starosti djeteta. Osim toga, kombinirani kortikalno-subkortikalni AIMU pokazao se štetnijim za kognitivni ishod od AIMU-a ograničenoga samo na kortikalno ili subkortikalno tkivo (37, 41, 45). Istraživanje provedeno 2010. u Švicarskoj pokazalo je nižu učestalost DAIMU-a lokaliziranoga u subkortikalnim strukturama u odnosu na miješanu i kortikalnu lokalizaciju (40). Također je dokazano da su dugoročna motorička oštećenja nakon PAIMU-a, poput cerebralne paralize, usko povezana s lokalizacijom infarkta u kortikalnim i subkortikalnim regijama koje se klasično smatraju dijelom motoričkoga sustava (44) iako kasnija studija nije uspjela utvrditi povezanost lokalizacije ishemijske lezije s dugoročnim kognitivnim ishodom (39).

Do danas nije istražen potencijal doprinosa specifičnih genetičkih rizičnih čimbenika na nastanak ishemijskih lezija u različitim dijelovima mozga prilikom epizode IMU-a u djece. Ispitivanje povezanosti etiologije s lokalizacijom ishemijske lezije moglo bi pomoći u razumijevanju IMU-a kao i daljnjem terapijskom pristupu djetetu nakon IMU-a.

1.1.4. Etiologija i patogeneza IMU-a u djece

Etiologija moždanoga udara u djece razlikuje se od etiologije moždanoga udara u odraslih prije svega jer u djece obično nisu prisutni tradicionalni vaskularni čimbenici rizika za nastanak moždanoga udara, poput ateroskleroze, pretilosti, dislipidemije, hipertenzije ili pušenja, koji se najčešće susreću u odraslih (5, 6). Stoga u djece postoji izravnija uzročno-posljedična veza između čimbenika rizika i nastanka IMU-a zbog čega je posebno važno proučavati pedijatrijski IMU odvojeno od IMU-a u odrasloj dobi. IMU može biti uzrokovan trombozom, embolijom ili sistemskom hipoperfuzijom. Ipak, najčešći je uzrok tromboza moždanih krvnih žila zbog strukturnih anomalija samih žila te nasljednih ili stečenih protrombotičkih poremećaja.

Do danas je prepoznat velik broj nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika za razvoj IMU-a u djece, od kojih se univerzalnim rizičnim čimbenicima smatraju neaterosklerotske arteriopatije (heterogeni poremećaji koji uzrokuju lezije ili strukturne abnormalnosti krvnih žila mozga) i različite srčane bolesti, ali su pojedini rizični čimbenici posebno rijetki (Tablica 1.) (1, 46). U više od 60 % djece s IMU-om moguće je utvrditi prisutnost više rizičnih čimbenika (47), a učestalost pojedinoga rizičnog čimbenika može se razlikovati ovisno o geografskom području i etničkim karakteristikama, kao i s obzirom na tip IMU-a i dob djeteta (46). Unatoč svom napretku u istraživanju IMU-a u djece, etiologija je još uvijek nerazjašnjena u približno 30 % svih slučajeva (1, 48).

Tablica 1. Pregled rizičnih čimbenika za nastanak pojedinih podtipova IMU u djece (prilagođeno prema (1, 6, 29, 46, 49–53)

AIMU	PAIMU	DAIMU	CSVT
Srčane bolesti: • nasljedne (stenoza aorte i mitralne valvule, otvoreni foramen ovale, atrijski i ventrikularni septalni defekt) • reumatska srčana bolest • kardiomiopatija • endokarditis/miozitis • poremećaji srčanoga ritma	**Srčane bolesti:** • kongenitalna bolest srca • operacije srca • ekstrakorporalna membranska oksigenacija (ECMO)	**Arteriopatije:** • sindrom moya-moya • disekcija arterije • fibromuskularna displazija • uzrokovana anemijom srpastih stanica • uzrokovana infekcijama (npr. *Varicella zoster*)	**Općeniti:** • dehidracija • infekcija • sepsa • upala pluća • vrućica • hipoksičko-ishemička ozljeda • nakon lumbalne punkcije • otežan porod

AIMU	PAIMU	DAIMU	CSVT
Hematološke bolesti: • anemija srpastih stanica • sideropenična anemija • mijeloproliferativne bolesti (policitemija, trombocitemija) • leukemije, limfomi • trombocitopenija • nasljedna trombofilija (*F5* 1601 G/A, manjak antitrombina, proteina C ili proteina S) • stečena trombofilija (diseminirana vaskularna koagulacija, antifosfolipidni sindrom)	**Patologije vezane uz posteljicu i porod:** • tromboza posteljice • upala posteljice • abnormalnosti posteljice • hitni carski rez • produljeni trudovi • reanimacija pri rođenju	**Hiperkoagulabilna stanja:** • nedostatak proteina C i proteina S • *F5* 1601 G/A • mutacija *F2* 20210 G/A • polimorfizam *MTHFR* C677T • deficijencija antitrombina III • povećanje FVIII • hiperlipoproteinemija • lupus antikoagulant	**Hematološke bolesti:** • anemija zbog nedostatka željeza • anemija srpastih stanica • talasemija • autoimuna hemolitička anemija • paroksizmalna noćna hemoglobinurija • trombofilija • leukemije
Metaboličke bolesti: • mitohondrijski poremećaji (npr. MELAS) • homocistinurija i hiperhomocisteinemija • Fabryjeva bolest • dislipidemija	**Trombofilija:** • nedostatak proteina C i proteina S • *F5* 1601 G/A • mutacija *F2* 20210 G/A • polimorfizmi *MTHFR* • povišen lipoprotein(a), homocistein ili antifosfolipidna protutijela	**Srčane bolesti:** • nasljedne i stečene • otvoreni foramen ovale • aritmija • prethodne operacije srca • endokarditis	**Poremećaji glave i vrata:** • ozljede • infekcije • meningitis • sinusitis • mastoiditis • hidrocefalus • nakon intrakranijalne operacije
Infektivne bolesti: • bakterijski meningitis • virusi *Varicella zoster*, HIV, parvovirus B19 • neuroborelioza	**Infektivne bolesti:** • sepsa • bakterijski meningitis	**Akutne sistemske bolesti:** • infektivne bolesti • sepsa • šok • acidoza/anoksija	**Autoimune bolesti**
Vaskulopatije: • sindrom moya-moya • fibromuskularna displazija • neurofibromatoza tip 1 • tuberozna skleroza • disekcija krvne žile • prolazna moždana arteriopatija	**Rizični čimbenici majke:** • prva trudnoća • neplodnost • hitni carski rez • poremećaji zgrušavanja • korioamnionitis • oligohidramnioza preeklampsija	**Hematološke bolesti:** • anemija srpastih stanica • hemolitička anemija • anemija zbog nedostatka željeza • maligne bolesti	**Drugo:** • srčane bolesti • bubrežne bolesti • lijekovi • kromosomski poremećaji • metabolička stanja • Behçetov sindrom

AIMU	PAIMU	DAIMU	CSVT
Vaskulitisi: • postinfektivni • sistemski eritemski lupus • *Poliarterits nodosa* • Kawasakijev sindrom • Takayasuov sindrom • Henoch-Schönleinova purpura	**Drugo:** • trauma • vaskularna trauma • arteriopatije	**Kronične bolesti glave i vrata:** • tumori mozga i vrata • aneurizme i arterio-venske malformacije • migrena	
Drugo: • trauma • lijekovi, toksini		**Drugo:** • genetičke i metaboličke bolesti (Fabryjeva bolest, mitohondriopatije, trisomija 21, bolesti vezivnoga tkiva) • prijašnje operacije glave • trauma	

AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, *F5* – gen za čimbenik zgrušavanja V, *F2* – gen za protrombin (čimbenik zgrušavanja II), *MTHFR* – gen za metilen tetrahidrofolat reduktazu, FVIII – čimbenik zgrušavanja VIII, MELAS – mitohondrijska encefalopatija s laktatnom acidozom i epizodama koje nalikuju moždanom udaru, HIV – virus humane imunodeficijencije.

1.1.4.1. Posebnosti perinatalnoga IMU-a u odnosu na IMU u dječjoj dobi

Etiologija perinatalnoga IMU-a posebno se razlikuje od etiologije IMU-a u dječjoj dobi (Tablica 1.). Niska učestalost ponavljanja perinatalnog-a IMU-a kasnije u djetinjstvu ili u kasnijoj trudnoći majke podržava koncept da postoje čimbenici rizika ograničeni na perinatalno razdoblje (49, 50), s izuzetkom djece sa srčanim bolestima kod kojih je zabilježena pojava recidiva u 14 % slučajeva (54).

U perinatalnom periodu 80 % svih moždanih udara čini PAIMU, a preostalih 20 % čine hemoragijski moždani udar i CSVT (6). Trudnoća i porod po svojoj prirodi jesu hiperkoagulabilna stanja tijekom kojih dolazi do kompleksnih interakcija majčine i fetalne cirkulacije. Promjene u hemostazi majke javljaju se kao evolucijski odgovor na potencijalnu hemoragiju, a očituju se kao porast mnogih prokoagulacijskih čimbenika, smanjenje koncentracija prirodnih antikoagulanata i općenito smanjenje aktivnosti fibrinolitičkoga sustava (55). U fetusa također dolazi do promjena koje uključuju povišene vrijednosti hematokrita i povećanje viskoznosti krvi, kao i smanjenja funkcije fibrinolitičkoga sustava. Stoga su majke i djeca posebno podložni trombozi i tromboembolijskim komplikacijama

tijekom trudnoće i poroda, a posebno u slučaju teškoga i dugotrajnoga poroda što predstavlja dodatni perinatalni stres. Istraživanja su ukazala da nasljedna trombofilija majke može povećati rizik za nastanak tromboze u fetusa, ali točna uloga trombofilije majke još nije potpuno razjašnjena. U dvije studije koje su uključivale parove majke i djeteta, u najmanje 50 % parova utvrđeni su protrombotički rizični čimbenici (56, 57). U velikoj studiji neonatalnih protrombotičkih rizičnih čimbenika, 68,1 % novorođenčadi s perinatalnim IMU-om imalo je barem jedan protrombotički čimbenik rizika u usporedbi s 24,2 % u usklađenoj kontrolnoj skupini (58).

Jedna od vjerojatnijih etiologija perinatalnoga IMU-a je tromboembolijski događaj u posteljici nakon čega embolus ulazi u fetalnu cirkulaciju (49, 53). O ulozi posteljice u patogenezi perinatalnoga IMU-a govori i nedavno objavljen sistematski pregled dostupnih podataka koji je utvrdio prisutnost patoloških promjena posteljice u 72 od 83 slučaja, odnosno, veću učestalost utvrđenih patoloških procesa posteljice u djece s perinatalnim IMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu uz najveću učestalost tromboupalnih promjena (59).

Povezanost infekcija, kao što su korioamnionitis ili neonatalna sepsa s perinatalnim IMU-om, također upućuju na važnu ulogu upale u nastanku i razvoju bolesti, iako konkretan mehanizam nije razjašnjen (49). Dobro utvrđen uzrok nastanka moždanog udara je bakterijski meningitis, gdje se moždani udar pojavljuje kao komplikacija u 17 do 43 % svih slučajeva (50).

Dakle, etiologija perinatalnoga IMU-a je višestruka te uključuje i fetalne, odnosno, neonatalne rizične čimbenike, ali i rizične čimbenike majke, a najvjerojatniji nastanak perinatalnoga IMU-a uzrokovan je kombiniranim međudjelovanjem više različitih rizičnih čimbenika.

Etiologija IMU-a u dječjoj dobi bolje je istražena, a uključuje brojne rizične čimbenike od kojih je najčešća arteriopatija (Tablica 1.). Za etiološku klasifikaciju akutnoga ishemijskog moždanog udara u odraslih koristi se tzv. klasifikacija TOAST (engl. *Trial of Org 10107 in Acute Stroke Treatment Classification*) koja razlikuje pet podtipova IMU-a: i) ateroskleroza velikih arterija, ii) kardioembolija, iii) okluzija malih žila, iv) druga utvrđena etiologija i v) neutvrđena etiologija (60–62). Međutim, ova klasifikacija nije prikladna za DAIMU jer ne uključuje uobičajene pedijatrijske etiologije poput anemije srpastih stanica ili cerebralne arteriopatije (40). Često se koristi modificirana klasifikacija IMU-a u djece, tzv. Ganesanova klasifikacija, koja razlikuje osam etioloških podtipova DAIMU-a: i) bolest srpastih stanica, ii) kardioembolija, iii) disekcija arterija, iv) sindrom moya-moya, v) steno-

okluzivna cerebralna arteriopatija, vi) druga utvrđena etiologija, vii) više vjerojatnih ili mogućih etiologija, i viii) neutvrđena etiologija (63).

1.1.4.2. Posebnosti CSVT-a u djece

Patofiziološki mehanizam CSVT-a uključuje trombozu unutar venskoga sustava koja dovodi do zastoja protoka krvi, začepljenja vene i posljedičnoga povećanja kapilarnoga hidrostatskog tlaka, potiskujući tekućinu u intersticij i stvarajući edem. Trajni porast hidrostatskoga tlaka može rezultirati dijapedezom crvenih krvnih stanica, a ako je tlak veći od arterijskoga tlaka, može doći i do smanjenja arterijskoga dotoka krvi i arterijske ishemije (64).

S obzirom na posebnost patogeneze CSVT-a, rizični čimbenici za nastanak CSVT-a u djece su raznoliki i ovisni o dobi (Tablica 1.). Kao i u odraslih, etiologija CSVT-a u djece često je višestruka, s predisponirajućim komorbiditetnim stanjem identificiranim u do 95 % oboljelih (64). U perinatalnom periodu rizični čimbenici majke (gestacijski dijabetes, infekcije), izloženost perinatalnom stresu (hipoksija, ishemija, otežan porod) i akutne sistemske bolesti (infekcije, sepsa, upala pluća) čine vodeće rizične čimbenike za nastanak CSVT-a, dok su u starije djece najčešći rizični čimbenici akutne infekcije glave i vrata, akutne bolesti s dehidracijom i anemija zbog nedostatka željeza, ali i određena kronična stanja koja su karakterizirana poremećajem regulacije zgrušavanja i cirkulacije, što uključuje primjerice kongenitalnu bolest srca, upalnu bolest crijeva, nefrotski sindrom i leukemije (29, 65).

Rizični čimbenici za razvoj CSVT-a mogu se općenito opisati kao stanja koja uzrokuju mehaničku kompresiju vene ili venskoga sinusa što uzrokuje stazu i okluziju vene, te oštećenje krvnih žila, a česti su slučajevi djece s više od jednoga rizičnog čimbenika za nastanak tromba. Stoga je nakon kliničkih i laboratorijskih ispitivanja pacijenata u velikom broju slučajeva CSVT-a moguće utvrditi ulogu trombotičkih poremećaja u etiologiji bolesti (65).

1.1.4.3. Trombofilija kao čimbenik rizika za nastanak IMU-a u djece

Hemostaza se sastoji od dva suprotna, ali međusobno povezana i usklađena puta, (i) koagulacije u kojoj se trombociti i proteini aktiviraju i međusobno djeluju kako bi nastao tromb, i (ii) fibrinolize u kojoj dolazi do razgradnje tromba. U fiziološkim uvjetima ova dva puta su u ravnoteži, a promjena bilo kojega čimbenika u ovom sustavu dovodi do njezinoga poremećaja, a posljedica je krvarenje ili tromboza.

Arterijska tromboza započinje ozljedom stijenke krvne žile, koja je uzrokovana mehaničkim oštećenjem ili puknućem, što dovodi do izlaganja subendotelnoga izvan staničnoga matriksa. Tada dolazi do brze regrutacije, aktivacije i adhezije trombocita na mjestu ozljede, u čemu posreduje interakcija trombocitnoga glikoproteinskog receptora Ib-IX-V s von Willebrandovim čimbenikom (VWF). Trombocitni receptori GPVI i GPIa/IIa posreduju čvrsto vezanje trombocita na fibrilarni kolagen. Zatim dolazi do otpuštanja trombocitnih granula i izražaja čimbenika zgrušavanja VII (FVII) i XI (FXI), posljedičnoga kidanja fibrinogena novonastalim trombinom i umrežavanja fibrinskih lanaca pomoću aktiviranoga čimbenika zgrušavanja XIII (FXIIIa), čime nastaje stabilni fibrinski ugrušak (66). Venska tromboza započinje na površini intaktnoga endotela, u uvjetima niskoga protoka krvi prilikom hipoksije ili upalnoga odgovora koji dovode do izražaja adhezijskih receptora P-selektina, E-selektina i VWF. Ovi receptori potiču vezanje cirkulirajućih trombocita, leukocita i mikrovezikula na aktivirani endotel. Konačno, aktivirani leukociti na svojoj površini izražavaju tkivni faktor (TF) čime se pokreće nastajanje ugruška (66).

Trombofilija predstavlja povećanu sklonost za arterijsku i vensku trombozu kao posljedicu često višestrukih nasljednih i stečenih poremećaja sustava zgrušavanja (67), a navodi se kao jedan od čimbenika rizika za nastanak IMU-a u djece (1, 6). Kao i u svakom trombotičkom procesu, protrombotički čimbenici rizika za razvoj IMU-a u djece mogu se razumjeti u kontekstu takozvanoga Virchowljevog trijasa trombogeneze koji uključuje zastoj krvi, oštećenje ili poremećaj stijenke krvne žile i hiperkoagulabilnost, to jest, poremećaj komponenti sustava zgrušavanja i/ili fibrinolize.

Oba puta hemostaze imaju prirodne inhibitore koji moduliraju te procese, primjerice protein C, protein S i antitrombin u koagulaciji te inhibitor aktivatora plazminogena u fibrinolizi. Aktivnosti navedenih endogenih hemostatskih proteina su u djece uobičajeno snižene i približavaju se vrijednostima u odraslih tijekom razvoja. Stoga je tumačenje rezultata ovih laboratorijskih pretraga posebno složeno u perinatalnom IMU, gdje ovi čimbenici mogu biti sniženi i zbog sekundarne akutne bolesti (6, 29). U tom slučaju preporučeno je ponoviti mjerenje u starijoj dobi djeteta kako bi se provjerilo jesu li količine hemostatskih proteina dosegnule očekivane vrijednosti kao u odrasloj populaciji (6).

Do danas su istraženi različiti nasljedni protrombotički rizični čimbenici za nastanak IMU-a u djece (1, 6, 49, 68, 69). Među njima su povećane količine lipoproteina(a), smanjene količine inhibitora koagulacije (proteina C i antitrombina) ili mutacije gena koje rezultiraju ili nemogućnošću inhibicije proteina tijekom hemostaze (mutacije *F2* 20210 G/A i *F5* 1601 G/A) ili abnormalnim stvaranjem spoja (povećane količine homocisteina koje su rezultat

polimorfizma gena metilen tetrahidrofolat reduktaze, *MTHFR* C677T) (1, 68). Neka od ovih stanja izravno su povezana s prvom pojavom pedijatrijskoga IMU-a (68), ali opseg njihovoga doprinosa ostaje diskutabilan zbog varijabilnosti testiranja u studijama (49), iako ova stanja mogu djelovati kao okidači za AIMU u prisutnosti drugih čimbenika (npr. srčana bolest). Vjeruje se da trombofilija samo pridonosi pojavi tromboze, ali postoje dokazi da pojedini trombofilni čimbenici neovisno povećavaju rizik pojave AIMU-a. Primjerice, povišena koncentracija lipoproteina(a), *F5* 1601 G/A, *F2* 20210 G/A, manjak proteina C i polimorfizmi *MTHFR* pokazali su se kao neovisni čimbenici rizika za AIMU (68, 69).

Protrombotički rizični čimbenici, koji uključuju pojedina hematološka i hiperkoagulabilna stanja, prepoznati su i kao važni uzroci CSVT-a. Oni uključuju mutaciju *F5* 1601 G/A, lupus antikoagulant i nedostatke proteina C, proteina S, antitrombina i čimbenika XII. Ostali poremećaji koji predisponiraju za CSVT uključuju mutaciju *F2* 20210 G/A, disfibrinogenemiju, bolest srpastih stanica, diseminiranu intravaskularnu koagulaciju i homocistinuriju (65). Istraživanja CSVT-a u odraslih pokazale su da se određeni protrombotički rizični čimbenici javljaju u 30 do 35 % slučajeva, i da često zajedno s drugim rizičnim čimbenicima i komorbiditetima mogu doprinijeti razvoju CSVT-a (70, 71), dok su istraživanja u djece pokazala nešto veću učestalost protrombotičkih rizičnih čimbenika, u rasponu od 25 do 60 % (72, 73). Trombofilna stanja koja predstavljaju čimbenike rizika za razvoj CSVT-a u djece mogu biti genetički uvjetovana, ali je uočena snažnija povezanost stečenih protrombotičkih poremećaja nastalih pod utjecajem aktivne bolesti s pojavom CSVT-a u djece (74).

Potencijalni protrombotički rizični čimbenici su mnogobrojni, ali su i dalje nedovoljno istraženi u IMU-u u djece, pogotovo u pojedinim podtipovima, ali i u smislu udruženosti ovih čimbenika. Naime, poznato je da prisutnost pojedinoga rizičnog čimbenika može biti od manjega značaja, ali istodobna prisutnost više rizičnih čimbenika može povećati rizik (1, 68, 75). Stoga je daljnja istraživanja potrebno pažljivo osmisliti i provesti kako bi se dobili sveobuhvatni rezultati koji će omogućiti rasvjetljivanje uloge nasljedne trombofilije u pojavi IMU-a i pojedinih podtipova u djece.

1.2. Promjene u genima za čimbenike zgrušavanja i fibrinolize

Protrombotički poremećaji mogu biti uzrokovani promjenama na razini različitih gena koji utječu na sintezu, aktivnost, bioraspoloživost ili metabolizam specifičnih čimbenika uključenih u procese zgrušavanja i fibrinolize, i koji stoga predstavljaju nasljedne rizične čimbenike za nastanak tromboze (67). Rasvjetljavanje uloge pojedinih genskih promjena u više različitih gena koji kodiraju za čimbenike zgrušavanja i fibrinolize s IMU-om u djece mogla bi pomoći u boljem razumijevanju etiologije bolesti, ali i usmjeriti daljnje terapijske postupke. Povezanost pojedinih trombofilnih genskih promjena s pojavom IMU-a u djece već su opisane u literaturi (1, 32, 47, 56, 68), ali postoje brojne promjene povezane s trombofilijom koje su istražene u odraslih (76, 77), a u djece samo u malom broju studija ili uopće nisu istražene.

1.2.1. Čimbenik zgrušavanja V

Čimbenik zgrušavanja V (FV) je jednolančani GP kodiran genom *F5* koji se nalazi na dugom kraku 1. kromosoma (lokus 1q24.2), veličine je 80 kb, a sastoji se od 25 eksona i 24 introna (78, 79). Oko 80 % FV-a nalazi se u krvnoj plazmi u koncentraciji od 20 nM (80), a sintetiziraju ga hepatociti u obliku pročimbenika veličine 330 kDa. Preostalih 20 % FV-a pohranjeno je u trombocitnim granulama, sintetizira se u megakariocitima ili dospijeva u trombocite endocitozom plazme, a oslobađa se u plazmu nakon aktivacije trombocita i tako uzrokuje povećanje lokalne koncentracije kočimbenika na mjestu ozljede (78, 79).

Sinteza i razgradnja FV-a povezane su te odražavaju njegovu ulogu i u prokoagulacijskom i u antikoagulacijskom putu hemostaze (79, 81). Propeptid nastao transkripcijom i translacijom *F5* sastoji se od 2224 aminokiselinskih ostataka (AK) koji čine domene A1, A2, A3, C1 i C2 te signalni peptid od 28 AK-a koji se odcjepljuje nakon premještanja molekule u endoplazmatski retikul i prije njenog konačnog izlučivanja u krvnu plazmu (78, 79). Prokoagulacijsko djelovanje izražava se tek nakon proteolitičke aktivacije FV-a trombinom ili aktiviranim čimbenikom zgrušavanja X (FXa) na mjestu tri argininska ostatka (Arg709, Arg1018 i Arg1545) čime se odcjepljuje domena B i nastaje aktivirani FV (FVa). Nastali FVa koji se nalazi u kompleksu s FXa na fosfolipidnoj membrani, povećava aktivaciju protrombina (FII) ~ 300 000 puta, a sastoji se od teškog lanca veličine 105 kDa (domene A1 iA2) i lakoga lanca veličine 74 ili 71 kDa (domene A3, C1 i C2) koji su povezani ionom Ca^{2+} nekovalentnim vezama i hidrofobnim interakcijama (78, 79). Relativna

molekularna masa (Mr) lakoga lanca može varirati ovisno o glikozilaciji na položaju Asn2181 pri čemu je omjer glikoziliranih (FV1) i neglikoziliranih (FV2) molekula u krvi oko 30 prema 70, a dokazano je i da FV2 nakon aktivacije ima veći afinitet za fosfolipidne membrane i veću aktivnost u stvaranju trombina (79, 82).

Razgradnja FVa predstavlja smanjenje prokoagulacijske aktivnosti, a postiže se proteolitičkim kidanjem posredovanim aktiviranim proteinom C (APC) koji kida FVa na tri mjesta. Prvo kidanje na položaju Arg506 uzrokuje smanjenje aktivnosti FVa (od 25 do 40 %) i smanjenje afiniteta FVa za FXa, to jest, dovodi do djelomične inaktivacije. Naknadno kidanje na položaju Arg306 dovodi do potpune inaktivacije FVa, a kidanje na položaju Arg679 smatra se manje važnim (79, 83). Protein S specifično potiče kidanje u kojem posreduje APC na položaju Arg306, pa se pretpostavlja da je ono najvažnije mjesto inaktivacije FVa, dok se čini da je položaj Arg506, iako predstavlja kinetički najpovoljnije mjesto kidanja, važniji u regulaciji slobodnog FVa, budući da je u protrombinaznom kompleksu taj položaj zaštićen od djelovanja APC (79, 83). S druge strane, kidanje intaktnoga FV pomoću APC-a na položaju Arg506 na površini negativno nabijenih fosfolipida uzrokuje nastajanje antikoagulacijskoga proteina FVac koji djeluje kao kočimbenik APC-u, te zajedno s proteinom S posreduje u inaktivaciji aktiviranoga čimbenika zgrušavanja VIII (FVIIIa) (79, 81). Daljnje kidanje na položaju Arg1545 uzrokuje gubitak aktivnosti FV kao kočimbenika za APC, dok kidanje na položajima Arg709 i Arg1018 ne utječe na ovu aktivnost. Delecijska je analiza pokazala da su zadnjih 70 AK-a domene B nužni za antikoagulacijska svojstva FV (83).

Do danas su opisane mnoge promjene u *F5* koje se povezuju s trombofilijom (Tablica 2.) (84). Mutacija *F5* 1601 G/A predstavlja najčešći oblik nasljedne trombofilije te se nasljeđuje autosomno dominantno. Ova mutacija uzrokuje rezistenciju na APC jer uzrokuje promjenu AK-a u glavnom ciljnom mjestu djelovanja APC-a, čime se narušava APC-om posredovana razgradnja FVa i aktivnost FV kao kočimbenika za APC prilikom inaktivacije FVIIIa (79, 85). Heterozigotni oblik mutacije može se naći u 4,4 % Europljana, s najvećom prevalencijom u Grka (7 %) i u južnoj Švedskoj (14,7 %) dok je iznimno rijedak u Azijata, Afrikanaca i Australaca (86, 87). U Hrvatskoj je objavljena učestalost *F5* 1601 G/A u zdravih ispitanika od 2,9 do 4,0 % (88, 89). Kako prisutnost mutacije nije zabilježena u autohtonim populacijama Azije, Afrike, Amerike i Australije, vjerojatno se mutacijski događaj dogodio prije 30 000 godina nakon migracije stanovništva iz Afrike i odvajanje Azijata od Europljana, dok je široka rasprostranjenost alela *F5* 1601 G/A u zapadnom svijetu vjerojatno posljedica smanjene sklonosti krvarenju žena nositeljica alela prilikom poroda i posljedično njihovom

većem preživljenju (79, 83). Objavljene učestalosti homozigotnoga oblika u bijelaca variraju od 1 na 1000 do 1 na 5000 osoba (90, 91). *F5* 1601 G/A najčešće se povezuje s nastankom venske tromboze gdje prisutnost povećava rizik nastanka bolesti 5 do 7 puta u heterozigota i do 80 puta u homozigota (79, 83).

Tablica 2. Pregled genskih promjena u *F5* povezanih s trombofilijom (prilagođeno prema (84, 92–94).

alternativni naziv	**nazivlje HGVS**	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida***	**zamjena AK***	**domena**	**ekson**
F5 1601 G/A Leiden	NM_000130.4 :c.1601G>A	rs6025	1601 G/A (1691 G/A)	Arg534Gln (Arg506Gln)	A2	10
F5 Cambridge	NM_000130.5 :c.1001G>C	rs118203906	1001 G/C (1091 G/C)	Arg334Gly (Arg306Gly)	A2	7
F5 Hong Kong	NM_000130.5 :c.1000A>G	rs118203905	1000 A/G (1090 A/G)	Arg334Gly (Arg306Gly)	A2	7
F5 Liverpool	NM_000130.5 :c.1160T>C	rs118203911	1160 T/C (1250 T/C)	Ile387Thr (Ile359Thr)	A2	8
/	NM_000130.5 :c.1538G>A	rs6020	1538 G/A (1628 G/A)	Arg513Lys (Arg485Lys)	A2	10
F5 HR2 (haplotip)	NM_000130.5 :c.1238T>C	rs6033	1238 T/C (1328 T/C)	Met413Thr (Met385Thr)	A2	8
	NM_000130.5 :c.3980A>G	rs1800595	3980 A/G (4070 A/G)	His1327Arg (His1229Arg)	B	13
	NM_000130.5 :c.5290A>G	rs6030	5290 A/G (5380 A/G)	Met1764Val (Met1736Val)	A3	16
	NM_000130.5 :c.6665A>G	rs6027	6665 A/G (6755 A/G)	Asp2222Gly (Asp2194Gly)	C2	25
aleli A/G	NM_000130.5 :c.2301A>G	rs6021	2301 A/G (2931 A/G)	Ser767Ser (Ser739Ser)	B	13
	NM_000130.5 :c.2573A>G	rs4524	2573 A/G (2663 A/G)	Lys858Arg (Lys830Arg)	B	13
	NM_000130.5 :c.2594A>G	rs4525	2594 A/G (2684 A/G)	His865Arg (His837Arg)	B	13
	NM_000130.5 :c.2773A>G	rs6032	2773 A/G (2683 A/G)	Lys925Glu (Lys897Asp)	B	13

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida i AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

Takozvani haplotip *F5* HR2 nazvan je po najčešće analiziranom polimorfizmu *F5* His1327Arg (u literaturi se može naći pod nazivom His1299Arg) u domeni B (79, 95). Haplotip zapravo uključuje 13 povezanih genskih varijanti, ali je utvrđena njihova

neravnotežna povezanost zbog čega je za potvrdu prisutnosti *F5* HR2 dovoljno dokazati najčešći polimorfizam (96). Genski produkt posjeduje smanjenu aktivnost kočimbenika za APC prilikom razgradnje FVIIIa, ali su dobiveni proturječni rezultati prilikom ispitivanja povezanosti haplotipa *F5* HR2 s povećanom rezistencijom na APC (96). Također, utvrđeno je da je haplotip *F5* HR2 neovisni čimbenik za nastanak venske tromboze, iako su pojedine studije utvrdile da predstavlja blagi protrombotički rizični čimbenik samo u slučaju istovremene prisutnosti *F5* 1601 G/A (96–99). Prevalencija haplotipa *F5* HR2 u autohtonim populacijama Azije, Afrike, Amerike i Australije kreće se u rasponu od 5 do 17 % (96, 98).

Povezanost genskih promjena *F5* 1601 G/A i *F5* HR2 s AIMU-om u djece u Hrvatskoj do danas je ispitana i predstavljena u dva znanstvena rada. Za nositelje *F5* 1601 G/A utvrđen je više od sedam puta veći rizik za nastanak PAIMU-a i DAIMU-a (34), odnosno više od sedam puta veći rizik za nastanak AIMU-a, dok za nositelje haplotipa *F5* HR2 povezanost s pojavom AIMU-a nije utvrđena (32).

1.2.2. Protrombin

Protrombin je GP koji se naziva i čimbenikom zgrušavanja II (FII), a kodiran je genom *F2* koji se nalazi 11. kromosomu (lokus 11p11.2), veličine je 21 kb, a sastoji se od 14 eksona i 13 introna te 5' i 3' nekodirajuće regije koje sudjeluju u regulaciji genske ekspresije (100). Genski produkt sintetizira se u jetri u obliku prepro-protrombina veličine ~ 72 kDa te se sastoji od prepro- vodeće sekvencije, domene bogate γ-glutaminskom kiselinom (Gla domena), dvije tzv. *kringle* domene i terminalne domene s aktivnošću serinske proteaze. Signalni peptid uklanja se iz prepro-protrombina nakon transporta polipeptida u endoplazmatski retikul čime nastaje pro-protrombin. Slijedi modifikacija γ-glutamatnih ostataka u γ-karboksiglutamatne ostatke (Gla) ovisna o vitaminu K, uklanjanje propeptida i *N*-glikozilacije na tri položaja. Nastali protrombin zatim se izlučuje u cirkulaciju gdje mu koncentracija iznosi oko 1,2 – 1,4 μM (80, 101). Aktivacijom FII pomoću FXa uz prisutnost FVa, kalcijevih iona i fosfolipidne površine nastaje trombin veličine ~ 36 kDa, ključan čimbenik u procesu hemostaze koji izravno aktivira trombocite i druge čimbenike zgrušavanja (FV, FVIII, FXI i FXIII) te uzrokuje nastanak fibrinskoga ugruška iz fibrinogena (102). Međutim, tijekom formiranja ugruška, do 90 % trombina adsorbira se na fibrinska vlakna kako bi se spriječio prekomjeran rast ugruška, a ostatak trombina se veže s antitrombinom te se inaktivira tijekom sljedećih 12 do 20 minuta. Dodatno, vezanje trombina na trombomodulin, integralni membranski protein kojega izražavaju endotelne stanice, uzrokuje

aktivaciju proteina C i posljedičnu inaktivaciju FVa i FVIIIa. Dakle, slično kao i FV, FII ima prokoagulacijski, antikoagulacijski i antifibrinolitički učinak (100, 102).

Promjene u *F2* koje se povezuju s trombofilijom opisane su u Tablici 3. (67). Točkasta mutacija *F2* 20210 G/A nalazi se u 3' nekodirajućoj promotorskoj regiji te, iako ne utječe na strukturu molekule FII, uzrokuje povišenje koncentracije FII u plazmi za do 30 % jer nastaje stabilnija molekula *F2* glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA) (100, 102). Ova promjena je drugi najčešći oblik nasljedne trombofilije (102) te se povezuje s približno dvostruko većim rizikom od nastanka venske tromboze (67). Slično kao i za *F5* 1601 G/A, pretpostavlja se da je *F2* 20210A nastao kao jedan mutacijski događaj, a alel se nalazi samo u populacijama bijele rase. Prevalencija *F2* 20210 G/A iznosi od 0 do 5 % u općoj populaciji (67), što je u skladu i s prevalencijom od 4 do 6 % dobivenom u istraživanjima populacije Hrvatske (89, 103).

Tablica 3. Pregled genskih promjena u *F2* povezanih s trombofilijom (prilagođeno prema (67, 92–94).

nazivlje HGVS	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida**	**zamjena AK**	**ekson**
NM_000506.4:c.*97G>A	rs1799963	20210 G/A	/	3' UTR
NM_000506.5:c.1787G>T	rs387907201	1787 G/T	Arg596Leu	14
NM_000506.5:c.1787G>A	rs387907201	1787 G/A	Arg596Gln	14
NM_000506.5:c.1786C>T	rs1183827513	1786 C/T	Arg596Trp	14

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), AK – aminokiselina, / – nije primjenjivo, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*).

U literaturi je opisana povezanost genske promjene *F2* G20210A s IMU-om u pacijenata mlađih od 58 godina, bez obzira na etničku pripadnost (104), ali i s nastankom IMU-a u djece (68) i CSVT-a u neonatalnom razdoblju (105). Povezanost genske promjene *F2* G20210A s IMU-om u djece u Hrvatskoj do danas je ispitana i predstavljena u samo dva znanstvena rada u kojima nije utvrđena povezanost s nastankom AIMU-a, niti podtipova DAIMU-a i PAIMU-a (32, 34).

1.2.3. Fibrinogen

Fibrinogen je GP koji se sastoji od tri para polipeptidnih lanaca Aα (610 AK, Mr = 66,5 kDa), Bβ (461 AK, Mr = 52 kDa) i γ (411 AK, Mr = 46,5 kDa) i koji nakon *N*-glikozilacije Bβ- i γ-lanaca ima ukupnu Mr ~ 340 kDa (106). Kodiran je klasterom gena *FGA*, *FGB* i *FGG* ukupne duljine ~ 50 kb na dugom kraku kromosoma 4 (lokus 4q23-32). Transkripcija pojedinih lanaca odvija se nezavisno, ali je njihova regulacija međusobno povezana te se sinteza β-lanaca smatra ključnom za nastanak zrele molekule (107). *FGA* je veličine 7,6 kb, sastoji se od šest eksona, a nalazi se između *FGG* veličine 8,5 kb i organiziranoga u 10 eksona, te *FGB* veličine 8 kb i organiziranoga u osam eksona, od kojih se posljednji transkribira u suprotnom smjeru (108, 109). Translacijom *FGA*, *FGB* i *FGG* u hepatocitima nastaju redom prepro-Aα (644 AK), prepro-Bβ (491 AK) i prepro-γ (437 AK). Nakon kidanja signalnoga peptida i konačne obrade u endoplazmatskom retikulu, nastaju konačni oblici Aα- (610 AK), Bβ- (461 AK) i γ-lanaca (411 AK). Međutim, alternativnim prekrajanjem mRNA *FGG* može nastati γ'-lanac kojemu nedostaje vezno mjesto za GPIIb/IIIa i stoga ne može vezati trombocite, iako pokazuje veći afinitet za tkivni aktivator plazminogena (tPA) i FXIII, a prisutan je u 8 – 15 % cirkulirajućih molekula fibrinogena (110). Kombiniranjem Bβ-lanca s Aα-γ dimerom ili Aα-lanca s Bβ-γ dimerom nastaju trimeri, a po dva trimera se zatim spajaju svojim N-krajevima kako bi formirali heksamer pomoću 29 disulfidnih veza, nužnih za izlučivanje fibrinogena iz hepatocita. Konačna molekula fibrinogena sastoji se od dvije distalne globularne D regije od četiri domene i jedne središnje globularne E regije od sedam domena (106).

Fibrinogen je jedan od proteina akutne faze čija koncentracija u plazmi iznosi od 1,5 do 4,2 g/L, a koncentracija se deseterostruko povećava kao odgovor na ozljedu ili upalu (106, 108). Pretvorba fibrinogena u fibrin započinje kidanjem malih fibrinopeptida A i B s N-terminalnih krajeva Aα- i Bβ-lanaca na položajima Arg16-Gly17, odnosno Arg14-Gly15, pomoću trombina prilikom čega nastaju fibrinski monomeri koji imaju dostupna četiri vezna mjesta za C-terminalni dio D regije iz drugih fibrinskih monomera, što omogućuje spontano sastavljanje fibrinskih oligomera i daljnje produljenje u dvolančane protofibrile (108). Lateralnom i longitudinalnom agregacijom protofibrila nastaje trodimenzionalna mreža koja čini ugrušak, a kovalentnim umrežavanjem posredovanim FXIIIa postiže se stabilizacija fibrinskoga polimera (106).

Povišene koncentracije fibrinogena predstavljaju rizični čimbenik za arterijsku i vensku trombozu jer utječu na strukturu fibrinskoga ugruška te se povezuju s pojavom

kardiovaskularnih bolesti, uključujući IMU (111–113). Genske varijacije *FGA*, *FGB* i *FGG* uključuju brojne mutacije i polimorfizme koje mogu utjecati na koncentraciju, strukturu i funkciju fibrinogena. Tablica 4. prikazuje polimorfizme promotorske regije *FGB* (lokus 4q31.3) koji se spominju u dostupnoj literaturi, a čija prisutnost može utjecati na vezanje nuklearnih transkripcijskih čimbenika (113–115).

Tablica 4. Pregled genskih polimorfizama u promotorskoj regiji *FGB* (prilagođeno prema (92–94, 114, 115).

nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida
NM_001184741.1:c.-1428G>A	rs1800789	-1420 G/A
NM_001184741.1:c.-862G>A	rs1800791	-854 G/A
NM_001184741.1:c.-463G>A	rs1800790	-455 G/A
NM_001184741.1:c.-257C>T	rs1800788	-249 C/T
NM_001184741.1:c.-156C>T	rs1800787	-148 C/T

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*).

Najčešće je ispitivan polimorfizam *FGB* -455 G/A, koji potiče vezanje nuklearnih čimbenika na promotor *FGB* i rezultira povećanjem njegove transkripcije. Kako se sinteza β-lanaca smatra korakom koji ograničava brzinu proizvodnje fibrinogena, povećanje transkripcije *FGB* povećat će koncentraciju fibrinogena u plazmi što može djelovati kao protrombotički rizični čimbenik za nastanak IMU-a (116, 117). Pojedinačna istraživanja uputila su na povezanost *FGB* -455 G/A s povećanim rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti i moždanoga udara, a nedavna meta-analiza utvrdila je povezanost alela *FGB* -455A s povećanim rizikom nastanka IMU-a u općoj azijskoj populaciji, ali ne i u bijelaca koji su bili zastupljeni u samo tri studije (118). Meta-analizom je utvrđena povezanost *FGB* -455 G/A sa smanjenim rizikom od venske tromboembolije među bijelom populacijom (119). Međutim, ne postoje istraživanja koja ispituju povezanost ovoga polimorfizma s CSVT-om u djece.

U istraživanjima na populaciji Hrvatske i Indije nije utvrđena povezanost polimorfizma *FGB* -455 G/A s nastankom AIMU-a u djece (32, 120).

1.2.4. Čimbenik zgrušavanja XIII

Čimbenik zgrušavanja XIII (FXIII) je GP ukupne veličine ~ 320 kDa koji se u cirkulaciji nalazi u obliku heterotetramera izgrađenoga od dvije A (Mr = 83 kDa) i dvije B (Mr = 80 kDa) podjedinice (121). Podjedinica A odgovorna je za protransglutaminaznu aktivnost, a sastoji se od 731 AK-a organizirane u pet domena: N-terminalnoga aktivacijskog

peptida (1 – 37 AK), tzv. β-sendviča, katalitičke jezgre i dvije β-bačve. Podjedinica B jest nosač i regulator podjedinice A, a sastoji se od 641 AK-a organizirane u 10 domena okarakteriziranih ponavljanjem kratkih konsenzusa (engl. *short consensus repeat*), tzv. *sushi* domena (122, 123). Koncentracija FXIII u plazmi iznosi ~ 90 nM (80), te su B podjedinice podjednako prisutne u obliku heterotetramera s A podjedinicama i u obliku slobodnoga homodimera, dok je u megakariocitima i trombocitima prisutan homodimer izgrađen samo od A podjedinica (123). Aktivacijski peptid sprječava pristup supstrata Cys314 u aktivnom središtu katalitičke jezgre A podjedinice pa je za aktivaciju FXIII nužno njegovo kidanje posredovano trombinom, visokim ili niskim koncentracijama kalcijevih iona u završnoj fazi reakcije zgrušavanja. Kidanje aktivacijskoga peptida uzrokuje disocijaciju B podjedinica i nastaje FXIIIa, homodimer izgrađen od A podjedinica (122). FXIIIa i FXIII izražen na površini aktiviranih trombocita, poprečno povezuju fibrinske lance kovalentnim vezama između glutaminskih i lizinskih ostataka γ- i α-lanaca fibrina, čime ugrušak postaje otporniji na fibrinolizu, a istovremeno umrežuje i inhibitore fibrinolize, poput inhibitor plazmina (123, 124). Također, FXIII ima važnu ulogu u zacjeljivanju rana i popravljanju tkiva umrežavanjem proteina izvanstaničnoga matriksa i poticanjem stanične signalizacije u leukocitima i endotelnim stanicama, što poboljšava pokretljivost, proliferaciju i preživljavanje stanica, te doprinosi imunološkim procesima i angiogenezi (123).

Podjedinica A FXIII kodirana je genom *F13A1* koji se nalazi na 6. kromosomu (lokus 6p25.1), veličine je 160 kb, a sastoji se od 15 eksona i 14 introna. Ekson 1 sadrži nekodirajuću regiju, aktivacijski peptid kodiran je eksonom 2, aktivno mjesto koje sadrži Cys314 kodirano je eksonom 7, a mjesto kidanja trombinom, između Lys513 i Ser514, kodirano je eksonom 12. B podjedinicu FXIII kodira gen *F13B* koji se nalazi na 1. kromosomu (1q31.3), veličine je 28 kb, a sastoji se od 12 eksona i 11 introna, što uključuje i 30 slijedova sličnih TATA slogu te 17 ponavljanja CpG dinukleotida (122).

Genske varijacije *F13A1* i *F13B* uključuju brojne mutacije i polimorfizme. Opisane su mutacije *F13A1* u osoba s izraženim manjkom ili potpunim nedostatkom FXIII. Polimorfizmi koji dovode do zamjene AK-a pa potencijalno mogu biti povezani s trombofilijom, opisani su u Tablici 5. (122). *F13A1* Val34Leu je najčešći polimorfizam koji se nalazi samo tri aminokiseline uzvodno od mjesta kidanja aktivacijskoga peptida trombinom. Prisutnost alela *F13A1* Leu34 uzrokuje bržu aktivaciju FXIII i moguće neučinkovito umrežavanje fibrina, ali i intenzivniju ugradnju inhibitora fibrinolize u ugrušak (125, 126). Dokazan je i utjecaj polimorfizma na strukturu fibrinskoga ugruška ovisno o koncentraciji fibrinogena u plazmi: homozigoti za alel Leu34 u slučaju povišene koncentracije fibrinogena u plazmi imaju

fibrinska vlakna koja su gušća, poroznija i podložnija fibrinolizi, dok u slučaju snižene koncentracije fibrinogena, nastaju tanja, gušće pakirana i manje porozna fibrinska vlakna (126). Polimorfizam *F13A1* Val34Leu čest je među Indijancima (51,2 %), bijelcima (44,3 %), crncima (28,9 %) i bijelim Europljanima (~ 25 %), dok se među Azijatima pojavljuje rjeđe (2,5%) (122, 127).

Tablica 5. Pregled polimorfizama *F13A1* i *F13B* koji dovode do zamjene AK-a (prilagođeno prema (92–94, 122).

nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida	zamjena AK*	domena	ekson
polimorfizmi *F13A1*					
NM_000129.4:c.103G>T	rs5985	103 G/T	Val35Leu (Val34Leu)	aktivacijski peptid	2
NM_000129.4:c.614A>T	rs3024477	614 A/T	Tyr205Phe (Tyr204Phe)	katalitička jezgra	5
NM_000129.4:c.1694C>T	rs5982	1694 C/T	Pro565Leu (Pro564Leu)	β-bačva 1	12
NM_000129.4:c.1951G>A	rs5987	1951 G/A	Val651Ile (Val650Ile)	β-sendvič	14
NM_000129.4:c.1954G>C	rs5988	1954 G/C	Glu652Gln (Glu651Gln)	β-bačva 2	14
polimorfizmi *F13B*					
NM_001994.3:c.344G>A	rs6003	344 G/A	His115Arg (His95Arg)	sushi 2	3
NM_001994.3:c.1952+144C>T	rs12134960	29756 G/C	alternativno prekrajanje	3' UTR	intron K

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.
HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*).

Istraživanja uglavnom nisu utvrdila povezanost *F13A1* Val34Leu s AIMU u odraslih, osim jedne studije u Makedoniji (128). Nedavno objavljen sistematski pregled i meta-analiza, koja je uključila 4 studije s ukupno 358 djece s AIMU-om i 451 kontrolnoga ispitanika, od kojih je jedna iz Hrvatske, nije pokazala povezanost *F13A1* Val34Leu s AIMU-om u djece (129), iako je u hrvatskom istraživanju pokazan umjereno povećan rizik nastanka DAIMU-a u nositelja najmanje jednoga alela *F13A1* Leu34 (32). Istraživanja povezanosti ovoga polimorfizma s CSVT-om u djece do danas nisu objavljena.

1.2.5. Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1)

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) je jednolančani GP koji pripada superporodici inhibitora serinskih proteaza (tzv. serpin). Zbog heterogenosti N-terminalnog dijela, sastoji se od 379 ili 381 AK-a i signalnoga peptida od 23 AK, s približnom Mr od 45 kDa (130). Reakcijsko središte čine AK-i Arg346 i Met347, dok je *N*-glikozilacija moguća na tri položaja: Asn209, Asn265 i Asn329 (130).

U uobičajenim uvjetima u plazmi se nalaze niske koncentracije PAI-1 (~ 5 – 20 ng/mL), ali se ta koncentracija može brzo mijenjati kao odgovor na podražaje, dok se 90 % ukupnoga PAI-1 prisutnoga u cirkulaciji nalazi u trombocitima (131). PAI-1 regulira fibrinolizu ograničavajući nastanak plazmina inhibicijom tPA i urokinaznoga aktivatora plazminogena (uPA). Brojne studije pokazale su kako povećane koncentracije PAI-1 u plazmi smanjuju učinkovitost trombolitičke terapije (130) te povećavaju rizik od nastanka vaskularne tromboze i povezanih bolesti (hipertenzije, pretilosti, dijabetesa, inzulinske rezistencije, ishemijske bolesti srca, infarkta miokarda, IMU i duboke venske tromboze) (102, 131). Uloga PAI-1 u IMU-u nije u potpunosti razjašnjena. PAI-1 prisutan u cirkulaciji može povećati stvaranje tromba nakon vaskularne ozljede, dok PAI-1 izražen u stanicama mozga može imati zaštitnu ulogu ublažavanjem učinka tPA i neuronske apoptoze (131).

Gen za PAI-1, *SERPINE1*, nalazi se na 7. kromosomu (lokus 7q22.1), duljine je ~ 12 kb, a sastoji se od 9 eksona (102, 132). Tablica 6. prikazuje 11 najčešće analiziranih polimorfizama *SERPINE1* (133), od kojih je najčešće analiziran insercijsko-delecijski polimorfizam (I/D) u promotorskoj regiji gena rs1799889, u literaturi često nazivan i PAI-1 4G/5G. U slučaju alela 4G nalaze četiri gvanozina, a u slučaju alela 5G pet gvanozina na položaju 675 bp uzvodno od početka transkripcije *SERPINE1*. Oba alela imaju vezno mjesto za aktivator transkripcije, ali alel 5G ima i dodatno vezno mjesto za represor transkripcije. Iz toga razloga alel 4G povezuje se s povišenim koncentracijama PAI-1 u plazmi, a utjecaj se jače odražava kod homozigota za ovu deleciju. Podaci o učinku ovoga polimorfizma na pojavu tromboze i IMU-a su kontradiktorni te se smatra da su razlike u izražaju gena između nositelja alela 4G i 5G očitije u prisutnosti drugih čimbenika (okoliša i/ili bolesti) kod kojih dolazi do povećanja koncentracije PAI-1 (102). Učestalost homozigotnih genotipova PAI-1 4G4G i 5G5G u općoj populaciji je razmjerno velika, a u Hrvatskoj iznosi redom 16 i 32 % (89).

Tablica 6. Pregled polimorfizama *SERPINE1* (prilagođeno prema (92–94, 133).

nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida*	zamjena AK	dio gena
NM_000602.4:c.-989A>G	rs2227631	-989 A/G (-844 A/G)	/	promotor (5' UTR)
NM_000602.5:c.-820G[(4_5)]	rs1799889	-820 4G/5G (-675 4G/5G)	I/D	promotor (5' UTR)
NM_000602.5:c.43G>A	rs6092	43 G/A	Ala15Thr	ekson 2
NM_000602.4:c.271+194C>T	rs2227708	194 C/T	/	intron 2
n. d.	rs2226662	A/C, A/G ili A/T	/	intron 3
NM_000602.4:c.506-451G>A	rs2227666	G/A	/	intron 3
n. d.	rs2226668	G/A	/	intron 3
n. d.	rs2226672	G/C ili G/T	/	intron 4
NM_000602.4:c.701-340G>A	rs2227683	G/A	/	intron 4
NM_000602.4:c.1088-106A>G	rs2227694	A/G ili A/T	/	intron 7
NM_000602.5:c.*722T>G	rs7242	722 T/G (11061 T/G, 11053 T/G)	/	ekson 9 (3' UTR)

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazvilje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina, I/D – insercijsko-delecijski polimorfizam, / – nije primjenjivo, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*).

Povezanost PAI-1 I/D s IMU-om ispitana je u više studija čiji su rezultati sažeti u nedavno objavljenoj meta-analizi, koja je uključila 44 studije i utvrdila povezanost PAI-1 I/D s povećanim rizikom od IMU-a u općoj azijskoj i miješanoj populaciji (134). Međutim, povezanost PAI-1 I/D s IMU-om u djece sažeta je u odvojenom sistematskom pregledu i meta-analizi, uključuje samo osam studija među kojima je i jedino istraživanje populacije Hrvatske (32), ali nije utvrđena povezanost PAI-1 i/D s AIMU-om u djece (129). Ovi rezultati naglašavaju razlike u genetičkoj pozadini IMU-a između djece i odraslih. Što se tiče CSVT-a u djece, do danas je objavljen samo prikaz dva slučaja od kojih je u jednom utvrđen genotip PAI-1 4G5G (135).

1.3. Promjene u genima za glikoproteine trombocitne membrane

Trombociti imaju značajnu ulogu u održavanju hemostaze putem interakcije s krvnim žilama, fibrinogenom i VWF. Interakciju omogućuju različiti glikoproteini (GP) koji su po svojoj funkciji receptori trombocitne membrane, a među kojima su GPIb/IX/V, GPVI, receptori aktivirani proteazom, receptori za adenozin-difosfat, integrini i drugi. Integrini su heterodimerni transmembranski GP-i sastavljeni od dvije podjedinice (α i β). Postoji pet vrsta α podjedinica (α2, αIIb, αV, α5, α6) i dvije vrste β podjedinica (β1 i β3) koje tvore sljedeće trombocitne integrine: αIIbβ3 (GPIIb/IIIa, receptor fibrinogena), αVβ3 (receptor vitronektina), α2β1 (GPIa/IIa, receptor kolagena), α5β1 (receptor fibronektina) i α6β1 (receptor laminina) (136). Promjene u strukturi i funkciji proteina trombocitne membrane mogu dovesti do promjena u staničnoj signalizaciji te posljedično promijeniti uobičajenu funkciju trombocita, uključujući adheziju i agregaciju trombocita, i tako doprinijeti patofiziološkim procesima kao što su tromboza, ateroskleroza, sepsa i moždani udar (137–141).

Ponovna uspostava protoka krvi primarni je cilj u liječenju IMU-a. Unatoč postizanju rane reperfuzije začepljenih velikih intrakranijalnih arterija u većini oboljelih, moguće je razvijanje progresivnog-a moždanog udara u procesu koji se naziva reperfuzijska ozljeda, što je reproducirano u modelu prolazne okluzije srednje cerebralne arterije u glodavaca. Osim toga, mehanizmi adhezije i aktivacije trombocita doprinose rastu infarkta jer utječu na upalne procese, a ne samo na stvaranje tromba. Ova zapažanja dovela su do hipoteze da limfociti T djeluju u interakciji s trombocitima te da IMU predstavlja trombo-upalni poremećaj (138, 142, 143). Važna kontrolna točka koja određuje trombotičke i proupalne procese te doprinosi sekundarnom rastu IMU-a jest aktivacija trombocita posredovana GPIb i GPVI, ali ne i agregacija trombocita posredovana GPIIb/IIIa. Osim toga, istraživanja su isključila stvaranje ugruška kao središnjega procesa u pozadini trombo-upale i progresije ishemijskoga moždanog udara jer se pokazalo da interferiranje u agregaciju trombocita ovisnu o GPIIb/IIIa ne poboljšava ishod nakon akutne ishemije mozga, već povećava osjetljivost na intrakranijalno krvarenje (138, 143).

Uz pomoć asocijacijskih studija cijeloga genoma prepoznate su genske varijante koje imaju male pojedinačne učinke na funkciju trombocita, ali kumulativnim učinkom mogu modificirati funkciju trombocita promjenom ekspresije ili aktivnosti ključnih trombocitnih receptora, utjecajem na nizvodne efektorske signalne putove u koje su ti receptori uključeni, što posljedično može dovesti do hiperreaktivnosti trombocita i povećati rizik trombotičkih

poremećaja (144). Molekularno razumijevanje funkcije trombocita u hemostazi i trombozi, uključujući još nedovoljno istražene polimorfizme u genima za trombocitne glikoproteinske receptore i adhezijsku molekulu P-selektin, važno je za razvoj boljih antitrombotičkih strategija za sprječavanje ili liječenje IMU-a.

1.3.1. Kompleks GPIa/IIa

Kompleks GPIa/IIa je heterodimer koji se sastoji od integrinskih podjedinica α2 i β1, zbog čega se naziva i integrin α2β1, a primarno je izražen u epitelnim stanicama, trombocitima/megakariocitima i fibroblastima. Na trombocitima je izražen u relativno malom broju kopija, od 2000 do 4000 po trombocitu. Podjedinica α2 sadrži visoko očuvanu, izvanstaničnu domenu I koja posreduje specifično vezanje liganada. Domena I se sastoji se od približno 220 AK, te je homologna s domenom A VWF-a, proteinom matriksa hrskavice, podtipovima kolagena i komponentama sustava komplementa. Domena I sadrži očuvano mjesto vezanja kationa, odnosno adhezijsko mjesto ovisno o metalnim ionima s preferencijom vezanja Mg^{2+}/Mn^{2+} što je je ključno za vezanje kolagena. Ovaj kompleks ima visok afinitet za kolagen tipa I, ali može vezati i druge fibrilarne izoforme kolagena kao i nekolagenske ligande poput laminina, proteoglikana i infektivnih organizama. Kompleks GPIa/IIa ima ulogu u adheziji i aktivaciji trombocita jer je nužan za čvrsto vezanje trombocita za kolagen u subendotelu nakon vaskularne ozljede. Osim toga, ima ulogu u regulaciji stanične migracije, proliferacije i preživljavanja jer citoplazmatski dio podjedinice α2 posreduje u aktivaciji puta p38 mitogenom aktivirane proteinske kinaze (145). Interindividualne varijacije u ekspresiji GPIa/IIa u populaciji su značajne (do 10 puta) te je dokazana izravna povezanost gustoće ovih receptora sa sposobnošću vezanja na kolagen tipa I. Ove razlike u ekspresiji GPIa/IIa izravna su posljedica genskih varijacija (145).

Podjedinica α2 GPIa/IIa kodirana je genom *ITGA2* koji se nalazi na kratkom kraku 5. kromosoma (lokus 5q11.2), duljine je ~ 105 kb te se sastoji od 30 eksona, dok je podjedinica β1 kodirana genom *ITGB1* na 10. kromosomu (lokus 10p11.22) te se sastoji od 18 eksona (146). U literaturi su najviše opisane varijacije *ITGA2* u kontekstu hemostaze i tromboze te vezanih bolesti (Tablica 7.) (145, 147–149). Nositelji alela *ITGA2* 807T/873A i alela koji je temelj jednoga ljudskog trombocitnog aloantigena (HPA) HPA-5b pokazuju visoke razine ekspresije GPIa/IIa na površini trombocita, dok nositelji alela 807C/873G pokazuju nižu ekspresiju GPIa/IIa (145, 150). Polimorfizmi *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A su međusobno povezani, a iako ne dovode do zamjene AK, mogu utjecati na stabilnost mRNA i posljedično

na ekspresiju GPIa/IIa (148, 151). Osim toga, pokazano je da HPA-5 utječe na smanjenje adhezije trombocita na dekorin, ali ne i na kolagen, što je prvi dokaz funkcionalnoga učinka alela HPA-5b (152).

Učestalost alela HPA-5b iznosi 20 % u bijelaca, 18 % u Afrikanaca te samo 0,4 % u Azijata (150), dok je za zdravu populaciju Hrvatske objavljena učestalost od 20,1 % (153).

Tablica 7. Pregled najčešće opisanih genskih promjena u *ITGA2* (92–94, 145, 148, 150, 154).

drugi naziv	nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida*	zamjena AK*
HPA-5 a/b	NM_002203.4:c.1600G>A	rs1801106	1600 G/A (1648 G/A)	Glu534Lys (Glu505Lys)
HPA-13 bw	NM_002203.4:c.2483C>T	rs79932422	2483 C/T (2531 C/T)	Met828Thr (Met799Thr)
HPA-18 bw	NM_002203.4:c.2235G>T	rs267606593	2235 G/T	Gln745His (Gln716His)
HPA-25 bw	NM_002203.4:c.3347C>T	rs771035051	3347 C/T	Thr1116Met (Thr1087Met)
/	NM_002203.4:c.759C>T	rs1126643	759 C/T (807 C/T)	Phe253Phe (Phe224Phe)
/	NM_002203.4:c.825G>A	rs1062535	825 G/A (873 G/A)	Thr275Thr (Thr246Thr)

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida i AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.
HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina, HPA – ljudski trombocitni aloantigen (engl. *human platelet alloantigen*), w – HPA za koje su dokazana antitijela samo protiv jednoga od dva antigena, / – nije primjenjivo.

Istraživanja povezanosti *ITGA2* 807 C/T s IMU-om sažeta su u nekoliko meta-analiza (155, 156), te je pronađena povezanost između alela 807T i rizika od IMU-a u cjelokupnoj i azijskoj populaciji, ali ne i u bijeloj populaciji (77, 157), a dodatno je utvrđen i zaštitni učinak genotipa CC (77). Najnovija meta-analiza u odvojenoj etničkoj skupini potvrdila je povezanost alela 807T s pojavom IMU-a u populacijama Han i južne Kine (158). Genotip *ITGA2* 873 AA pokazao je značajnu povezanost s pojavom IMU-a u osmogodišnjoj prospektivnoj skupini kineskih pacijenata s dijabetesom tipa 2 (159), dok meta-analiza i u novija studija nije pokazala povezanost s nastankom IMU-a (160, 161). Uloga HPA-5 u IMU do danas je oskudno ispitana. Studija rađena na uzorcima 216 tuniških bolesnika s IMU-om pokazuje povezanost s povećanim rizikom za nastanak bolesti (147). Međutim, studija na 218

njemačkih bolesnika kao ni nedavno objavljena meta-analiza koja je objedinila rezultate tri studije nisu utvrdile ovu povezanost (77, 162).

Uloga HPA-5 u IMU u djece do danas je ispitana u dva istraživanja u populaciji Hrvatske, ali povezanost s pojavom bolesti nije utvrđena (32, 34). U jedinoj studiji na sjevernoameričkoj populaciji također nije utvrđena povezanost *ITGA2* 873 G/A s pojavom IMU-a u djece (163), dok povezanost *ITGA2* 807C/T s pojavom IMU-a u djece do danas nije ispitana.

1.3.2. Kompleks GPIb/IX/V

Kompleks GPIb/IX/V prisutan je u 25 000 – 50 000 kopija po trombocitu, a sastoji se od četiri polipeptidnih jedinica: GPIbα disulfidno povezanoga s GPIbβ te nekovalentno kompleksiranog s GPIX i GPV u omjeru 2:2:2:1 (164). Ključan je sudionik hemostaze jer započinje adheziju trombocita na imobilizirani VWF na stijenci krvnih žila pri uvjetima povećane brzine protoka arterijske krvi, što se događa prilikom vaskularne ozljede, ali i patološkim stanjima poput ateroskleroze, srčanoga i moždanoga udara. Aktivacija GPIa/IX/V dovodi do aktivacije GPIIb/IIIa koji veže VWF ili fibrinogen i doprinosi adheziji, širenju i agregaciji trombocita (164). Također, GPIb/IX/V važan je u regrutaciji leukocita na mjesto vaskularne ozljede, te u trombinom posredovanoj aktivaciji trombocita i koagulaciji (148).

Podjedinica GPIbα veličine je ~ 135 kDa, a sastoji se od 610 AK-a organiziranih u N-terminalnu globularnu domenu (~ 40 kDa), sijalomucinsku jezgru, tandemsku Cys sekvenciju koja tvori disulfidne veze s GPIbβ, transmembransku domenu i citoplazmatski rep na C-kraju koji sadrži vezna mjesta za unutarstanične proteine (164, 165). N-terminalna globularna domena GPIbα (His1 – Glu282) sadrži četiri važne strukturne domene: N-kraj (AK 1 – 35), tandemska ponavljanja bogata leucinom (~ 24 ostatka, AK-i 36 – 200), C-kraj s disulfidnom omčom (AK-i 201 – 268) i anionski niz bogat sulfatiranim tirozinom (AK-i 269 – 282). Za interakciju GPIbα s domenom A1 VWF ključni su AK-i 60 – 128. Povećanje brzine protoka krvi na visoke fiziološke ili patološke razine uzrokuje vezanje VWF-a i promjenu konformacije C-kraja s disulfidnom omčom (165).

GPIbα djeluje kao multifunkcionalni receptor jer uz VWF veže i endotelni P-selektin što omogućuje kotrljanje i vezanje trombocita za oštećeni endotel, a djeluje i kao receptor za trombin, faktore zgrušavanja XI/XIIa, kininogen visoke molekularne težine i druge ligande (166). Stoga se koagulacija i upalni odgovori koji uključuju aktivirane trombocite i leukocite mogu koordinirati interakcijama koje uključuju GPIbα i adhezivne ili prokoagulantne ligande

ili protureceptore. GPIbα bi mogao predstavljati zajednički regulacijski receptor koji regulira vremenski ovisan prijelaz od početne adhezije trombocita, aktivacije i agregacije, do koagulacije i upale kao odgovora na vaskularnu ozljedu ili bolest, primjerice, vezanjem na VWF, trombin ili P-selektin (165).

Gen *GP1BA* nalazi se na 17. kromosomu (lokus 17p13.2), duljine je ~ 3 kb te se sastoji od 2 eksona. Genske varijacije *GP1BA* odgovorne su za većinu varijacija GPIb/IX/V, a najčešće istraživane su sažete u Tablici 8. (77).

Tablica 8. Pregled najčešće opisanih genskih promjena u *GP1BA* (77, 92–94).

drugi naziv	**nazivlje HGVS**	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida***	**učinak**
HPA-2 a/b	NM_000173.7:c.482C>T	rs6065	482 C/T (1018 C/T)	Thr161Met
Kozak	NM_000173.7:c.-5T>C	rs2243093	(-5) T/C	5' UTR
VNTR A/B/C/D/E	NM_000173.7:c.1321_1359del NM_000173.7:c.1282_1359del**	rs1259394995 rs869060239**	I/D 39 ili 78 bp	I/D 13 ili 26 AK

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.

** Za *GP1BA* VNTR navedeni su dostupni podaci za dva alela.

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, HPA – ljudski trombocitni aloantigen (engl. *human platelet alloantigen*), UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*), VNTR – varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*), I/D – insercijsko-delecijski polimorfizam, AK – aminokiselina.

U nizu Kozak na položaju -5 identificiran je T/C polimorfizam *GP1BA* (148). Kozakov niz predstavlja obrazac prema kojemu svim funkcionalnim AUG tripletima prethodi purin na poziciji -3 i nakon AUG na poziciji +1, a prikazuje se sljedećom oznakom: (GCC)GCCAGCCA UGG. Ovaj je niz neophodan za prepoznavanje ribosoma i predstavlja početno mjesto translacije proteina (167). Prisutnost alela (-5)C povećava površinsku ekspresiju kompleksa GPIb/IX/V, što bi moglo povećati adheziju trombocita i predstavljati rizik od tromboze i vezanih kardiovaskularnih i ishemijskih cerebrovaskularnih bolesti (148, 168).

Polimorfizam *GPIBA* koji je karakteriziran varijabilnim brojem tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) karakteriziran je različitim brojem ponavljanja sekvencije od 39 parova baza u genu, odnosno sekvencije od 13 AK-a u zrelom proteinu. Aleli su označeni slovima A (četiri ponavljanja), B (tri ponavljanja),

C (dva ponavljanja), D (jedno ponavljanje) i E (delecija), od kojih su aleli A i E izuzetno rijetki (169). Smatra se da kod nositelja dugih alela povećanje izvanstaničnoga dijela GP1b dovodi do povećanja veznoga mjesta za VWF što može biti povezano s povećanim rizikom od nastanka tromboze (170). Genotip VNTR CD u odnosu na CC može utjecati na stvaranje trombocitnog ugruška pod povećanom brzinom protoka arterijske krvi (171).

Dokazano je da polimorfizam HPA-2 ne utječe na vezanje trombina, ali utječe na konformaciju bočne regije N-kraja i prvo ponavljanje bogato leucinom u GPIbα što posljedično utječe na vezanje na VWF. Također je povezan s većim afinitetom za vezanje na VWF potaknutim ristocetinom ili botrocetinom (172). Učestalost alela HPA-2b iznosi 14 % u bijelaca, 29 % u Afrikanaca te 5 % u Azijata (150), dok je za zdravu populaciju Hrvatske objavljena učestalost od 21,0 % (153).

Nedavno objavljena opsežna meta-analiza procijenila je i ulogu polimorfizama *GP1BA* u IMU-u u odraslih (77). Iako su pojedinačne novije studije (173), kao i ranije meta-analize (174), utvrdile povezanost HPA-2 s pojavom IMU-a, ova meta-analiza koja je uključila 13 radova, nije potvrdila takve nalaze niti u miješanoj populaciji niti u odvojenim populacijama bijelaca i Azijata. Nadalje, analizom 10 radova prikazano je da genotip *GP1BA* (-5) CC povećava rizik nastanka IMU-a u miješanoj populaciji i u Azijata, te da nositelji genotipa TT i alela T imaju manji rizik za razvoj bolesti. Nakon testiranja osjetljivosti nisu potvrđeni ovi rezultati. Konačno, analizom 9 radova utvrđena je povezanost alela *GP1BA* VNTR B s pojavom IMU-a u miješanoj populaciji i u bijelaca, ali ne i u Azijata.

Uloga HPA-2 u IMU-u u dječjoj populaciji do danas je ispitana samo u tri istraživanja, dva hrvatska (32, 34) i jedno sjevernoameričko (163), ali niti jednim nije utvrđena povezanost s pojavom bolesti. Povezanost *GP1AB* (-5) T/C i VNTR s pojavom IMU-a u djece do danas nije ispitana.

1.3.3. Kompleks GPIIb/IIIa

Kompleks GPIIb/IIIa sastoji se od integrinskih podjedinica GPIIb ili αIIb i GPIIIa ili β3, zbog čega se naziva i integrin αIIbβ3. Najzastupljeniji je receptor trombocitne membrane gdje se nalazi u broju od 50 000 do 80 000 kopija po trombocitu, a dodatni rezervoar nalazi se u α-granulama trombocita. Podjedinica GPIIb sintetizira se kao pro-GPIIb, a sastoji se od teškoga i lakoga lanca povezanih disulfidnim vezama, dok se podjedinica GPIIIa sintetizira kao jedan zreli lanac. U endoplazmatskom retikulu dolazi do povezivanja podjedinica i dodavanja N-vezanih oligosaharida s visokim udjelom manoze iz kojih u Golgijevom aparatu

nastaju kompleksni oligosaharidi, a zatim proteolitičkim kidanjem pro-GPIIb nastaje konačni zreli kompleks s disulfidno povezanim lakim i teškim lancem koji se transportira do površine stanice ili pohranjuje u α-granulama (175). N-terminalne izvanstanične regije obje podjedinice tvore globularnu domenu koja čini mjesto vezanja liganda (140).

Glavna uloga ovoga receptora u hemostazi jest posredovanje u adheziji trombocita na izvanstanični matriks vezanjem na glavni ligand fibrinogen, ali i VWF, fibronektin i vitronektin, odnosno, ligande koje karakterizira aminokiselinski slijed Arg-Gly-Asp (RGD). Osim toga, GPIIb/IIIa veže i slijed Lys-Gln-AlaGly-Asp-Val (KQAGDV) na C-kraju γ-lanca fibrinogena zbog čega je ključan i za agregaciju trombocita te stvaranje ugruška premošćivanjem susjednih trombocita pomoću fibrinogena (138, 148).

Gen *ITGA2B* kodira za podjedinicu GPIIb (lokus 17q21.31), duljine je oko 17 kb i sastoji se od 30 eksona, dok *ITGB3* kodira za podjedinicu GPIIIa (lokus 17q21.32), duljine je oko 46 kb te se sastoji od 15 eksona. Oba gena smještena su na 17. kromosomu i sadrže više polimorfizama (Tablica 9.) (140).

Od prisutnih genskih varijacija najčešće je istraživan polimorfizam HPA-1 a/b (varijante Pl^{A1} i Pl^{A2}) u 2. eksonu *ITGB3*, a uzrokuje konformacijsku promjenu u disulfidnoj omči na N-kraju odgovorne za vezanje liganada i tako usmjerava kompleks GPIIb/IIIa prema aktivnom stanju (176). Prisutnost HPA-1b uzrokuje pojačan agregacijski odgovor *in vitro* potaknut adenozin-difosfatom, adrenalinom i kolagenom, te povećanu osjetljivost na antiagregacijske lijekove u odnosu na HPA-1a (177, 178), a povezuje se i s povećanjem ekspresije P-selektina na površini trombocita što također može ukazati na trombogeni potencijal ovoga polimorfizma (148). Učestalost alela HPA-1b iznosi 26 % u populaciji bijele rase, 10 % u Afrikanaca, dok se u azijskoj populaciji nalazi rijetko (140), a u Hrvatskoj učestalost iznosi 27,4 % (153).

Polimorfizam HPA-3 a/b (varijante Bak^a i Bak^b) nalazi se u 26. eksonu *ITGA2B* u blizini C-kraja teškog lanca GPIIb uz regiju koja može biti uključena u adheziju trombocita na kolagen. Međutim, nije zabilježen učinak na agregaciju trombocita, gustoću receptora ili vezanje fibrinogena na trombocite potaknut adenozin-difosfatom (140). Također, za nositelje HPA-3b nije dokazan pojačan agregacijski odgovor trombocita *in vitro* potaknut adrenalinom i kolagenom u odnosu na nositelje HPA-3a, za razliku od učinka HPA-1 a/b (178). Učestalost alela HPA-3b iznosi 48 % u bijelaca, 32 % u Afrikanaca te 40,5 % u Azijata, dok je u Hrvatskoj zabilježena veća učestalost koja iznosi 68,0 % (150, 153).

Meta-analize sažele su objavljene radove koji su ispitivali povezanost HPA-1 i HPA-3 s pojavom IMU-a u odraslih. U meta-analizi iz 2014. godine dokazano je da prisutnost HPA-

1b povećava rizik za nastanak bolesti, dok u meta-analizi iz 2017. godine to nije potvrđeno (77, 179). Prisutnost HPA-3b povećava rizik za IMU u Azijata, ali ne i u bijelaca (77).

Tablica 9. Pregled najčešće opisanih genskih promjena u genima za receptor GPIIb/IIIa (92–94, 150).

drugi nazivi	nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida*	zamjena AK*
polimorfizmi *ITGA2B*				
HPA-3 a/b Bak^{a} i Bak^{b}	NM_000419.3:c.2621T>G	rs5911	2621 T/G	Ile874Ser (Ile843Ser)
HPA-9 bw	NM_000419.5:c.2602G>A	rs74988902	2602 G/A	Val868Met (Val837Met)
HPA-20 bw	/	/	1949 C/T	Thr619Met
HPA-22 bw	/	/	585 A/C	Lys164Thr
HPA-24 bw	/	/	1508 G/A	Ser472Asn
HPA-27 bw	NM_000419.5:c.2614C>A	rs149468422	2614 C/A	Leu872Met (Leu841Met)
polimorfizmi *ITGB3*				
HPA-1 a/b Pl^{A1} i Pl^{A2}	NM_000212.2:c.176T>C	rs5918	176 C/T (1565 C/T)	Leu59Pro (Leu33Pro)
HPA-4 a/b	NM_000212.3:c.506G>A	rs5917	506 G/A	Arg169Gln (Arg143Gln)
HPA-6 bw	NM_000212.3:c.1544G>A	rs13306487	1544 G/A	Arg515Gln (Arg489Gln)
HPA-7 bw	NM_000212.3:c.1297C>G	rs121918448	1297 C/G	Pro433Ala (Pro407Ala)
HPA-8 bw	NM_000212.3:c.1984C>T	rs151219882	1984 C/T	Arg662Cys (Arg636Cys)
HPA-10 bw	NM_000212.3:c.263G>A	rs200358667	263 G/A	Arg62Gln
HPA-11 bw	/	/	1976 G/A	Arg633His
HPA-14 bw	/	/	1909 I/D AAG	Lys611 I/D
HPA-16 bw	/	/	497 C/T	Thr140Ile
HPA-17 bw	/	/	622 C/T	Thr195Met
HPA-19 bw	/	/	487 A/C	Lys137Gln
HPA-21 bw	NM_000212.3:c.1960G>A	rs70940817	1960 G/A	Glu654Lys (Glu628Lys)
HPA-23 bw	/	/	1942 C/T	Arg622Trp
HPA-26 bw	/	/	1818 G/T	Lys580Asn

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazvilje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida i AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina, HPA – ljudski trombocitni aloantigen (engl. *human platelet alloantigen*), w – HPA za koje su dokazana antitijela samo protiv jednog od dva antigena, I/D – insercijsko-delecijski polimorfizam, / – nije dostupno.

Uloga HPA-1 i -3 u IMU-u u djece do danas je ispitana u nekoliko geografski ograničenih istraživanja na manjem broju slučajeva s oprečnim rezultatima (32, 34, 120, 163, 180). U grčkom, sjevernoameričkom i starijem hrvatskom istraživanju nije utvrđena povezanost ovih polimorfizama s pojavom bolesti (34, 163, 180). Suprotno tome, sjevernoindijsko istraživanje sugerira da polimorfizam HPA-1 a/b može povećati rizik za nastanak IMU-a u djece (120). Također, rezultati novijega hrvatskog istraživanja na većem uzorku sugeriraju moguć zaštitni učinak alela HPA-3b za AIMU u djece, a daljnjom analizom povezanost je dokazana za PAIMU, ali ne i za DAIMU (32).

1.3.4. GPVI

GPVI je transmembranski GP ukupne Mr od 62 kDa, dok Mr proteinskog dijela sastavljenog od 319 AK-a i signalne sekvencije od 20 AK-a iznosi oko 34,8 kDa koji je eksprimiran na megakariocitima i trombocitima. Izvanstanična regija sastoji se od dvije disulfidno povezane domene slične imunoglobulinu s dva *N*-glikozilacijska mjesta i tzv. stabljike, mucinske regije bogate Ser-Thr s mnogim *O*-vezanim glikanima (181, 182). U transmembranskoj domeni građenoj od 19 aminokiselinkih ostataka, Arg252 povezuje GPVI solnim mostom s aspartatnim ostatkom u aktivacijskom tirozinskom motivu imunoreceptora (ITAM) koji se nalazi u transmembranskoj domeni γ-lanca Fc receptora. U citoplazmatskom repu, koji se sastoji od 51 aminokiselinskog ostatka, nalazi se domena bogata bazičnim AK-ima koja veže kalmodulin i domena bogata prolinom koja selektivno veže SH3 (engl. *Scr homology 3*) domenu triozin kinaza Fyn i Lyn iz porodice Src (181).

GPVI je na površini trombocita prisutan kao koreceptor u kompleksu s γ-lancem Fc receptora. U obliku dimera pokazuje visok afinitet vezanja za kolagen, čiji je glavni aktivirajući receptor, a osim kolagena aktiviraju ga konvulksin i peptid srodan kolagenu. Aktivaciju trombocita posredovanu GPVI pokreće vezanje liganada, što uzrokuje aktivaciju Fyn ili Lyn i posljedičnu tirozinsku fosforilaciju ITAM γ-lanca Fc receptora. GPVI je nužan za agregaciju trombocita tijekom protoka krvi jer zajedno s GPIa/IIa sinergistički sudjeluje u interakciji trombocita s kolagenom, ali i jer upravlja daljnjim signalnim odgovorima, a također sudjeluje u interakciji trombocita s fibrinom (182). Istraživanja su pokazala da deficijencija GPVI ne dovodi do većega poremećaja hemostaze, zbog čega se GPVI sve više istražuje kao potencijalna farmakološka meta u terapiji arterijske tromboze, uključujući moždani udar (142, 182).

GPVI kodiran je genom *GP6* na dugom kraku 19. kromosomu (lokus 19q13.42), ukupne je duljine oko 24,5 kb, a sastoji se od 8 eksona. Opisano je pet polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u *GP6* koji dovode do zamjene AK, a zajedno s dodatna dva SNP-a čine dva najčešća haplotipa *GP6*, a (tzv. SKTQH) i b (tzv. PEALN), s alelnim frekvencijama od 0,85, odnosno 0,13, dok su ostali aleli rijetki (Tablica 10.). Ovi haplotipovi pokazali su značajne razlike prilikom ispitivanja ekspresije trombocitnoga GPVI, funkcionalnih testova agregacije i aktivacije trombocita, stvaranja trombina, te adhezije trombocita na kolagen u modelu protoka pune krvi (183).

Tablica 10. Pregled polimorfizama *GP6* koji dovode do zamjene AK-a i tvore haplotip (92–94, 184).

nazivlje HGVS	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida***	**zamjena AK***	**regija**
NM_001083899.2:c.655C>T	rs1613662	655 C/T (13254 T/C)	Pro219Ser (Ser199Pro)	mucinska stabljika
NM_001083899.2:c.709G>A	rs1654416	709 G/A	Glu237Lys (Lys217Glu)	mucinska stabljika
NM_001083899.2:c.745G>A	rs2304167	745 G/A	Ala249Thr (Thr229Ala)	mucinska stabljika
NM_001083899.2:c.954T>A	rs1654413	954 T/A	Leu317Gln (Gln297Leu)	citoplazmatski rep
NM_001083899.2:c.968A>C	rs1671152	968 A/C	Asn322His (His302Asn)	citoplazmatski rep

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida i AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.
HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

Polimorfizam u 5. eksonu *GP6* 13254 T/C najviše je istražen, a dovodi do zamjene AK-a u izvanstaničnoj domeni GPVI prilikom čega se mijenja potencijalno *O*-glikozilacijsko mjesto što može utjecati na konformaciju GPVI i nizvodnu signalizaciju (183). Trombociti homozigotnih nositelja haplotipa b imali su nižu ekspresiju i očito smanjenu glikozilaciju GPVI u odnosu na trombocite homozigotnih nositelja haplotipa a, a sukladno tome je dokazana niža gustoća GPVI u osoba nositelja alela 13254C u *GP6* u odnosu na homozigotne nositelje alela T. Ovakvi rezultati upućuju da bi osobe homozigotne za niskofrekventni haplotip mogle biti osjetljivije na krvarenje nego na trombotičke događaje. Uz to, dokazano je i 12 dodatnih izoformi te značajne promjene u ekspresiji haplotipova *GP6* između ljudi različitog geografskoga i etničkoga porijekla (182–185).

GP6 13254 T/C do danas nije dovoljno istražen, a njegova uloga potencijalnoga rizičnog čimbenika za nastanak IMU-a do danas je ispitana samo u jednom radu ograničenom na pacijente s IMU-om kao posljedicom sindroma ljepljivih trombocita, što također može biti rizični čimbenik za razvoj IMU-a u djece, ali povezanost s pojavom bolesti nije utvrđena, iako nije provedena odvojena analiza ispitanika dječje dobi (186).

1.3.5. P-selektin

P-selektin je integralni membranski GP smješten u α-granulama trombocita i Weibel-Paladovim tjelešcima endotelnih stanica, a prisutan je i u plazmi u topljivom obliku. Najveći je od poznatih selektina s Mr od 140 kDa. Membranski P-selektin sastoji se od N-terminalne domene C-tipa, motiva poput epidermalnoga faktora rasta, niza od devet tandemskih ponavljanja, transmembranske domene i C-terminalnoga citoplazmatskog repa. Glavni ligand za P-selektin je receptor P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) konstitutivno izražen u gotovo svim leukocitima (187, 188).

Prema svojoj funkciji, P-selektin je adhezijska molekula odgovorna za inicijaciju kotrljanja leukocita i početne faze njihove adhezije na aktivirane trombocite i endotelne stanice tijekom tromboze i upale (188, 189). Nakon stimulacije trombocita lipoproteinom male gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL), kisikovim radikalima, trombinom citokinima ili drugim podražajima, P-selektin postaje izražen na površini trombocita iz kojih se brzo izlučuje te se smatra glavnim izvorom topljivoga oblika koji se nalazi u plazmi nakon trombotičkih događaja i koji može imati vlastitu fiziološku aktivnost, dok translokacija P-selektina iz Weibel-Paladovih tjelešaca na površinu endotelnih stanica ovisi o događajima vezanim uz citoplazmatski rep P-selektina (187, 188).

U koagulaciji, trombozi, upali i aterosklerozi sudjeluju i membranski i topljivi oblici P-selektina (188, 189). U trombozi koja nastaje ozljedom stijenke krvne žile dolazi do otpuštanja trombocitnih granula i povećanja topljivoga oblika P-selektina u cirkulaciji, ili zbog hipoksije ili upalnoga odgovora dolazi do izražaja adhezijskih receptora P-selektina na površini intaktnoga endotela (66). Dokazano je da bolesnici s IMU-om ili prolaznim ishemijskim napadajem imaju povećanu ekspresiju P-selektina u trombocitima i koncentraciju agregata trombocita i leukocita u krvi (190, 191).

P-selektin kodiran je genom *SELP* koji se nalazi na 1. kromosomu (lokus 1q24.2), duljine je > 50 kb i sadrži 17 eksona. U literaturi je opisano više polimorfizama u kodirajućoj regiji ovoga gena, od kojih pet uzrokuju zamjenu AK-a (Tablica 11.) (192, 193). Većina

dosadašnjih ispitivanja procijenila su kliničku važnost samo varijanti kodirajuće regije *SELP*, iako i varijante u nekodirajućoj regiji mogu imati štetan učinak na funkciju i izražaj P-selektina na trombocitima (194). Najviše je istražen *SELP* Thr715Pro za kojeg se smatra da utječe na brzinu transporta P-selektina unutar stanice, čime dolazi do smanjenoga izražaja na površini stanice i naposljetku do manjeg broja staničnih interakcija (195), a ispitivani su i polimorfizmi Val599Leu, Asn562Asp i Ser290Asn. *SELP* polimorfizmi pokazali su povezanost s nekoliko stadija tromboze i pridruženih bolesti (192, 193, 195–199).

Tablica 11. Pregled polimorfizama kodirajuće regije *SELP* (prilagođeno prema (92–94, 192, 193).

nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	zamjena nukleotida	zamjena AK*	dio gena
NM_003005.4:c.384C>T	rs147922476	384 C/T	Asn128Asn (Asn87Asn)	ekson 3
NM_003005.4:c.417G>T	rs6129	417 G/A	Pro139Pro (Pro98Pro)	ekson 3
NM_003005.4:c.625G>A	rs6125	625 G/A	Val209Met (Val168Met)	ekson 5
NM_003005.4:c.992G>A	rs6131	929 G/A	Ser331Asn (Ser290Asn)	ekson 7
NM_003005.4:c.1794C>T	rs6135	1794 T/C	Cys598Cys (Cys557Cys)	ekson 11
NM_003005.3:c.1807G>A	rs6127	1807 A/G	Asn603Asp (Asn562Asp)	ekson 11
NM_003005.4:c.1812C>T	rs6132	1812 T/C	Asn604Asn (Asn563Asn)	ekson 11
NM_003005.3:c.1918G>T	rs6133	1918 G/T	Val640Leu (Leu599Val)	ekson 12
NM_003005.3:c.2266A>C	rs6136	2266 A/C	Thr756Pro (Thr715Pro)	ekson 13
NM_003005.4:c.2346G>A	rs6128	2346 G/A	Thr782Thr (Thr741Thr)	ekson 14

* S obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena AK-a prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi.
HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), AK – aminokiselina.

U malom broju radova je ispitan odnos najčešćih *SELP* polimorfizama i IMU-a u odraslih (191, 200–205), ali je u samo jednom radu pronađena povezanost *SELP* Val599Leu s većim rizikom nastanka IMU-a (202). Do danas ne postoje izvješća o ulozi ovih polimorfizama u IMU u djece.

1.4. Polimorfizmi gena koji kontroliraju intermedijarne rizične čimbenike

Uobičajeni intermedijarni rizični čimbenici za nastanak IMU-a u odraslih do danas su oskudno istraženi u IMU-u u djece. Ispitivanje uloge ovih čimbenika u dječjoj populaciji s IMU-om moglo bi doprinijeti boljem razumijevanju etiologije, jer je i u djece kao i u odraslih moguća povezanost hipertenzije, vaskulopatije i poremećaja metabolizma lipida s nastankom bolesti (32, 206).

1.4.1. Angiotenzin-konvertirajući enzim

Angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme,* ACE) je GP kodiran genom *ACE* koji se nalazi na dugom kraku 17. kromosoma (17q23) duljine 21 kb, a uključuje 26 eksona. Produkt gena jesu dvije izoforme enzima: u slučaju inicijacije transkripcije promotorom na 5' kraju prvog eksona transkribiraju se svi eksoni osim 13. koji se uklanja prekrajanjem pa nastaje somatski ACE veličine 170 kDa s dva aktivna mjesta, dok u slučaju inicijacije transkripcije promotorom u 12. intronu duljine 91 bp transkribiraju se eksoni od 13. do 26. te nastaje testikularni ili germinalni ACE veličine 100 kDa s jednim aktivnim mjestom (207).

U sklopu renin-angiotenzinskoga sustava, ACE katalizira pretvorbu neaktivnoga dekapeptida angiotenzina I u aktivni oktapeptid angiotenzin II koji ima vazokonstriktivno djelovanje, a utječe i na oslobađanje aldosterona iz kore nadbubrežne žlijezde koji zatim omogućuje veću reapsorpciju natrija i vode iz mokraće. Glavni rezultat djelovanja aldosterona II je povećanje volumena krvi, to jest, povećanje krvnoga tlaka, a također potiče rast i proliferaciju stanica stimuliranjem citokina i čimbenika rasta, te utječe i na endotelnu disfunkciju smanjenjem bioraspoloživosti dušikovoga oksida. U sklopu kinin-kalikreinskog sustava, ACE metabolizira bradikinin, koji ima vazodilatacijski učinak, u neaktivan metabolit. Dakle, ACE ima važnu ulogu u regulaciji krvnoga tlaka, a time i patofiziologiji kardiovaskularnih bolesti (207).

Opisani su brojni polimorfizmi *ACE,* od kojih su pojedini pokazali povezanost s pojavom moždanoga udara u različitim populacijama (Tablica 12.) (208). Najčešće je ispitivan I/D sekvencije duljine 287 bp u 16. intronu, tzv. *ACE* I/D (207). Umetnuta se sekvencija sastoji od Alu elementa duljine 264 bp okruženog poli-A repom od 15 bp i prepoznatljivom ponavljajućom sekvencijom. Alu elementi su zapravo retrotranspozoni koji mogu utjecati na ekspresiju vezanjem transkripcijskih čimbenika ili metilacijom (209). U

slučaju genotipa DD, aktivnost ACE je otprilike dvostruko veća nego u slučaju genotipa II, dok je aktivnost ACE u nositelja genotipa ID između aktivnosti ACE homozigota (207).

Tijekom posljednjih godina objavljene su meta-analize koje su dokazale povezanost alela D s brojnim stanjima, uključujući IMU u azijskoj populaciji dok je granični statistički značaj zabilježen u bijelaca (210), a kasnija meta-analiza pokazala je povezanost ovoga polimorfizma s pojavom IMU-a i u bijelaca (211). Povezanost *ACE* I/D s pojavom IMU-a u djece istražena je samo u jednom hrvatskom istraživanju. Unatoč većoj učestalosti alela D u djece s AIMU-om, dobivena je tek rubna, ali ne i statistički značajna povezanost *ACE* I/D s pojavom bolesti (32). Istraživanja povezanosti ovoga polimorfizma s CSVT-om do danas nisu objavljena.

Tablica 12. Pregled polimorfizama *ACE* povezanih s pojavom IMU (prilagođeno prema (92–94, 208).

nazivlje HGVS	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida**	**dio gena**
NM_000789.4:c.1215C>T	rs4309	1215 C/T	5' UTR
NM_000789.3:c.1488-58T>C	rs4311	T/C	5' UTR
NM_000789.4:c.2059-460A>C	rs4329	A/C iliA/G	intron
NM_000789.4:c.2305+88T>A	rs4333	T/C	intron
NM_000789.4:c.2306-105_2306-104insTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGCCCATACAGTCACTTTT	rs1799752	I/D	intron
NM_000789.4:c.2913-375A>G	rs4353	A/G	intron
n. d.	rs4267385	C/T	intron
n. d.	rs12451328	C/A	n. d.

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*), I/D – insercijsko-delecijski polimorfizam, n. d. – podatak nije dostupan.

1.4.2. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apoE) je GP veličine ~ 34 kDa koji se sastoji od 299 AK-a s jednim mjestom glikozilacije na položaju Thr194. Otprilike 75 % ApoE sintetizira jetra dok je mozak drugo glavno mjesto sinteze, a nastaje i u drugim tkivima (212). Organiziran je u dvije strukturne domene odvojene zglobnom regijom. N-terminalna domena uključuje AK-e od 1 do 191 strukturirane u četiri antiparalelne uzvojnice u obliku svežnja, te sadrži veznu regiju LDL receptora (AK-i od 136 do 150). C-terminalnu domenu čine AK-i od 225 do 299 strukturirane u amfipatske α-uzvojnice i sadrži regiju koja veže lipide (AK-i od 240 do 260) (212).

U plazmi se apoE uglavnom nalazi u sastavu hilomikrona, lipoproteina vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL), lipoproteina srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoprotein*, IDL) i lipoproteina velike gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL). ApoE ima središnju ulogu u regulaciji homeostaze lipida u plazmi, a posebice lipoproteina bogatih trigliceridima, jer služi kao ligand za vezanje lipoproteinskih čestica na specifične receptore na površini stanice: LDL receptor, apoE receptor, protein povezan s LDL receptorom, VLDL receptor, GP330 i proteoglikane heparan sulfata (212, 213). ApoE sintetiziran u mozgu služi za prijenos lipida u likvoru, inducira se kod ozljede perifernih živaca te se čini da ima ključnu ulogu u oporavku ozljede živaca jer raspodjeljuje lipide u regenerirajuće aksone i Schwannove stanice tijekom remijelinacije (213).

Gen *APOE* nalazi se na 19. kromosomu (lokus 19q13.32), duljine je 3597 nukleotida i sadrži četiri eksona. *APOE* je polimorfan te su u eksonu 4 opisana dva polimorfizma *APOE* 388 T/C i 526 C/T koji čine četiri različita haplotipa (Tablice 13. i 14.) (214). Kombinacijom haplotipova ε2, ε3 i ε4 nastaje šest različitih fenotipova: apoE2/2, apoE2/3, apoE2/4, apoE3/3, apoE3/4 i apoE4/4, dok je četvrti haplotip ε3r rijedak, a do danas je identificiran samo u tri talijanske bijele obitelji i u jednoj nigerijskoj obitelji (214). *APOE* ε3/3 je najčešći i stoga predstavlja referentni genotip.

Tablica 13. Pregled polimorfizama *APOE* koji tvore haplotip (92–94, 214).

nazivlje HGVS	**referentni broj prema dbSNP**	**zamjena nukleotida***	**zamjena AK***
NM_000041.4:c.388T>C	rs429358	388 T/C (3937 T/C)	Cys130Arg (Cys112Arg)
NM_000041.4:c.526C>T	rs7412	526 C/T (4075 C/T)	Arg176Cys (Arg158Cys)

* – obzirom na preporuke i promjene vezane uz nazivlje genskih varijacija, navedeni su osvježeni podaci o točnim položajima zamjena nukleotida prema nazivlju HGVS (92) te bazama podataka dbSNP (94) i ClinVar (93). U zagradama su navedeni i podaci o položajima zamjena nukleotida i AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi, HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

Tablica 14. Pregled haplotipova *ACE* (92–94, 212, 214).

haplotip	**SNP rs429358**		**SNP rs7412**		**učestalost**
	genotip	**AK**	**genotip**	**AK**	
ε2	T	Cys	T	Cys	5 – 10 %
ε3	T	Cys	C	Arg	65 – 70 %
ε4	C	Arg	C	Arg	15 – 20 %
ε3r	C	Arg	T	Cys	rijedak

SNP – polimorfizam jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*), AK – aminokiselina.

Izoforme apoE razlikuju se po svojoj sposobnosti interakcije s receptorima. ApoE3 i apoE4 vežu LDL receptor sličnim afinitetom, dok apoE2 veže LDL receptor sa samo 2 % aktivnosti u odnosu na apoE3 i apoE4. To je posljedica prisutnosti Cys158 koji uzrokuje promjenu konformacije vezne regije za LDL receptor na apoE2. Nadalje, Arg158 i Asp154 u ApoE3 tvore solni most, dok u apoE4 zbog Cys158, Asp154 stupa u interakciju s Arg150, mijenjajući cijelu regiju vezanja receptora (212). Izoforme apoE razlikuju se i prema specifičnim klasama lipoproteina koje vežu pa se apoE4 češće nalazi u velikim trigliceridima bogatim česticama (VLDL), a apoE3 i apoE2 se povezuju s malim fosfolipidima bogatim česticama (HDL). Kristalografske snimke otkrile su izloženi bočni lanac Arg61 u apoE4, ali ne i u drugim izoformama, koji stupa u interakciju s bočnim lancem Glu255 što mijenja konformaciju proteina. Ovakva interakcija domena u apoE4 vjerojatan je uzrok preferencije za različite lipoproteine u odnosu na apoE2 i apoE3 (213).

Varijante *APOE* povezuju se s nizom bolesti povezanih sa starenjem, uključujući aterosklerozu, kardiovaskularne bolesti i Alzheimerovu bolest, kao i sa zdravim starenjem i dugovječnošću (214). ApoE2 je povezan s hiperlipoproteinemijom tipa III dok je apoE4 glavni genetički čimbenik rizika za Alzheimerovu bolest i druge neurološke poremećaje, uključujući loše kliničke ishode nakon traumatske ozljede mozga ili moždanog udara jer smanjuje plastičnost neurona i integritet krvno-moždane barijere. Odnos između *APOE* i plastičnosti i oporavku mozga nakon moždanoga udara nije izravno proučavan na ljudima, ali su studije na životinjama i studije oporavka od akutnoga moždanog udara ukazale na važnost varijante *APOE* ε4 (215).

Povezanost *APOE* s pojavom IMU-a dobro je ispitana u pojedinačnim studijama i nekoliko meta-analiza (216, 217), od kojih je posljednja uključila 81 pojedinačnu studiju, te pokazala značajno veći rizik IMU-a za nositelje *APOE* ε4 u općoj, azijskoj i bijeloj populaciji, dok je za nositelje *APOE* ε3 utvrđena zaštitna uloga od nastanka IMU-a u općoj i azijskoj populaciji, ali ne i u bijelaca (211). Povezanost varijanti *APOE* s pojavom IMU-a u djece do danas je istražena u samo tri studije, uključujući i jedno istraživanje provedeno u Hrvatskoj. U dvije studije nije utvrđena povezanost kao kod odraslih (32, 218), a jedna studija utvrdila je povezanost *APOE* ε4 s nastankom PAIMU-a (219).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Do danas je utvrđen velik broj nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika za nastanak IMU-a u djece, ali etiologija u približno 30 % slučajeva još uvijek nije razjašnjena (1, 48).

Protrombotički poremećaji, koji mogu nastati zbog promjena na razini gena koji kodiraju za proteine uključene u procese zgrušavanja i fibrinolize, prepoznati su kao rizični čimbenik za nastanak IMU u djece (1, 68). Dosadašnja istraživanja uglavnom su obuhvatila ispitivanje povezanosti pojedinih trombofilnih genskih promjena s pojavom IMU-a u djece i uglavnom obuhvaćaju protrombotičke polimorfizme *F5* 1601 G/A i *F2* 20210 G/A (1, 32, 47, 56, 68). Druge potencijalne protrombotičke genske varijacije analizirane su u oskudnom broju studija u specifičnim populacijama ili u odraslih (76, 77), dok u djece uopće nisu analizirane.

Osim toga, poznato je dodatno povećanje rizika za nastanak trombotičkih događaja u prisutnosti više od jednoga protrombotičkog rizičnog čimbenika (47), ali udruženi utjecaj protrombotičkih polimorfizama unutar istoga gena ili unutar više gena smještenih na istom kromosomu na nastanak IMU-a u djece do sada nije istražen. Nadalje, dosadašnja istraživanja uključila su uglavnom slučajeve IMU-a u dječjoj dobi, a povezanost protrombotičkih polimorfizama s IMU-om može se također razlikovati ovisno o geografskoj i etničkoj pripadnosti ispitivane populacije (46). U Hrvatskoj je do danas ispitana povezanost ograničenoga broja protrombotičkih polimorfizama na manjem broju djece s dijagnozom AIMU-a, a djeca s dijagnozom CSVT-a do sada uopće nisu bila obuhvaćena (32, 34).

Hipoteza ovoga istraživanja je da su polimorfizmi u genima za čimbenike zgrušavanja, GP-e trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike povezani s pojavom IMU-a u djece u Hrvatskoj ovisno o dobi, tipu IMU-a i lokalizaciji IMU-a. Stoga, ciljevi ovoga istraživanja jesu:

1. u skupini djece s IMU-om i u kontrolnoj skupini genotipizirati 21 polimorfizam u 13 gena kandidata koji uključuju polimorfizme čimbenika zgrušavanja i fibrinolize, polimorfizme GP-a trombocitne membrane i polimorfizme vezane uz intermedijarne rizične čimbenike (Tablica 15.);
2. ispitati povezanost pojedinih polimorfizama s IMU-om u djece ovisno o tipu IMU-a, dobi i lokalizaciji lezije u odnosu na kontrolnu skupinu, tj. ispitati potencijal polimorfizama kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak bolesti;
3. ispitati povezanost odabranih udruženih polimorfizama (analiza haplotipova) s IMU-om u djece ovisno o tipu IMU-a, dobi i lokalizaciji lezije u odnosu na

kontrolnu skupinu, tj. ispitati potencijal udruženih polimorfizama kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak bolesti.

Kako je suvremena medicina usmjerena na novi koncept osobnoga pristupa, prevenciju i predviđanje bolesti kroz razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa, razumijevanje genetičke osnove IMU-a osnovni je preduvjet razvoju i primjeni standardiziranih protokola za dijagnozu, procjenu ishoda i terapiju bolesti. Pojedine genske varijacije uključene u ovo istraživanje još uopće nisu ispitane u djece s IMU-om, dok za dio polimorfizama postoji tek malen broj objavljenih radova ograničenih na manje populacije sa značajnim metodološkim razlikama. Ovim istraživanjem nastojat će se prikupiti nove informacije o pojedinačnoj i eventualnoj zajedničkoj ulozi ispitivanih genskih čimbenika u etiologiji IMU-a u djece s obzirom na dob pojave bolesti, tip i lokalizaciju IMU-a. Osim toga, dobiveni rezultati poslužit će za usmjeravanje daljnjih istraživanja s mogućnošću prijenosa spoznaja na razumijevanje etiologije IMU-a u odraslih.

Tablica 15. Pregled genskih varijacija obuhvaćenih ovim ispitivanjem.

gen	lokus gena	polimorfizam	nazivlje HGVS	referentni broj prema dbSNP	učinak
F5	1q24.2	1601 G/A	NM_000130.4:c.1601G>A	rs6025	zamjena AK
		HR2	NM_000130.5:c.3980A>G	rs1800595	zamjena AK
F2	11p11.2	20210 G/A	NM_000506.4:c.*97G>A	rs1799963	3' UTR
FGB	4q31.3	-455 G/A	NM_001184741.1:c.-463G>A	rs1800790	5' UTR
F13A1	6p25.1	Val34Leu	NM_000129.4:c.103G>T	rs5985	zamjena AK
SERPINE1	7q22.1	PAI-1 I/D	NM_000602.5:c.-820G[(4_5)]	rs1799889	5' UTR
ITGA2	5q11.2	HPA-5 a/b	NM_002203.4:c.1600G>A	rs1801106	zamjena AK
		807 C/T	NM_002203.4:c.759C>T	rs1126643	zamjena AK
		873 G/A	NM_002203.4:c.825G>A	rs1062535	zamjena AK
GP1BA	17p13.2	HPA-2 a/b	NM_000173.7:c.482C>T	rs6065	zamjena AK
		(-5) T/C	NM_000173.7:c.-5T>C	rs2243093	5' UTR
		VNTR	NM_000173.7:c.1321_1359del NM_000173.7:c.1282_1359del	rs1259394995 rs869060239	I/D 13 ili 26 AK
ITGB3	17q21.32	HPA-1 a/b Pl^{A1} i Pl^{A2}	NM_000212.2:c.176T>C	rs5918	zamjena AK
ITGA2B	17q21.31	HPA-3 a/b Bak^a i Bak^b	NM_000419.3:c.2621T>G	rs5911	zamjena AK
GP6	19q13.42	13254 T/C	NM_001083899.2:c.655C>T	rs1613662	zamjena AK
SELP	1q24.2	Ser290Asn	NM_003005.4:c.992G>A	rs6131	zamjena AK
		Asn562Asp	NM_003005.3:c.1807G>A	rs6127	zamjena AK
		Val599Leu	NM_003005.3:c.1918G>T	rs6133	zamjena AK
		Thr715Pro	NM_003005.3:c.2266A>C	rs6136	zamjena AK
ACE	17q23.3	I/D	NM_000789.4:c.2306-105_2306-104ins TTT TTT TTT TTG AGA CGG AGT CTC GCT CTG TCG CCC ATA CAG TCA CTT TT	rs1799752	Alu element, intron
APOE	19q13.32	ε2-4	NM_000041.4:c.388T>C	rs429358	zamjena AK
			NM_000041.4:c.526C>T	rs7412	zamjena AK

HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), AK – aminokiselina, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*), I/D – insercijsko-delecijski polimorfizam, VNTR – varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključeno je ukupno 185 djece starosne dobi do 18 godina s potvrđenom dijagnozom AIMU-a ili CSVT-a, zaprimljenih na Neurološkom odjelu Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Neuropedijatrijskom odjelu Klinike za dječje bolesti Zagreb.

Budući da je IMU relativno rijedak poremećaj u djece s 4 – 9 novih slučajeva godišnje u glavnom nacionalnom centru za cerebrovaskularne poremećaje u Hrvatskoj (28), za postizanje adekvatnog broja za analizu, u ovo istraživanje uključeno je 83 djece iz prethodnog pilot istraživanja, projekt „Protrombotički rizični čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima djece“ (broj projekta MZOŠ 0214212, glavni istraživač prof.dr.sc. Renata Zadro), kojima je dijagnoza AIMU-a postavljena u periodu od 1999. do 2010. godine. Preostalih 102 djece uključeno je u okviru projekta „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ (broj projekta HRZZ-IP-2014-09-2047, voditelj prof. dr. sc. Renata Zadro), a kojima je dijagnoza AIMU-a ili CSVT-a postavljena u periodu od 2010. do kolovoza 2020. godine. Dinamika uključivanje novih slučajeva do 2004. godine iznosila je do pet slučajeva AIMU-a godišnje, a u kasnijem periodu sedam do devet slučajeva AIMU-a godišnje. Jedan slučaj CSVT-a godišnje zabilježen je u periodu od 2008. do 2010., a tri slučajeva CSVT-a godišnje zabilježeno je u periodu od 2013. do kolovoza 2020. Za svakog uključenoga pacijenta prikupljeni su osnovni epidemiološki i klinički podaci o spolu, dobi dijagnoze, dobi ispitivanja i lokalizaciji moždanoga udara.

Svim ispitanicima dijagnoza je postavljena nakon opširne analize povijesti bolesti te fizikalnoga i neurološkoga pregleda, a temeljena je na prisutnosti kliničkih simptoma i znakova i potvrđena primjenom najmanje jedne slikovne tehnike morfoloških prikaza mozga: CT, MRI i MRI angiografija. Samo CT je korištena za potvrdu dijagnoze kod maloga broja slučajeva IMU-a (N = 9) tijekom prvih godina prikupljanja uzoraka, dok je MRI ili MRI s angiografijom korištena za potvrdu dijagnoze kod preostalih 176 slučajeva IMU-a. Dijagnoza AIMU-a temeljena je na prisutnosti neurološkoga deficita akutnoga početka, pojavi neuroloških napadaja ili drugih znakova encefalopatije te potvrđena neuroradiološkim nalazom parenhimalnih infarkta u cerebralnim arterijama koji su u skladu s kliničkom slikom pacijenta (14). PAIMU i DAIMU razlikovani su prema dostupnim definicijama (16). Dijagnoza CSVT-a temeljena je na neuroradiološkoj potvrdi prisutnosti tromba ili prekidu

protoka krvi u cerebralnim venama ili duralnim sinusima, te kliničkoj slici koja uključuje glavobolju, neurološke napadaje, letargiju te fokalni ili generalizirani neurološki deficit (14). Neuroradiološka obrada uključivala je CT pomoću koje je izuzet tumor, subduralni hematom ili apsces kao druge moguće dijagnoze, nakon čega je slijedila MR u kombinaciji s MR angiografijom kao trenutno najboljom metodom za potvrdu dijagnoze CSVT-a. Zbog malog broja prikupljenih slučajeva nije provedena daljnja podjela CSVT-a u podtipove na perinatalnu CSVT i CSVT u dječjoj dobi. Podjela slučajeva na KIMU i SIMU napravljena je djelomično, to jest, samo za one slučajeve gdje se iz nalaza neuroradiološke obrade sa sigurnošću mogla utvrditi prisutnost isključivo kortikalno lokalizirane lezije u slučaju KIMU, odnosno subkortikalno lokalizirane lezije u slučaju SIMU.

U istraživanje je uključeno i 185 djece, starosne dobi do 18 godina, iz istoga geografskog područja, kod kojih nisu ustanovljeni neurološki i tromboembolijski poremećaji te kod kojih nije utvrđena povećana koncentracija C reaktivnog proteina, podudarnih po spolu i dobi djeci s AIMU-om i CSVT-om koji su predstavljali kontrolnu skupinu. Ispitanicima u kontrolnoj skupini uzorkovana je krv u svrhu rutinske laboratorijske obrade prije manjega operativnog zahvata (primjerice tonzilektomije) ili tijekom kontrolne obrade djece s respiratornim bolestima te su prikupljeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb. Za svakog uključenoga ispitanika kontrolne skupine prikupljeni su podaci o dobi i spolu. Prilikom uključivanja ispitanika u kontrolnu skupinu pazilo se na njihovu podudarnost po spolu i dobi ispitanicima s dijagnozom AIMU-a i CSVT-a, ali je zbog nedostatka podudarnih ženskih kontrolnih ispitanika mlađih od godinu dana starosti uključeno i 16 djevojčica starijih od godinu dana do starosne dobi od 18 godina.

Za izdvajanje genomske DNA i provođenje molekularno-genetičkih analiza korišteni su uzorci periferne pune krvi uzete uz antikoagulant K_3EDTA ili natrijev-citrat (0,105 M) preostali nakon redovne bolničke i laboratorijske obrade svih uključenih ispitanika. Volumen uzorkovane krvi iznosio je od 0,25 mL do najviše 8 mL.

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u istraživanju, uključujući Zakon o zaštiti prava pacijenata, Pravilnik o dobroj kliničkoj praksi i Helsinšku deklaraciju. Informirani pristanak zatražen je od roditelja sve djece uključene u istraživanje nakon detaljnoga objašnjenja istraživanja, a dodatno je zatražen i samostalan pristanak za svu djecu stariju od 12 godina. Za provedbu ovoga istraživanja dobivene su

suglasnosti nadležnih etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Klinike za dječje bolesti Zagreb i Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Provedeno istraživanje u potpunosti je financirano iz projekta „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ (broj projekta HRZZ-IP-2014-09-2047, voditelj prof. dr. sc. Renata Zadro).

3.2. Molekularno-genetičke metode

Svi biološki materijali korišteni tijekom provedbe ovoga istraživanja korišteni su sukladno propisima dobre laboratorijske prakse, a medicinski otpad je zbrinut prema važećim zakonima u Republici Hrvatskoj.

3.2.1. Izdvajanje genomske DNA

Uzorci periferne pune krvi s antikoagulantom K_3EDTA ili natrijevim-citratom (0,105 M) korišteni su za izdvajanje genomske DNA iz leukocita. Ovisno o dostupnom preostalom volumenu krvi, DNA je izdvojena ručnom metodom isoljavanja ili je korišteno automatizirano izdvajanje DNA.

3.2.1.1. Metoda isoljavanja

U slučajevima dovoljnoga preostalog volumena (više od 2 mL), za izdvajanje genomske DNA korištena je metoda isoljavanja koja se temelji na selektivnoj lizi eritrocita, zatim selektivnoj lizi stanica s jezgrom, taloženju staničnih proteina zasićenom otopinom natrijeva klorida te izdvajanju DNA pomoću apsolutnoga etanola (220).

Korišteni materijali:

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 50 mL i 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 1 – 5 mL, 0,1 – 1 mL i 10 – 200 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za epruvete volumena 50 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- termostat Heraeus B6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- automatske pipete volumena 1 – 5 mL, 0,1 – 1 mL i 10 – 200 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pufer za hemolizu, pH 7,4, 10 x koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 x uz pomoć destilirane sterilne vode, pripravljen na sljedeći način:
    - NH_4Cl (Kemika, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 155 mM

82,9 g

- $KHCO_3$ (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 10 mM
  10 g
- Na_2EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 1 mM
  3,72 g
- destilirana sterilna voda do otprilike 900 mL, otopiti uz miješanje na magnetskoj miješalici, prilagoditi pH uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH
- destilirana sterilna voda do 1000 mL

- pufer za lizu SE, pH 8,0, 10 x koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 x uz pomoć destilirane sterilne vode, pripravljen na sljedeći način:
  - tris-(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), konačna koncentracija 10 mM 12,1 g
  - NaCl (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 75 mM
    43,88 g
  - Na_2EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 1 mM
    89,33 g
  - destilirana sterilna voda do otprilike 900 mL, otopiti uz miješanje na termostatiranoj magnetskoj miješalici na temperaturi od 40 °C, prilagoditi pH uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH
  - destilirana sterilna voda do 1000 mL
- otopina pronaze aktivnosti 140 U/mL, alikvotirana i zamrznuta na -20 °C, prije korištenja inkubirana na sobnoj temperaturi, pripravljena na sljedeći način:
  - pronaza specifične aktivnosti 7 U/mg (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) 1g
  - destilirana sterilna voda 50 mL
  - oprezno promiješati, provesti auto digestiju tijekom 2h u termostatu na temperaturi od 37 °C
- 10 % otopina natrijeva dodecil-sulfata (SDS), pripravljena na sljedeći način:
  - SDS (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD) 50 g
  - destilirana sterilna voda do 500 mL, otopiti u digestoru uz miješanje na termostatiranoj magnetskoj miješalici na temperaturi od 37 °C
- zasićena otopina NaCl, pripravljena na sljedeći način:
  - NaCl (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) 35 g

  - destilirana sterilna voda 100 mL
- apsolutni etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- pufer Tris-a i Na_2EDTA (pufer TE), pH 7,5, pohranjen na +4 °C, pripravljen na sljedeći način:
  - Tris (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), konačna koncentracija 10 mM 1,21 g
  - Na_2EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 1 mM 0,37 g
  - destilirana sterilna voda do otprilike 900 mL, otopiti uz miješanje na magnetskoj miješalici, prilagoditi pH uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH
  - destilirana sterilna voda do 1000 mL

Postupak:

1. U sterilnu jednokratnu epruvetu volumena 50 mL dodano je 2 – 7 mL krvi i do 40 mL pufera za hemolizu 1 x te je epruveta poklopljena i pažljivo pomiješana.
2. Epruveta je inkubirana u hladnjaku na temperaturi od -20 °C tijekom 20 minuta.
3. Epruveta je zatim centrifugirana na brzini od 4000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C uz pomoć rashladne centrifuge.
4. Supernatant je uklonjen odlijevanjem.
5. U slučaju potrebe, talog je ispran s malo pufera za hemolizu 1 x.
6. Na talog je dodano 10 mL pufera za hemolizu, epruveta je poklopljena te je sadržaj homogeniziran snažnim miješanjem sadržaja epruvete.
7. Epruveta je zatim centrifugirana na brzini od 4000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C uz pomoć rashladne centrifuge.
8. Supernatant je uklonjen odlijevanjem.
9. Na talog je dodano 3 mL 1 x pufera za lizu SE, epruveta je poklopljena te je sadržaj homogeniziran snažnim miješanjem sadržaja epruvete.
10. U epruvetu je dodano 200 µL otopine pronaze te je epruveta pažljivo promiješana.
11. U epruvetu je do dano 400 µL 10 % otopine SDS-a, epruveta je poklopljena te je pažljivo nekoliko puta okrenuta.
12. Epruveta je inkubirana u termostatu na temperaturi od 37 °C najmanje preko noći, a najdulje do 5 dana.
13. Nakon inkubacije u epruvetu je dodano 1 mL zasićene otopine NaCl te je epruveta snažno promiješana tijekom 15 – 20 s na vrtložnoj miješalici.

14. Epruveta je zatim centrifugirana na brzini od 4000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C uz pomoć rashladne centrifuge.
15. Supernatant koji sadrži DNA preliven je u novu sterilnu jednokratnu epruvetu volumena 50 mL u koju je prethodno dodano 10 mL apsolutnog etanola.
16. Epruveta je lagano okretana dok izdvojena DNA nije isplivala na površinu u obliku tzv. meduze.
17. DNA je prenesena uz pomoć pipete u sterilnu jednokratnu epruvetu volumena 1,5 mL i sušena u otklopljenoj epruveti u termostatu na 37 °C tijekom 1 h, to jest, dok etanol ne ishlapi.
18. U epruvetu je dodano 500 µL pufera TE te je epruveta poklopljena i snažno promiješana na vrtložnoj miješalici.
19. Poklopljena epruveta je inkubirana u termostatu na temperaturi od 37 °C najmanje preko noći, a najdulje 2 – 3 dana.
20. Izdvojena DNA bila je pohranjena na temperaturi od +4 ºC do izrade molekularno-genetičkih analiza.

3.2.1.2. Automatizirano izdvajanje DNA

U slučajevima ograničenoga preostalog volumena pune krvi manjega od 2 mL, izdvajanje genomske DNA provedeno je iz 200 µL pune krvi pomoću uređaja za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i pripadajućeg kompleta za izdvajanje DNA MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) bez odstupanja od preporuka proizvođača. Izdvojena DNA bila je pohranjena na temperaturi od +4 ºC do izrade molekularno-genetičkih analiza.

3.2.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija i čistoća izdvojene DNA određena je uz pomoć mikrovolumnog spektrofotometra koji u jednom µL otopine izdvojene DNA mjeri apsorbancije na 260 i 280 nm iz čega izračunava koncentraciju i čistoću DNA u uzorku.

Korišteni materijali:

- mikrovolumni spektrofotometar NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta volumena 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- pufer TE, pH 7,5, pohranjen na +4 °C, priprava opisana u potpoglavlju 3.2.1.1.
- destilirana sterilna voda
- staničevina

Postupak:

1. Uređaj je upaljen uključivanjem u izvor struje te je u izborniku odabran program za mjerenje koncentracije i čistoće dvolančane DNA.
2. Podignuta je ručica koja otkriva mjerno polje, na mjerno polje pipetiran je 1 µL pufera TE za slijepu probu i postavljanje bazne linije (engl. *blank*) spektrofotometra, spuštena je ručica mjernog polja i odabrana tipka za mjerenje.
3. Po završetku je podignuta ručica mjernog polja, a mjerno polje je obrisano staničevinom.
4. Na mjerno polje pipetiran je 1 µL uzorka DNA prethodno promiješanog na vrtložnoj miješalici, spuštena je ručica mjernog polja i odabrana tipka za mjerenje te je zapisan dobiveni rezultat.
5. Po završetku je podignuta ručica mjernog polja, a mjerno polje je obrisano staničevinom.
6. Serija uzoraka je mjerena ponavljanjem 4. i 5. koraka.
7. Nakon mjerenja svih uzorka u seriji, mjerno polje prebrisano je staničevinom namočenom u destiliranu sterilnu vodu i zatim suhom staničevinom, a uređaj je ugašen isključivanjem iz izvora struje.

3.2.3. Dokazivanje skupine polimorfizama pomoću kompleta CVD StripAssay ® T i A

Dokazivanje polimorfizama *F5* 1601 G/A, *F5* HR2, *F2* 20210 G/A, *F13A1* Val34Leu i PAI-1 4G/5G provedeno je pomoću komercijalno dostupnoga kompleta za analizu polimorfizama CVD StripAssay ® T (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija), a

dokazivanje polimorfizama *FGB* -455 G/A, *HPA-1*, *ACE* I/D i *APOE* ε2-4 provedeno je pomoću komercijalno dostupnoga kompleta za analizu polimorfizama CVD StripAssay ® A (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija). Pomoću ovih kompleta moguće je dokazivanje i sedam dodatnih genetičkih analiza koje nisu uključene u ovo ispitivanje. Kompleti se temelje na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s višestrukim umnažanjem (engl. *multiplex-PCR*, M-PCR) uz pomoć početnica obilježenih biotinom nakon koje slijedi hibridizacija umnoženih fragmenata na hibridizacijsku test traku s imobiliziranim alel-specifičnim oligonukleotidima i njihova vizualizacija pomoću kromogene reakcije u kojoj sudjeluju konjugat streptavidina i alkalne fosfataze te kromogeni supstrat. Oba kompleta korištena su bez odstupanja od uputa proizvođača.

3.2.3.1. M-PCR

Regije DNA od interesa umnožene su M-PCR-om uz pomoć priloženih mješavina za amplifikaciju koje sadrže parove specifičnih početnica obilježene biotinom.

Korišteni materijali:

- kompleti za analizu polimorfizama CVD StripAssay ® T i A (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija), u ovom dijelu korišteni su sljedeći sastojci:
    - amplifikacijske mješavine T i A, sadrže parove specifičnih oligonukleotidnih početnica obilježenih biotinom
    - pufer za razrjeđivanje DNA-polimeraze Taq
- DNA-polimeraza AmpliTaq aktivnosti 5 U/µL, pohranjena na -20 °C (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- destilirana sterilna voda
- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL i 0,2 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Postupak:

Po dvije reakcijske smjese za M-PCR za jednoga ispitanika pripravljene su na ledu miješanjem odgovarajućih količina uzorka genomske DNA, prethodno razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju između 15 i 20 μg/mL, DNA-polimeraze AmpliTaq, pufera za razrjeđivanje DNA-polimeraze Taq i mješavine za amplifikaciju A ili T do ukupnog volumena od 25 μL prema protokolu u Tablici 16.

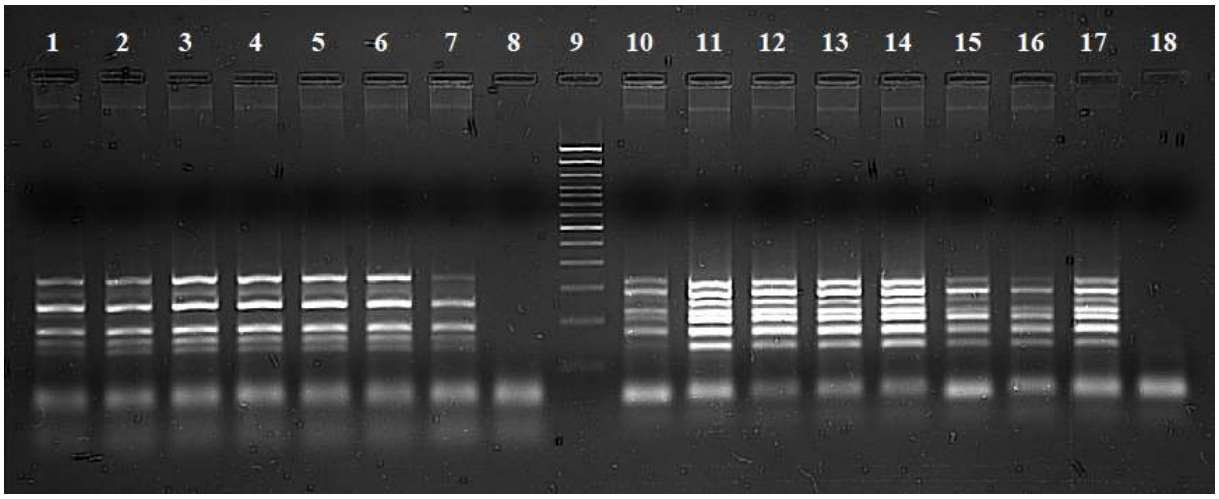
Za svakog ispitanika na ledu su pripravljene dvije smjese za M-PCR miješanjem 0,2 μL DNA-polimeraze AmpliTaq, 4,8 μL pufera za razrjeđivanje DNA-polimeraze Taq, 5 μL uzorka DNA prethodno razrijeđenoga sterilnom destiliranom vodom na koncentraciju između 15 i 20 μg/mL te 15 μL mješavine za amplifikaciju A ili T. Svi sastojci reakcijske smjese osim DNA-polimeraze su prije pipetiranja promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim spušteni na dno epruvete uz pomoć male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka korištena je i negativna kontrola bez kalupa DNA u kojoj je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane sterilne vode.

Tablica 16. Izrada M-PCR smjese za dokazivanje skupine polimorfizama pomoću CVD StripAssay ® T i A.

Reagens	**V (μL)**	**C**
DNA-polimeraza AmpliTaq	0,2	U/μL
pufer za razrjeđivanje DNA-polimeraze Taq	4,8	/
mješavina za amplifikaciju A ili T	15,0	μM
genomska DNA	5,0	3 – 4 μg/mL

V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

M-PCR reakcija provedena je u termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 94 °C tijekom 2 min; 35 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 94 °C tijekom 15 s, sljepljivanja početnica na 58 °C tijekom 30 s i produljenje početnica na 72 °C tijekom 30 s; konačno produljenje početnica na 72 °C tijekom 3 min; hlađenje na 4 °C. Za provjeru uspješnosti M-PCR-a, prema preporuci proizvođača provedena je kontrolna elektroforeza umnoženih produkata. U slučaju izostanka očekivanih vrpci nakon elektroforetskog razdvajanja (Slika 1.) ili dokaza umnažanja DNA fragmenata u negativnoj kontroli, ponovljena je M-PCR reakcija i kontrolna elektroforeza.



Slika 1. Očekivani rezultat kontrolne elektroforeze nakon M-PCR-a. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri naponu od 120 V tijekom 40 minuta. 1-7, produkti umnažanja veličine 133, 156, 180, 202, 225, 248, 297 i 342 bp dobiveni kopletom CVD Assay A; 10-17, produkti umnažanja veličine 134, 165, 173, 202, 223, 254, 283 i 324 bp dobiveni kopletom CVD Assay T; 9, biljeg molekularne mase od po 100 bp; 8 i 18, negativna kontrola.

3.2.3.2. Elektroforeza DNA na 2 % agaroznom gelu

U svrhu provjere uspješnosti M-PCR-a u ovoj metodi, ali i u svrhu utvrđivanja rezultata umnažanja kod drugih metoda, korištena je elektroforeza DNA u 2 % agaroznom gelu.

Korišteni materijali:

- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- parafilm
- pufer Tris-a, borne kiseline i EDTA (pufer TBE), 10 x koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 x uz pomoć destilirane sterilne vode, pripravljen na sljedeći način:
    - Tris (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), konačna koncentracija 100 mM 121,1 g
    - H_3BO_4 (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), konačna koncentracija 100 mM 47,6 g
    - Na_2EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), konačna koncentracija 2,5 mM 9,3 g

    - destilirana sterilna voda do otprilike 900 mL, otopiti uz miješanje na magnetskoj miješalici
    - destilirana sterilna voda do 1000 mL
- agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- otopina etidijeva bromida 0,07 %, pohranjena na +4 °C (inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka)
- termostatirana magnetska mješalica TK22 (Kartell, New York, New York, SAD)
- pufer za nanošenje uzoraka, alikvotiran i pohranjen na +4 °C, sastoji se od:
    - 50 % glicerol 5 mL
    - 1 % bromfenol plavilo 1 mL
    - 1 % ksilen-cijanol 1 mL
    - pufer TBE, 10 x koncentriran 1 mL
    - destilirana sterilna voda 2 mL
- biljeg molekularne mase od po 100 bp, pohranjen na -20 °C (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- sustav za horizontalnu elektroforezu koji se sastoji od plastičnoga kalupa za izlijevanje gela i pripadajućega nosača, češljića za stvaranje jažica, kadice, poklopca s elektrodama i ispravljača (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- UV kamera G-BOX Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) i pripadajući računalni program GeneSys, verzija 1.6.1.0 (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)

Postupak:

1. U 60 mL 1 x koncentriranog pufera TBE, dodano je 1,2 g agaroze i zagrijano uz miješanje na termostatiranoj magnetskoj miješalici dok smjesa nije postala homogena i prozirna, to jest, dok se sva agaroza nije otopila.
2. Smjesa je ohlađena pod tekućom vodom na temperaturu od otprilike 60 °C, dodana je jedna kap otopine etidijeva bromida i smjesa je kratko promiješana na magnetskoj miješalici.
3. Plastični kalup za izlijevanje gela pričvršćen je za pripadajući nosač, postavljeni su češljići za stvaranje jažica te je izlivena pripremljena smjesa izbjegavajući stvaranje mjehurića zraka.

4. Nakon što je sva agaroza polimerizirala te se stvorio gel (nakon otprilike 30 minuta), oprezno su izvađeni češljići za stvaranje jažica, a pripremljeni gel je zajedno s plastičnim kalupom prenesen u kadicu za elektroforezu koja je zatim napunjena s 1 x koncentriranim puferom TBE tako da je gel u potpunosti uronjen u pufer.
5. Na komadu parafilma pipetirano je po 3 μL pufera za nanošenje uzoraka, 10 μL 1 x koncentriranog pufera TBE i pomiješano pipetom s 1 μL biljega molekularne mase od po 100 bp.
6. Za svaki je PCR produkt na istom komadu parafilma pipetirano po 3 μL pufera za nanošenje uzoraka i pomiješano pipetom s 10 μL PCR produkta.
7. Po 10 μL tako pripremljenih uzoraka naneseno je pipetom u jažice u gelu.
8. Kadica je poklopljena, a elektrode su spojene na ispravljač te je provedena elektroforeza pri 120 V tijekom 30 min, a prema potrebi i dulje.
9. Vizualizacija rezultata elektroforeze učinjena je uz pomoć UV kamere i pripadajućega računalnog programa.

3.2.3.3. Hibridizacija, razvijanje boje i očitavanje rezultata

Korišteni materijali:

- kompleti za analizu polimorfizama CVD StripAssay ® T i A (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija), u ovom dijelu korišteni su sljedeći sastojci:
    - plastične kadice za hibridizacijske trake
    - hibridizacijske trake T i A
    - otopina za denaturiranje (DNAT)
    - hibridizacijski pufer
    - otopina za ispiranje A
    - otopina konjugata, sadrži strepatavidin na kojeg je vezana alkalna fosfataza
    - otopina za ispiranje B, sadrži 0,05 % NaN_3
    - otopina za razvijanje boje, sadrži plavi nitro-tetrazolij-klorid i 5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat
    - obrazac za očitavanje rezultata T i A
- destilirana sterilna voda
- vakuum sisaljka
- vodena kupelj WNE 14 (Memmert, Schwabach, Njemačka)

- termostatirana orbitalna tresilica PST-60HL (BioSan, Riga, Latvija)

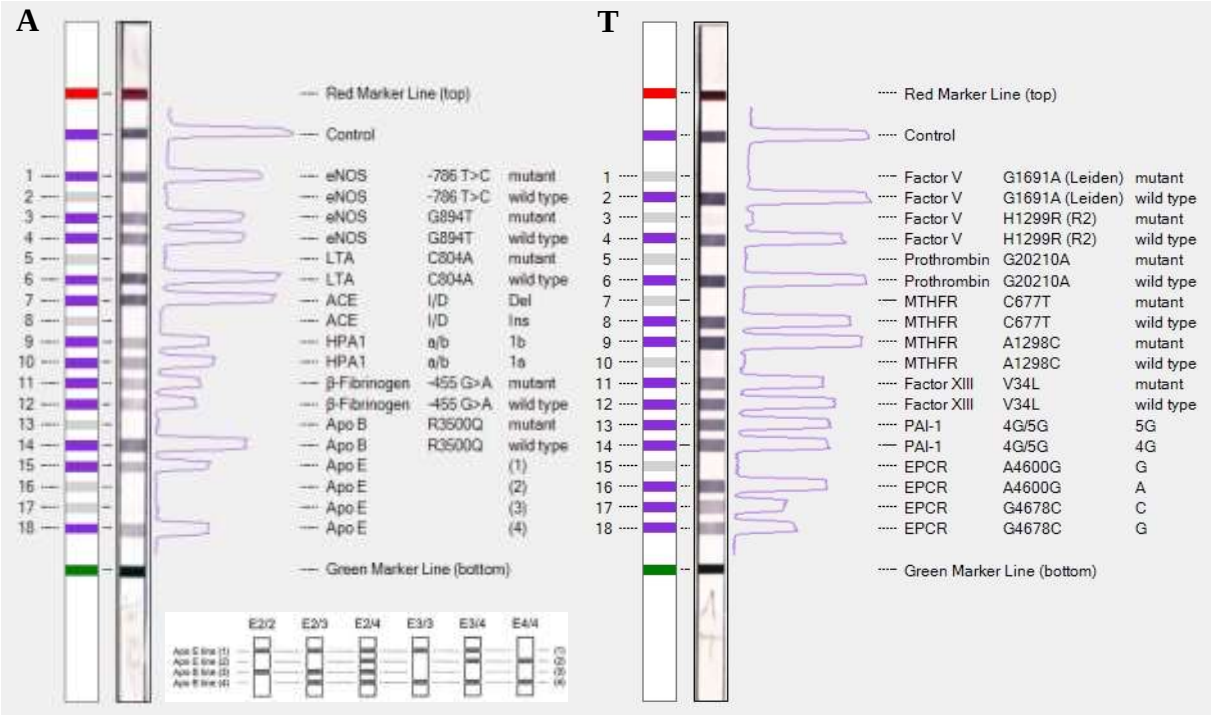
Postupak:

1. U niži kut svakoga polja u kompletu priložene plastične kadice za hibridizacijske trake pipetirano je 10 μL priložene plavo obojene otopine za denaturiranje i 10 μL M-PCR-om umnoženih produkta, promiješano pipetom i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi umnoženi produkti denaturirali.
2. U svako polje je zatim dodan 1 mL priloženoga hibridizacijskog pufera, prethodno zagrijanog na temperaturu od 45 °C u vodenoj kupelji, prilikom čega se plava boja mješavine obezbojila.
3. Priložene hibridizacijske trake obilježene su grafitnom olovkom s gornje strane i zatim potpuno uronjene u prethodno pipetiranu hibridizacijsku mješavinu u polju plastične kadice tako da su oznake na traci okrenute prema gore.
4. Plastična kadica s trakama potom je inkubirana tijekom 30 minuta na temperaturi od 45 °C uz miješanje pri brzini od 300 okretaja u minuti uz pomoć termostatirane orbitalne tresilice.
5. Po završetku inkubacije hibridizacijska je mješavina uklonjena iz polja u plastičnoj kadici pomoću vakuum sisaljke, a na hibridizacijskim trakama su zaostali vezani biotinilirani umnoženi produkti.
6. Kako bi se uklonili ostaci hibridizacijske mješavine, trake su odmah isprane tijekom 10 s dodatkom 1 mL priložene otopine za ispiranje A, prethodno zagrijane na temperaturu od 45 °C u vodenoj kupelji, u svako polje plastične kadice te je tekućina uklonjena vakuum sisaljkom.
7. Trake su zatim još dvaput isprane dodatkom 1 mL iste otopine u svako polje plastične kadice i inkubacijom tijekom 15 min na temperaturi od 45 °C uz miješanje pri brzini od 300 okretaja u minuti uz pomoć termostatirane orbitalne tresilice. Na kraju svake inkubacije otopina za ispiranje uklonjena je vakuum sisaljkom.
8. Nakon ispiranja u svako je polje na traku dodan 1 mL priložene otopine konjugata koja sadrži streptavidin konjugiran s enzimom alkalnom fosfatazom.
9. Plastična kadica s trakama inkubirana je tijekom 15 min na sobnoj temperaturi uz miješanje pri brzini od 300 okretaja u minuti uz pomoć termostatirane orbitalne tresilice.
10. Nakon završetka inkubacije je uklonjena otopina konjugata iz polja u plastičnoj kadici pomoću vakuum sisaljke.

11. Kako bi se uklonili ostaci otopine konjugata, trake su isprane tijekom 10 s dodatkom 1 mL priložene otopine za ispiranje B u svako polje plastične kadice te je tekućina uklonjena vakuum sisaljkom.
12. Trake su još dvaput isprane dodatkom 1 mL iste otopine u svako polje plastične kadice i inkubacijom tijekom 5 min na sobnoj temperaturi uz miješanje pri brzini od 300 okretaja u minuti uz pomoć termostatirane orbitalne tresilice. Na kraju svake inkubacije otopina za ispiranje uklonjena je vakuum sisaljkom.
13. Konačno, u svako polje je dodan 1 mL priložene otopine za razvijanje boje koja sadrži supstrat za enzim alkalnu fosfatazu.
14. Plastična kadica s trakama inkubirana je tijekom 15 min na sobnoj temperaturi u mraku uz miješanje pri brzini od 300 okretaja u minuti uz pomoć poklopljene termostatirane orbitalne tresilice. Tijekom inkubacije došlo je do stvaranja ljubičastih vrpci na određenim mjestima na traci gdje su prethodno hibridizirani umnoženi produkti.
15. Test trake su nakon razvijanja boje nekoliko puta isprane sterilnom destiliranom vodom, osušene na staničevini u mraku i zatim pričvršćene ljepljivom trakom na odgovarajuća mjesta u priloženom obrascu za očitavanje rezultata.

Očitavanje rezultata

Konačan rezultat genotipizacije očitan je pomoću računalnoga programa StripAssay ® Evaluator, verzija 2.9.2015.904 (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija) i skenera CanoScan LiDE220 (Canon, Tokio, Japan) te dodatno provjeren ručnim vizualnim očitanjem prema uputi priloženoj u kompletu (Slika 2.).



Slika 2. Očitanje hibridizacijskih trakica A i T pomoću računalnoga programa StripAssay ® Evaluator, verzija 2.9.2015.904 (ViennaLab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija). Genetičke analize eNOS -786 T/C i G894T, *LTA* C804A, *APOB*, *MTHFR* C677T i A1298C te haplotip EPCR nisu uključene u ovo ispitivanje. Za sve polimorfizme osim za *APOE* ε2-4 prisutnost samo jedne ljubičaste vrpce na traci na položaju pojedinoga alel-specifičnoga oligonukleotida označavala je homozigota za pojedini alel, a dvije ljubičaste vrpce označavale su heterozigota za svaki ispitivani polimorfizam. Genotip *APOE* ε2-4 očitan je prema zasebnoj uputi proizvođača kompleta. Pozitivna reakcija na položaju kontrolne vrpce ukazuje na uspješnost kromogene reakcije.

3.2.4. Dokazivanje polimorfizama HPA-2, HPA-3 i HPA-5

Polimorfizmi HPA-2, HPA-3 i HPA-5 dokazani su primjenom metode PCR u stvarnom vremenu (Q-PCR) s alel-specifičnim hidrolizirajućim fluorescentno obilježenim sondama koje omogućuju alelnu diskriminaciju temeljenu na TaqMan™ tehnologiji prema Ficko i sur. (221) uz modifikacije u odnosu na izvorni protokol za HPA-2 na način da su smanjene koncentracije F i R početnica, a povećane koncentracije sondi za oba alela čime je postignuta bolja alelna diskriminacija.

Metoda podrazumijeva korištenje enzima DNA-polimeraze Taq, nizvodne početnice (engl. *forward*, F) i uzvodne početnice (engl. *reverse*, R) specifične za ciljni polimorfni slijed DNA i dvije fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde komplementarne pojedinom alelu što će omogućiti razlikovanje alela a od alela b. Na 5' kraj pojedine sonde vezana je različita fluorescirajuća izvjestiteljska (engl. *reporter*) boja, a na 3' kraju obje sonde je vezan prigušivač koji nema mogućnost fluorescencije (engl. *nonfluorescent quencher*, NFQ) zbog

kojega se umanjuje pozadinska fluorescencija i povećava osjetljivost i preciznost prilikom razlikovanja alela. NFQ je također konjugiran s molekulom koja se veže za mali utor uzvojnice DNA (engl. *minor groove binder*, MGB) koja uzrokuje čvršće vezanje sonde za kalup DNA što povećava temperaturu taljenja (engl. *melting temperature*, Tm) sonde s vezanog fragmenta DNA, omogućuje korištenje kraćih sljedova sonde i time doprinosi boljem razlikovanju alela.

Kad laserska zraka tijekom ciklusa PCR-a pobudi cjelovitu nevezanu sondu u otopini, prigušivač koji se nalazi u neposrednoj blizini izvjestiteljske boje zbog Försterovoga rezonantnog prijenosa energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) utišava fluorescenciju koju emitira izvjestiteljska boja. Tijekom faze sljepljivanja početnica nizvodna i uzvodna početnica vežu se za komplementaran slijed na kalupu DNA. U toj fazi moguće je i vezanje sondi za komplementaran slijed u kalupu DNA. Tijekom faze produljivanja DNA-polimeraza Taq ugrađuje nukleotide i produljuje početnice do nastanka novoga produkta umnažanja te svojom 5' – 3' egzonukleaznom aktivnošću hidrolizira vezanu sondu pri čemu se prigušivač udaljava od izvjestiteljske boje pa dolazi do otpuštanja fluorescencije koju emitira fluorescirajuća boja. Ako ne postoji dio kalupa DNA koji je komplementaran sondi, ona se neće vezati i ostaje cjelovita, to jest, prigušivač pomoću FRET-a utišava fluorescenciju izvjestiteljske boje pa ne dolazi do otpuštanja fluorescencije. Nakon svakoga ciklusa umnažanja detektor u uređaju za PCR mjeri količinu oslobođene fluorescencije izvjestiteljske boje u odnosu na pasivnu referentnu boju karboksi-x-rodamin (ROX) i rezultat prikazuje kao normalizirani izvjestiteljski signal (Rn). Količina fluorescencije odražava trenutnu količinu fragmenata DNA u reakcijskoj otopini, zbog čega ova vrsta PCR-a nosi naziv PCR u stvarnom vremenu. Za alel a svih ispitivanih HPA korištena je sonda s izvjestiteljskom fluorescirajućom bojom 2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6 karboksifluorescein (VIC) dok je za alel b korištena sonda s izvjestiteljskom fluorescirajućom bojom 6-karboksifluorescein (FAM). Uređaj daje rezultat genotipizacije kao grafički prikaz alelne diskriminacije gdje je moguće razlikovanje homozigota za alel a kod kojih je zabilježen porast intenziteta fluorescencije izvjestiteljske boje VIC, homozigota za alel b kod kojih je zabilježen porast intenziteta fluorescencije izvjestiteljske boje FAM, i konačno heterozigotnih nositelja oba alela a i b kod kojih je zabilježen porast intenziteta fluorescencije obje izvjestiteljske boje u reakcijskoj smjesi. Kao pozitivne kontrole za svaki genotip korištene su DNA B-limfoblastoidnih staničnih linija (222).

Korišteni materijali:

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- MicroAmp pločice s 96 reakcijskih jažica i adhezivnom folijom (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za Q-PCR TaqMan™ 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- TaqMan™ Universal PCR Master Mix, 2 x koncentriran (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), pohranjen na +4 °C, sastoji se od:
    - DNA-polimeraze AmpliTaq Gold
    - deoksinukleozid-trifosfata (dNTP; dATP, dTTP, dCTP, dGTP i dUTP)
    - pasivne referentne boje ROX
    - optimalnoga pufera
- otopine oligonukleotidnih početnica, 10 µM, pohranjene na -20 °C (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
    - HPA-2F 5'- GAG CTC TAC CTG AAA GGC AAT GA -3'
    - HPA-2R 5'- TGT TGT TAG CCA GAC TGA GCT TCT -3'
    - HPA-3F 5'- GCC TGA CCA CTC CTT TGC C -3'
    - HPA-3R 5'- TGC GAT CCC GCT TGT GA -3'
    - HPA-5F 5'- CTT TCC AAA TGC AAG TTA AAT TAC CAG -3'
    - HPA-5R 5'- TGA CCT AAA GAA AGA GGA AGG AAG AGT -3'
- otopine oligonukleotidnih fluorescentno obilježenih MGB sondi, 10 µM, pohranjene na -20 °C, zaštićene od svjetla (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
    - HPA-2a 5'-VIC- CTC CTG ACG CCC ACA C -NFQ-3'
    - HPA-2b 5'-FAM- CTC CTG ATG CCC ACA C -NFQ-3'
    - HPA-3a 5'-VIC- CTG CCC ATC CCC A -NFQ-3'

- HPA-3b 5'-FAM- CTG CCC AGC CCC A -NFQ-3'
- HPA-5a 5'-VIC- CCT GTT TAC TAT CAA AGA G -NFQ-3'
- HPA-5b 5'-FAM- CCT GTT TAC TAT CAA AAA G -NFQ-3'

- destilirana sterilna voda

Postupak:

Reakcijska smjesa za jednoga ispitanika za svaki ispitivani HPA pripravljena je na ledu miješanjem odgovarajućih količina uzorka genomske DNA, prethodno razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju od 100 μg/mL, otopina F i R, otopina odgovarajućih MGB sondi specifičnih za pojedini alel (a ili b), TaqMan™ Universal PCR Master Mixa i destilirane sterilne vode do ukupnoga volumena od 20 μL prema protokolu u Tablici 17. Svi sastojci reakcijske smjese osim TaqMan™ Universal PCR Master Mix-a, koji je nježno promiješan prevrtanjem bočice, prije pipetiranja su promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim spušteni na dno epruvete kratkim centrifugiranjem u maloj stolnoj centrifugi. U svakoj seriji uzoraka za svaki polimorfizam korištene su i negativna kontrola bez kalupa DNA u kojoj je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane sterilne vode i tri pozitivne kontrole, po jedna za svaki genotip. Nakon pipetiranja reakcijskih smjesa na pločicu s 96 reakcijskih jažica, pločica je pokrivena adhezivnom folijom i centrifugirana na brzini od 1000 g tijekom jedne minute na temperaturi od 4 °C kako bi se sav sadržaj reakcijske smjese spustio na dno reakcijskih jažica i uklonili mjehurići.

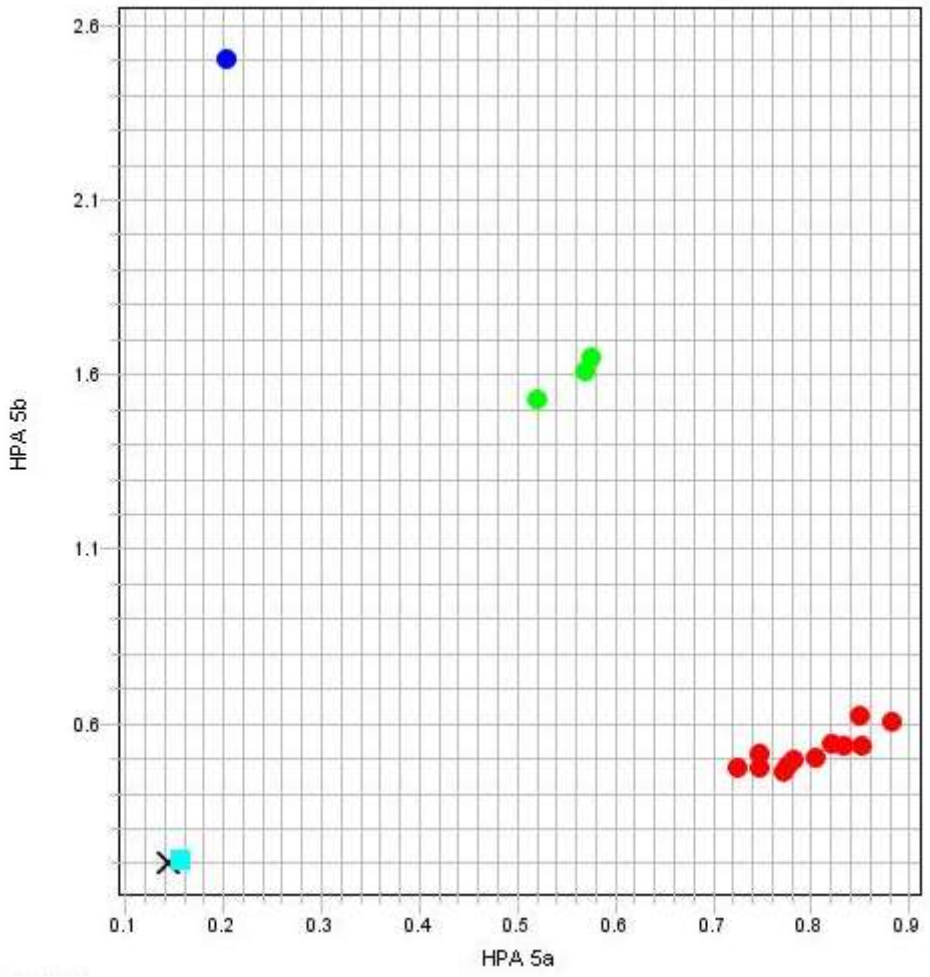
Tablica 17. Izrada PCR smjese za alelnu diskriminaciju polimorfizama HPA-2, -3 i -5.

Reagens	**HPA-2**		**HPA-3**		**HPA-5**	
	V (μL)	**C**	**V (μL)**	**C**	**V (μL)**	**C**
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	10	1 x	10	1 x	10	1 x
F	0,6	0,30 μM	1,80	0,90 μM	1,20	0,60 μM
R	0,6	0,30 μM	1,80	0,90 μM	1,20	0,60 μM
a sonda	0,35	0,175 μM	0,38	0,19 μM	0,32	0,16 μM
b sonda	0,35	0,175 μM	0,24	0,12 μM	0,18	0,09 μM
destilirana sterilna voda	7,10	/	4,78	/	6,10	/
genomska DNA	1	5 μg/mL	1	5 μg/mL	1	5 μg/mL

HPA – ljudski trombocitni aloantigeni, V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, PCR – lančana reakcija polimeraze, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica, DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

PCR reakcija provedena je u uređaju za Q-PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 10 min; 45 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 15 s i sljepljivanja početnica te produljenja početnica na 60 °C tijekom 1 min.

Nakon završetka PCR reakcije, provedena je detekcija završne točke (engl. *end point detection*) na istom uređaju te je kao rezultat dobiven grafički prikaz alelne diskriminacije iz kojeg je očitan rezultat genotipizacije za svakog ispitanika (Slika 3.). Umnažanje je smatrano uspješnim ako je do 30. ciklusa umnažanja nastala mjerljiva količina produkta, dok je u slučaju kasnog umnažanja ponovljena analiza za taj uzorak, po potrebi i s većom količinom kalupa DNA.



Slika 3. Grafički prikaz rezultata alelne diskriminacije na primjeru polimorfizma HPA-5. X os prikazuje intenzitet fluorescencije izvjestiteljske boje VIC, a Y os prikazuje intenzitet izvjestiteljske boje FAM. Svaki ispitivani uzorak prikazan je pomoću obojenog kruga. Crvenom bojom prikazani su uzorci ispitanika u kojima je bilježena fluorescencija samo izvjestiteljske boje VIC te su stoga ispitanici genotipizirani kao homozigoti za alel a (HPA-5 aa). Plavom bojom prikazani su uzorci ispitanika u kojima je bilježena fluorescencija samo izvjestiteljske boje FAM te su stoga ispitanici genotipizirani kao homozigoti za alel b (HPA-5 bb). Zelenom bojom prikazani su uzorci ispitanika u kojima je bilježena fluorescencija obje izvjestiteljske boje te su stoga ispitanici genotipizirani kao heterozigotni nositelji oba alela (HPA-5 ab). Svjetloplavim kvadratom obilježen je uzorak negativne kontrole. Križićem je označen uzorak čija genotipizacija nije uspjela.

3.2.5. Dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C

Dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C provedeno je metodom Q-PCR uz pomoć specifičnih početnica nakon koje je slijedila analiza krivulje taljenja (engl. *melting curve*, MC) na temelju prethodno objavljenih postupaka (223, 224).

Specifičnost umnoženih produkata utvrđena je analizom krivulje taljenja, a temelji se na prisutnosti tzv. HybProbe sonde u PCR smjesi koje su komplementarne genotipu jednog alela. Jednu HybProbe sondu zapravo čine dva fluorescentno obilježena hibridizirajuća oligonukleotida koji se vežu na umnoženi slijed tijekom faze sljepljivanja početnica PCR-a. Jedan oligonukleotid označen je na 5' kraju akceptorskom fluorescirajućom bojom, u ovom slučaju LightCycler® Red 640 (LCRed640), a 3' kraj je modificiran fosforilacijom (P) kako bi produljenje oligonukleotida bilo spriječeno. Drugi oligonukleotid je označen na 3' kraju donorskom fluorescirajućom bojom fluorescein (FL). U slučaju HybProbe sondi FRET između donorske i akceptorske boje je moguć samo kad su obje oligonkleotidne sonde u blizini, to jest, hibridizirane za ciljnu DNA, kada dolazi do fluorescencije akceptorske boje. To svojstvo se koristi u kvantifikaciji nastaloga produkta pomoću mjerenja fluorescencije u stvarnom vremenu tijekom faze sljepljivanja početnica, ali i u analizi krivulje taljenja sondi s umnoženog produkta.

Nakon provedenog PCR-a uz pomoć specifičnih početnica, umnoženi produkti se kratko denaturiraju porastom temperature i zatim naglo renaturiraju spuštanjem temperature. Tada se prisutne fluorescentno obilježene sonde vežu na umnožene produkte prilikom čega nastaju homodupleksi, ali i heterodupleksi u slučaju prisutnih promjena slijeda u umnoženom produktu. Nadalje, postupnim porastom temperature dolazi do denaturacije homodupleksa i heterodupleksa što uzrokuje za genotip karakterističnu mjerljivu promjenu fluorescentnog signala ovisnu o porastu temperature. Rezultat analize grafički se prikazuje kao derivacija fluorescencije uzoraka ovisna o porastu temperature, gdje se Tm sondi s umnožene ciljne DNA prikazuju kao pikovi za svaki uzorak. Promjene u slijedu za koji hibridizira oligonukleotidna sonda uzrokuju pomak Tm sonde s ciljne DNA na nešto nižu temperaturu, a time i promjenu fluorescencijskog signala prilikom analize krivulje taljenja, što omogućuje razlikovanje uzoraka čestoga homozigota (viša Tm homodupleksa), rijetkoga homozigota (niža Tm heterodupleksa) i heterozigota (prisutna dva pika koji odgovaraju Tm homodupleksa i heterodupleksa).

Po tri uzorka različitih genotipova, čiji je genotip potvrđen Sangerovim sekvenciranjem, korištena su u svrhu potvrde metode za pojedini polimorfizam, a heterozigot

je korišten kao pozitivna kontrola u svakoj seriji prilikom analize uzoraka nepoznatih genotipova.

3.2.5.1. Genotipizacija metodom Q-PCR-MC

Korišteni materijali:

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- LightCycler® 480 Multiwell pločice s 96 reakcijskih jažica i adhezivnom folijom (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za Q-PCR LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i LightCycler® 480 Software, verzija 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- LightCycler® 480 Genotyping Master (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), 5 x koncentriran, pohranjen na -20 °C, zaštićen od svjetla, sastoji se od:
    - modificirane DNA-polimeraze Taq
    - reakcijskoga pufera s 15 mM $MgCl_2$
    - dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP i dUTP)
- otopine oligonukleotidnih početnica, 10 µM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C
    - *ITGA2* 807 C/T-F 5'- AAT GAT TGT AGC AAC ATC CC -3'
    - *ITGA2* 807 C/T-R 5'- TTT AAC TTT CCC AGC TGC C -3'
    - *ITGA2* 873 G/A-F 5'- GCA AGT CTT TAT TTA ATT TTA TC -3'
    - *ITGA2* 873 G/A-R 5'- CTC AGT ATA TTG TCA TGG TTG -3'
    - *GP1BA* (-5) T/C-F 5'- GCA GGG GGA TCC ACT CAA -3'
    - *GP1BA* (-5) T/C-R 5'- GGT TGT GTC TTT CGG CAG G -3'

- otopine fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih sondi, 8 µM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C zaštićene od svjetla
    - *ITGA2* 807 C/T-S1 5'-LCRed640-TGT TTG TGA GGT CCC CAC CAT-ATT GG -Ph-3'
    - *ITGA2* 807 C/T-S2 5'- CTT GCA TAT TGA ATT GCT CCG AAT -Fl-3'
    - *ITGA2* 873 G/A-S1 5'- LCRed640-AAT GGT AGT TGT AAC TGA CGG-TGA AT -Ph-3'
    - *ITGA2* 873 G/A-S2 5'- GCG ACG AAG TGC TAC GAA AG -Fl-3'
    - *GP1BA* (-5) T/C-S1 5'-LC640- CCT CCT CTT GCT GCT CCT GCT GCC--Ph-3'
    - *GP1BA* (-5) T/C-S2 5'- CCA CAG GCC CTC ATG CCT C -Fl-3' (sonda je komplementarna rjeđem alelu u slučaju kojeg je očekivana Tm sonde veća)
- destilirana sterilna voda

Postupak:

Reakcijska smjesa za jednoga ispitanika za svaki ispitivani polimorfizam pripravljena je na ledu miješanjem odgovarajućih količina uzorka genomske DNA, prethodno razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju od 50 µg/mL, otopina F, R, S1 i S2, LightCycler® 480 Genotyping Master i destilirane sterilne vode do ukupnog volumena od 20 µL prema protokolu u Tablici 18. Svi sastojci reakcijske smjese osim LightCycler® 480 Genotyping Master-a, koji je nježno promiješan prevrtanjem bočice, prije pipetiranja su promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim svi spušteni na dno epruvete kratkim centrifugiranjem u maloj stolnoj centrifugi. U svakoj seriji uzoraka za svaki polimorfizam korištene su i negativna kontrola bez kalupa DNA u kojoj je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane sterilne vode i referentna pozitivna kontrola heterozigotnoga genotipa. Nakon pipetiranja reakcijskih smjesa na pločicu s 96 reakcijskih jažica, pločica je pokrivena adhezivnom folijom i centrifugirana na brzini od 1000 g tijekom jedne minute na temperaturi od 4 °C kako bi se sav sadržaj reakcijske smjese spustio na dno reakcijskih jažica i uklonili mjehurići.

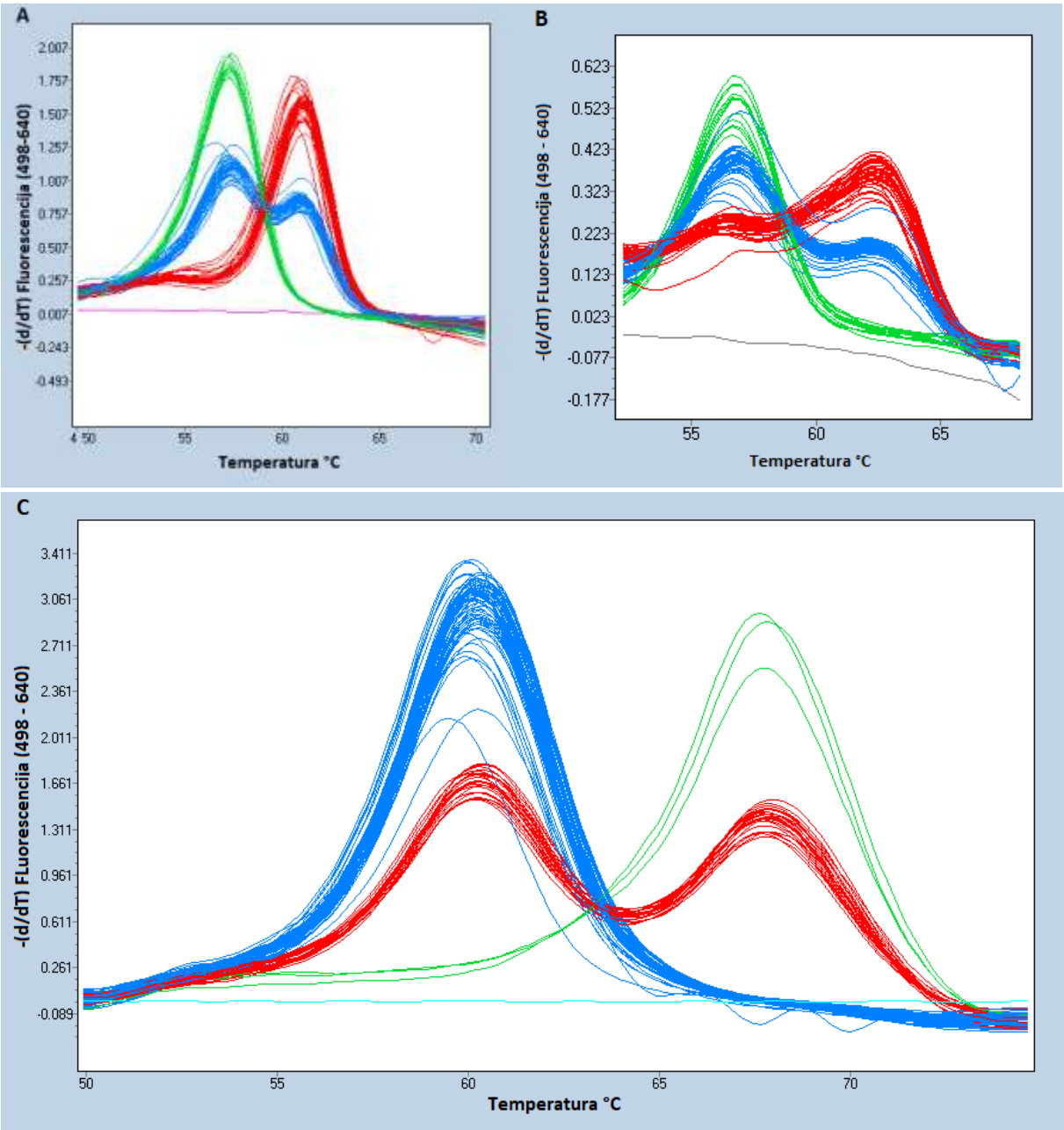
Tablica 18. Izrada Q-PCR-MC smjese za dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C.

Reagens	**V (µL)**	**C**
LightCycler® 480 Genotyping Master	4,0	1 x
F	1,0	0,5 µM
R	1,0	0,5 µM
S1	1,0	0,4 µM
S2	0,5	0,2 µM
destilirana sterilna voda	10,5	/
genomska DNA	2,0	5,0 µg/mL

V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica, S1 – sonda obilježena akceptorskom fluorescirajućom bojom, S2 – sonda obilježena donorskom fluorescirajućom bojom, DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

PCR reakcija provedena je u uređaju za Q-PCR uz pripadajući računalni program pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 10 min; 40 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 10 s, sljepljivanja početnica na 58 °C tijekom 10 s, kada je provedeno i mjerenje fluorescencije u svrhu praćenja količine umnoženih produkata, i zatim produljenja početnica na 72 °C tijekom 15 s. Odmah nakon završetka PCR-a provedeno je taljenje umnoženih produkata na istom uređaju pri sljedećim uvjetima: denaturacija na 95 °C tijekom 1 min, renaturacija i sljepljivanje sondi na 40 °C, postupno zagrijavanje do 85 °C uz kontinuirano mjerenje fluorescencije. Nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40 °C tijekom 10 s.

Analiza dobivenih krivulja taljenja provedena je uz pomoć računalnoga programa uz korišteni uređaj za Q-PCR. Rezultat genotipizacije za svakoga ispitanika očitan je iz grafičkoga prikaza derivacije fluorescencije uzoraka ovisne o porastu temperature, gdje se Tm sondi s umnožene ciljne DNA prikazuju kao pikovi za svaki uzorak (Slika 4.).

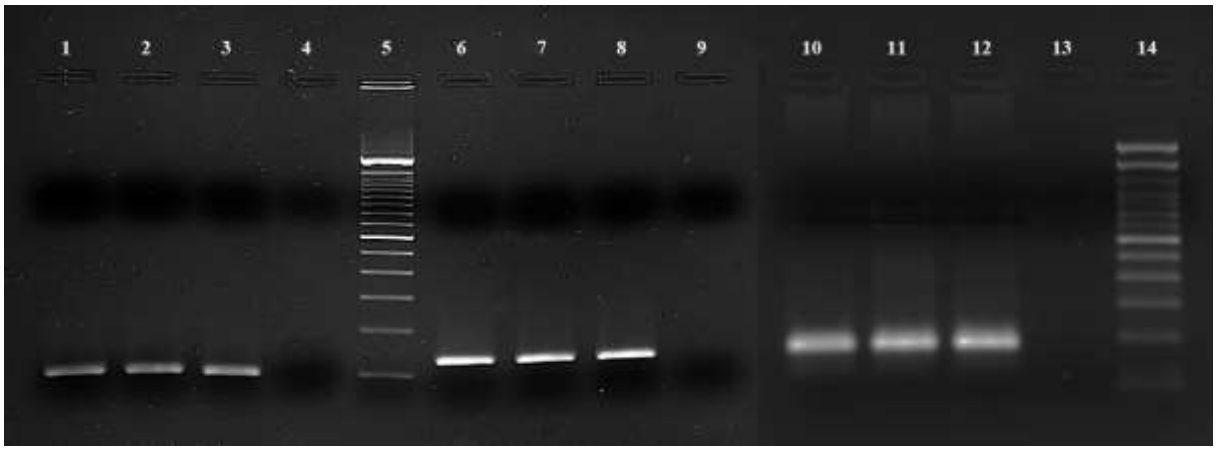


Slika 4. Rezultat genotipizacije metodom Q-PCR-MC. Prikazane su krivulje ovisnosti derivacije fluorescencije o temperaturi, to jest, derivirane krivulje taljenja. A, crvenom bojom prikazani su uzorci ispitanika genotipa *ITGA2* 807 CC (jedan fluorescencijski pik na 61 °C odgovara alelu C), zelenom bojom prikazani su uzorci ispitanika genotipa TT (jedan fluorescencijski pik na 67 °C odgovara alelu T), a plavom bojom prikazani su uzorci ispitanika genotipa CT (dva fluorescencijska pika na oko 57 i 61 °C odgovaraju pristunosti oba alela); B, u slučaju alela *ITGA2* 873G dobiva se fluorescencijski pik na temperaturi 63 °C (crveno), alela *ITGA2* 873A na temperaturi 57 °C (zeleno), a u heterozigota *ITGA2* 873 GA vidljiva su oba pika (plavo); C, u slučaju alela *GP1BA* (-5)T dobiva se fluorescencijski pik na temperaturi od oko 60 °C (plavo), alela *GP1BA* (-5)C na temperaturi od oko 68 °C (zeleno), a u heterozigota *GP1BA* (-5) TC vidljiva su oba pika (crveno).

3.2.5.2. Kontrolna elektroforeza umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC

Za uspješan postupak sekvenciranja, presudna je isključiva prisutnost specifičnih produkata. Odsutnost nespecifičnih produkata provjerena je kontrolnom elektroforezom 5 µL

umnoženoga produkta u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1 x puferu TBE uz pomoć sustava za horizontalnu elektroforezu uz biljeg molekularne mase od po 100 bp, te vizualizacijom rezultata uz pomoć UV kamere i pripadajućega računalnog programa, a prema postupku detaljno opisanom u potpoglavlju 3.2.3.2. (Slika 5). U slučaju polimorfizma *ITGA2* 807 C/T nastaje produkt veličine 273 bp, u slučaju *ITGA2* 873 G/A nastaje produkt veličine 169 bp, a u slučaju *GP1BA* (-5) T/C nastaje produkt veličine 191 bp.



Slika 5. Rezultat kontrolne elektroforeze umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC u svrhu utvrđivanja odsutnosti nespecifičnih produkata umnažanja prilikom genotipizacije polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A te *GP1BA* (-5) T/C. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri naponu od 120 V tijekom 30 minuta. 1-3, produkti umnažanja veličine 101 bp za genotipizaciju *ITGA2* 807 C/T; 6-8, produkti umnažanja veličine 133 bp za genotipizaciju *ITGA2* 873 G/A; ; 10-12, produkti umnažanja veličine 191 bp za genotipizaciju *GP1BA* (-5) T/C; 5 i 14, biljeg molekularne mase od po 100 bp; 4, 9, 13, negativna kontrola.

3.2.5.3. Sangerovo sekvenciranje umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC

Sangerovo sekvenciranje općenito se koristi kao zlatni standard za potvrdu rezultata genotipizacije pa je stoga korišteno i u ovome radu za potvrdu rezultata detekcije geskih varijanti. Sangerovo sekvenciranje se naziva i metodom prekida lanca (engl. *chain termination method*) jer se temelji na korištenju različito fluorescentno obilježenih dideoksinukleozid-trifosfata (ddNTP), čijom se nasumičnom ugradnjom tijekom faze produljivanja početnica u rastući lanac DNA onemogućuje daljnja sinteza lanca. Tako nastale fluorescentno obilježene produkte različitih veličina moguće je razdvojiti kapilarnom gel elektroforezom i očitati ciljnu sekvenciju.

Nakon kontrolne elektroforeze na 2 % agaroznom gelu u svrhu provjere specifičnosti produkata umnoženih novom metodom, provedeno je njihovo pročišćavanje od ostataka dNTP-ova, sondi, početnica i genomske DNA. Svaki pročišćeni produkt korišten je u daljnje dvije smjese za PCR s različito fluorescentno obilježenim nukleotidima od kojih je pojedina

umnažala samo kodirajući, odnosno, samo nekodirajući lanac jer je u smjesi korištena samo jedna početnica, F ili R. Za obilježeni PCR u svrhu sekvenciranja za sve polimorfizme korištene su iste početnice kao i za korištene metode. Uklanjanje ostataka neugrađenih fluorescentno obilježenih ddNTP-ova koji služe kao terminatori umnažanja, dNTP-ova, početnica, organskih otapala i soli koji mogu ometati daljnje korake, provedeno je pročišćavanjem dobivenih produkata. Takvi fluorescentno obilježeni i pročišćeni produkti različitih veličina bili su prikladni za razdvajanje kapilarnom gel elektroforezom, to jest, sekvenciranje kodirajućega i nekodirajućega lanca umnoženih produkata čime je potvrđen genotip odabranih uzoraka za svaki ispitivani polimorfizam sekvenciranjem kao referentnom metodom.

Korišteni materijali:

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 i 0,2 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- otopine oligonukleotidnih početnica korištene u novoj metodi, a u svrhu sekvenciranja razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na radnu koncentraciju 3,3 µM
- illustra™ ExoProStar™ reagens za pročišćavanje PCR produkta (GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD), pohranjen na -20 °C, sastoji se od mješavine enzima alkalne fosfataze i egzonukleaze
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit za obilježeni PCR (Life Technologies Corporation, Austin, Texas, SAD), pohranjen na -20 °C, sastoji se od:
    - BigDye™ Terminator v3.1 Ready reakcijske mješavine, zaštićene od svjetla, pohranjene na -20 °C, sadrži fluorescentno obilježene ddNTP-ove terminatore umnažanja koji omogućavaju sekvenciranje
    - pufera za sekvenciranje, 5 x koncentriranoga, pohranjenoga na +4 °C

- NucleoSEQ® komplet za pročišćavanje produkata za sekvenciranje (Machery-Nagel, Düren, Germany), sadrži kolone za pročišćavanje i epruvete za prikupljanje eluata
- MicroAmp pločice s 96 reakcijskih jažica i Septa pregradom za pločice (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- genetički analizator 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- Sequencing Analysis software, verzija 5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- destilirana sterilna voda

Postupak:

Pročišćavanje 15 µL produkta umnažanja provedeno je miješanjem sa 6 µL reagensa za pročišćavanje PCR produkta i inkubacijom tako pripremljenih uzoraka na termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima: pročišćavanje PCR produkata na temperaturi od 37 °C tijekom 15 minuta, inaktivacija enzima na temperaturi od 80 °C tijekom 15 minuta, hlađenje na 4 °C.

Smjesa za PCR s fluorescentno obilježenim nukleotidima za sekvenciranje pripremljena je na ledu miješanjem odgovarajućih količina pročišćenoga produkta umnažanja, BigDye® Terminator v3.1 Ready reakcijske mješavine, pufera za sekvenciranje i samo jedne F ili R početnice do ukupnoga volumena od 10 µL prema protokolu u Tablici 19. Svi sastojci reakcijske smjese osim BigDye® Terminator v3.1 Ready reakcijske mješavine, koja je nježno promiješana prevrtanjem bočice, prije pipetiranja su promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim svi spušteni na dno epruvete uz pomoć male stolne centrifuge.

Tablica 19. Izrada PCR smjese s fluorescentno obilježenim nukleotidima za nastanak umnoženih produkata prikladnih za sekvenciranje.

Reagens	V (µL)	C
BigDye® Terminator v3.1 Ready reakcijska mješavina	0,50	
pufer za sekvenciranje	1,75	1 x
F ili R	1,00	0,2 µM
pročišćeni PCR produkt	6,75	/

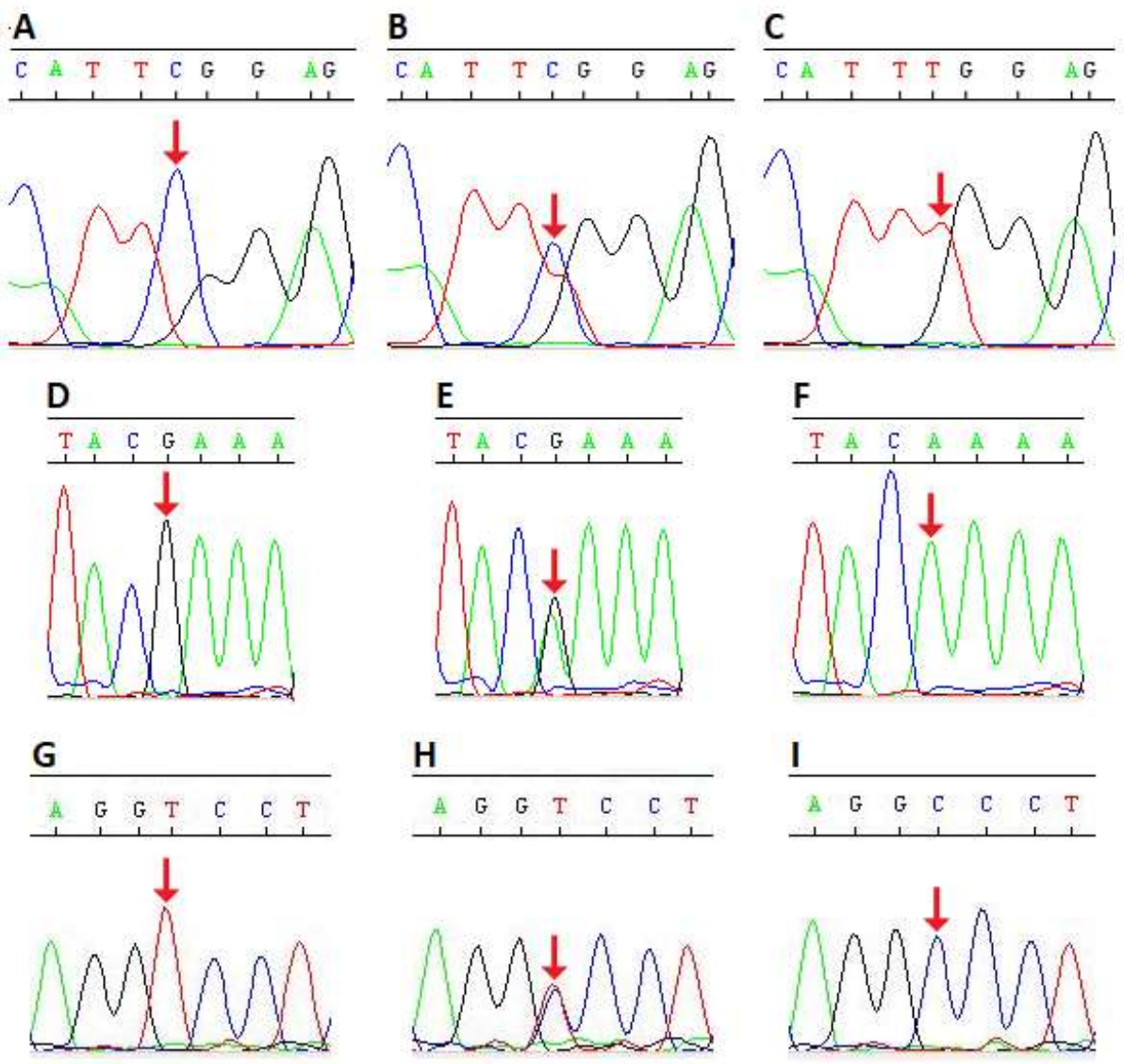
V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica, PCR – lančana reakcija polimeraze.

Umnažanje je provedeno u termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 96 °C tijekom 1 min; 25 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na

96 °C tijekom 10 s, sljepljivanja početnica na 50 °C tijekom 5 s i produljenja početnica na 40 °C tijekom 4 min; hlađenje na 4 °C.

Fluorescentno obilježeni produkti umnažanja za sekvenciranje, pročišćeni su pomoću kompleta za pročišćavanje produkata za sekvenciranje bez odstupanja od preporuka proizvođača. Kolone za pročišćavanje centrifugirane su na brzini od 750 g tijekom 30 s kako bi se punjenje spustilo na dno kolone i zatim hidrirane dodatkom 600 μL destilirane sterilne vode inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 30 min uz temeljito miješanje. Uklonjen je zaštitni poklopac na dnu kolone koja je zatim postavljena u epruvetu za skupljanje eluata i centrifugirana na brzini od 750 g tijekom 2 min kako bi se uklonio višak tekućine. Umnoženi produkt nanesen je na sredinu kolone koja je postavljena u novu sterilnu epruvetu od 1,5 mL i zatim centrifugirana na brzini od 750 g tijekom 5 minuta, nakon kojega se konačni pročišćeni umnoženi produkt nalazio u epruveti od 1,5 mL. Razdvajanje tako pročišćenih fluorescentno obilježenih produkata provedeno je kapilarnom gel elektroforezom uz pomoć genetičkoga analizatora, a prema uputama proizvođača instrumenta. Dobivena sekvencija nukleotida za pojedini uzorak očitan je uz pomoć pripadajućega računalnog programa.

Rezultati sekvenciranja, a time i točan genotip analiziranih uzoraka, očitani su ručno prema referentnim sekvencijama *ITGA2* (225) i *GP1BA* (226), uz pomoć podataka o položajima početnica i točnom položaju polimorfizama *ITGA2* 807 C/T (227) i 873 G/A (228) te *GP1BA* (-5) T/C (229) dostupnim u bazama podataka GenBank i dbSNP na mrežnim stranicama NCBI-a (Slika 6).



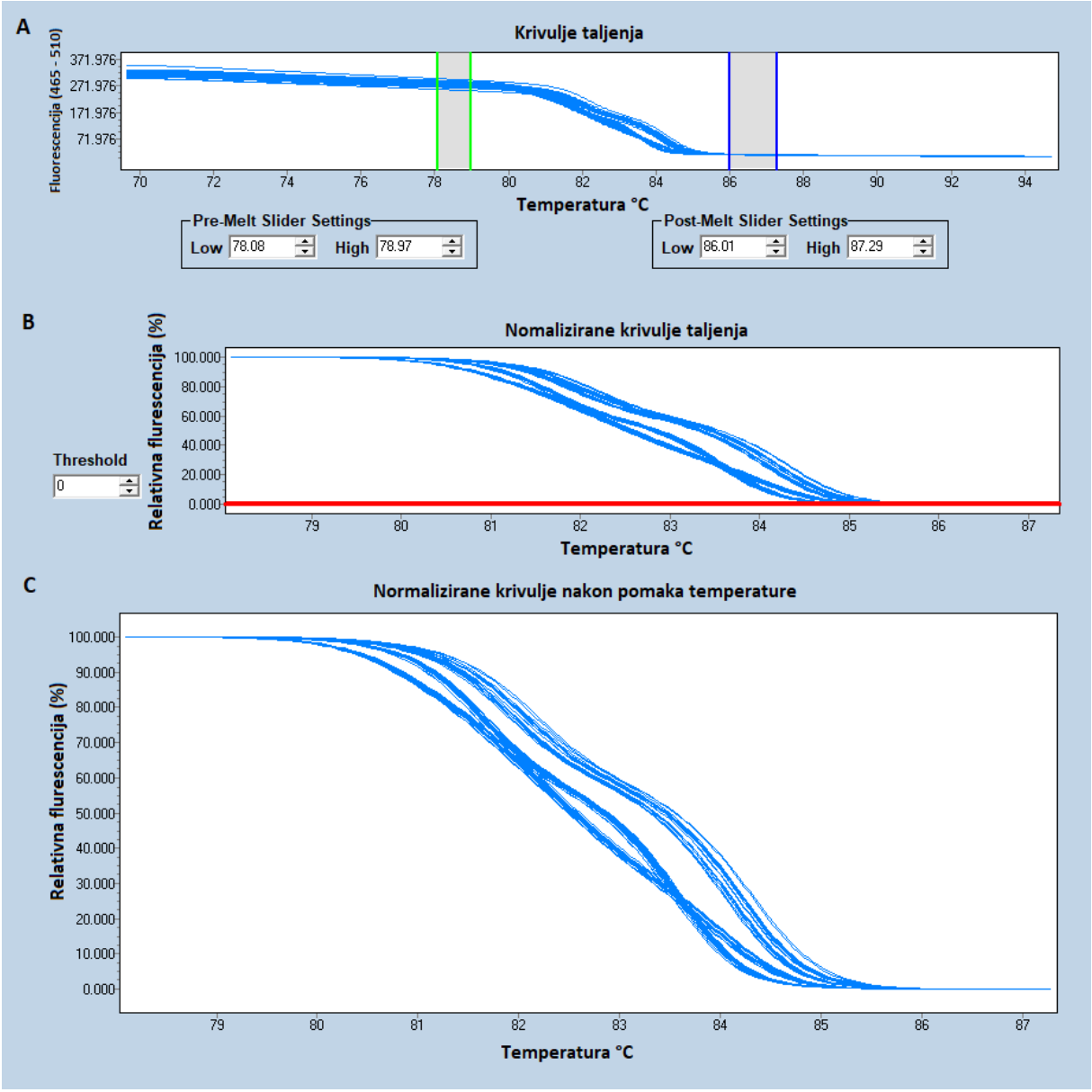
Slika 6. Rezultat sekvenciranja umnoženih produkata metodom Q-PCR-MC. A, B i C, uzorci genotipa *ITGA2* 807 CC, CT i TT; D, E i F, uzorci genotipa *ITGA2* 873 GG, GA i AA; G, H i I, uzorci genotipa *GP1BA* (-5) TT, TC i CC.

3.2.6. Dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C

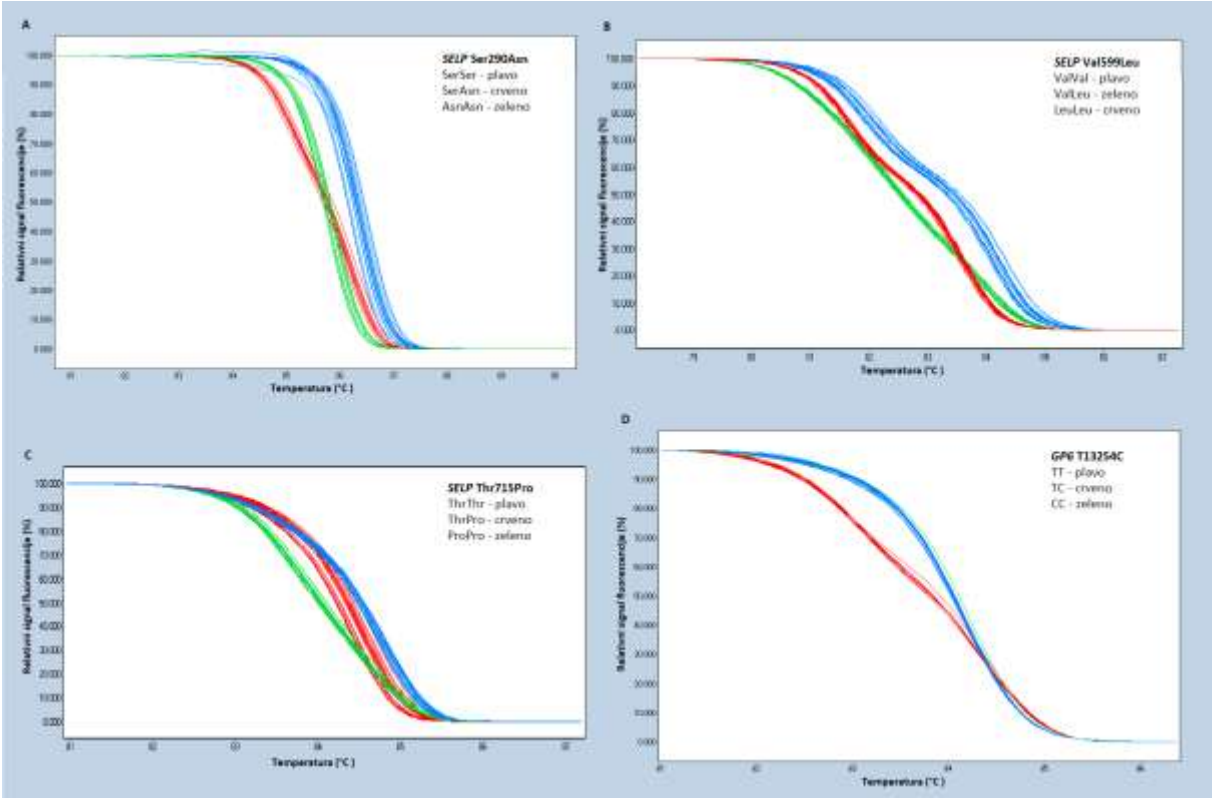
Dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C provedeno je metodom Q-PCR uz pomoć specifičnih početnica nakon koje je slijedila analiza krivulje taljenja visoke razlučivosti (engl. *high resolution melting*, HRM) (230).

HRM analiza temelji se na prisutnosti saturirajuće interkalirajuće boje u smjesi za PCR koja fluorescira samo kad je vezana na dvolančanu molekulu DNA, što omogućava

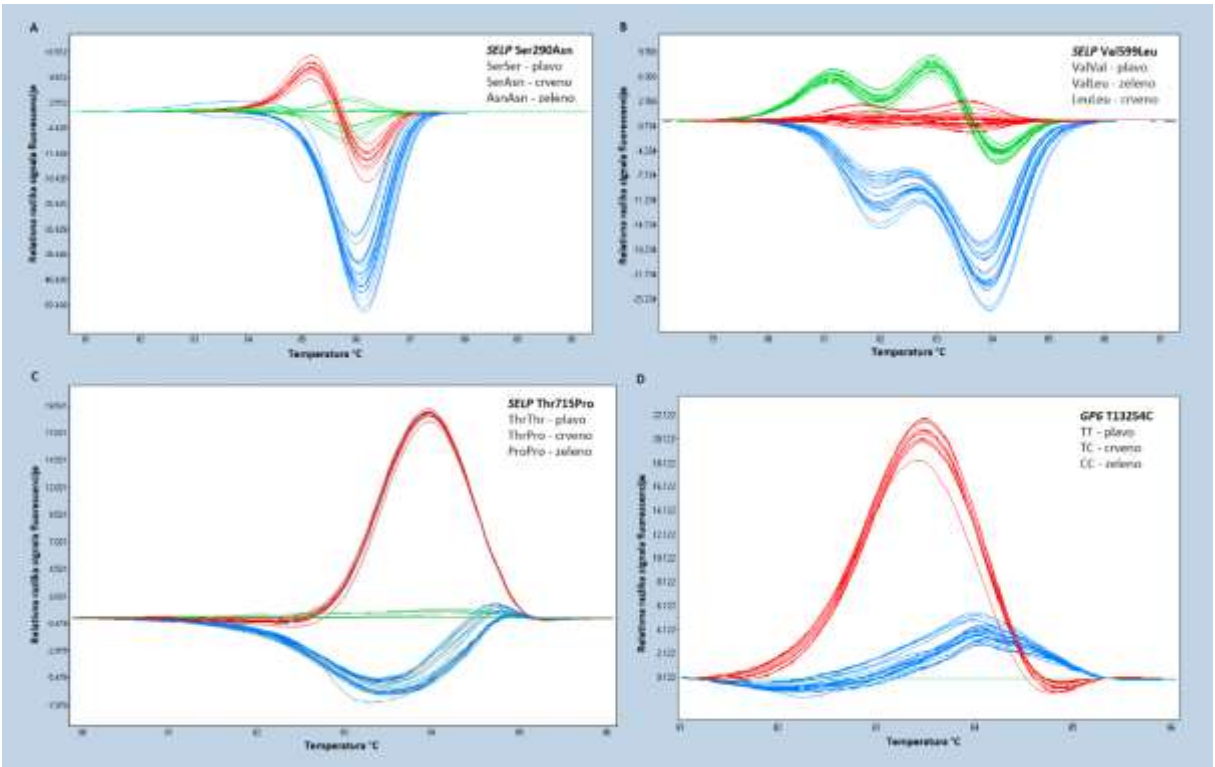
mjerenje fluorescencije tijekom faze produljivanja početnica i mjerenje krivulje taljenja umnoženoga produkta (231). Nakon provedenoga PCR-a uz pomoć specifičnih početnica, umnoženi produkti se kratko denaturiraju porastom temperature i zatim naglo renaturiraju spuštanjem temperature prilikom čega nastaju homodupleksi, ali i heterodupleksi u slučaju prisutnih promjena slijeda u umnoženoj sekvenciji. Nadalje, postupnim porastom temperature dolazi do denaturacije homodupleksa i heterodupleksa i posljedične disocijacije boje s DNA što uzrokuje karakterističnu mjerljivu promjenu fluorescentnog signala ovisnu o slijedu umnoženoga produkta. Iz tog su razloga različiti genotipovi karakterizirani različitim oblicima krivulje taljenja. Kako razlike karakteristične za pojedini genotip mogu biti diskretne, a dobivene se krivulje mogu preklapati, uspoređivanje dobivenih krivulja taljenja omogućuju posebni alati unutar pripadajućeg računalnoga programa koji omogućuju HRM analizu. Normalizacija dobivenih krivulja taljenja postavljanjem lijevog i desnog graničnika na linearne dijelove krivulja prije i nakon taljenja DNA omogućuje određivanje apsolutne razlike u količini fluorescencije ovisne o promjeni temperature, a tzv. pomak temperature (engl. *temperature shift*) postavljanjem donjeg graničnika omogućuje uklanjanje pozadinskih signala (Slika 7.). Iz dobivenih krivulja taljenja nakon Q-PCR-a, normalizacije i pomaka temperature (Slika 8.), očitava se rezultat HRM analize te se grafički prikazuje kao relativna razlika signala između krivulja taljenja različitih uzoraka ovisna o porastu temperature (Slika 9.). Na takvom prikazu uzorci se automatski grupiraju u pretpostavljene genotipove prema dobivenoj relativnoj razlici signala u odnosu na referentni uzorak, kontrolni uzorak koji je češći homozigot, uz odgovarajuću osjetljivost.



Slika 7. Prikaz normalizacije i pomaka temperature unutar HRM analize na primjeru genotipizacije *SELP* Val599Leu. A, prikaz normalizacije dobivenih krivulja taljenja; B, prikaz pomaka temperature dobivenih normaliziranih krivulja taljenja; C, prikaz dobivenih krivulja taljenja nakon Q-PCR-a, normalizacije i pomaka temperature.



Slika 8. Prikaz dobivenih krivulja taljenja nakon Q-PCR-a, normalizacije i pomaka temperature, a prije HRM analize u svrhu genotipizacije *SELP* Ser290Asn (A), Val599Leu (B) i Thr715Pro (C) te *GP6* 13254 T/C (D).



Slika 9. Grafički prikaz rezultata HRM analize u svrhu genotipizacije *SELP* Ser290Asn (A), Val599Leu (B) i Thr715Pro (C) te *GP6* 13254 T/C (D). Prikazane su krivulje ovisnosti relativne razlike signala fluorescencije o temperaturi nakon normalizacije i pomaka temperature.

Kako metoda HRM ne koristi specifične i skupe fluorescentno obilježene sonde komplementarne pojedinom genotipu, ali je stoga i manje specifična, pretežito se koristi za nespecifično ispitivanje prisutnosti polimorfizama unutar umnožene sekvencije (engl. *gene scanning*). Zbog visoke osjetljivosti metode moguće je dokazati specifične SNP-ove, ali je ključna pažljiva optimizacija svih čimbenika koji mogu utjecati na HRM analizu i uključivanje kontrolnih uzoraka čiji je točan genotip potvrđen sekvenciranjem.

Metoda Q-PCR-HRM korištena za dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro je temeljena na prethodnom sažetom priopćenju korištenja iste metode za genotipizaciju ovih polimorfizama, ali uz pomoć drukčijih reagenasa i *de novo* dizajniranih početnica za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Ser290Asn i Val599Leu budući da objavljene početnice nisu proizvodile očekivane produkte umnažanja niti pri opisanim, niti pri različitim isprobanim uvjetima (232). Nakon dizajniranja novih početnica, genotipizacija je potvrđena Sangerovim sekvenciranjem, a zbog niže specifičnosti korištene metode, provedena je i validacija za sva tri *SELP* polimorfizma u odnosu na prethodno korištenu metodu alel-specifičnoga PCR-a uz pomoć početnica specifičnoga slijeda (engl. *sequence specific primer*, SSP) (193, 230). U svrhu izrade ovoga doktorskog rada, na isti je način razvijena i validirana nova *in house* metoda za dokazivanje polimorfizma *GP6* 13254 T/C. Po tri uzorka različitih genotipova, čiji je genotip potvrđen sekvenciranjem, korištena su u svrhu optimizacije metode za pojedini polimorfizam i kao pozitivne kontrole u svakoj seriji prilikom analize uzoraka nepoznatih genotipova.

3.2.6.1. Dizajn početnica za Q-PCR-HRM

Početnice za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Ser290Asn i Val599Leu te *GP6* 13254 T/C dizajnirane su na temelju referentnih sekvencija *SELP* (NG_012125.2) (233) i *GP6* (NG_031963.2) (234) i podataka o točnoj lokaciji polimorfizma *SELP* Ser290Asn i Val599Leu te *GP6* 13254 T/C dostupnim u bazi podataka GenBank na mrežnim stranicama Nacionalnoga centra za biotehnološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI; Bethesda, Maryland, SAD) uz pomoć alata Primer-BLAST (235). Prilikom dizajniranja zadani su uvjeti da početnice obuhvaćaju pojedini polimorfizam, da njihova temperatura taljenja iznosi ~ 60 °C i da PCR-om nastaje produkt umnažanja veličine između 100 i 200 bp jer je male promjene u krivuljama taljenja, uzrokovane razlikama u slijedu, lakše uočiti uz pomoć HRM analize ako su umnoženi produkti kraći (236). Osim toga, alat ima mogućnost odmah provjeriti predložene parove početnica s obzirom na specifičnost

očekivanoga produkta umnažanja pri zadanim uvjetima, to jest, u odnosu na referentnu sekvenciju ljudskoga genoma. Sekvencije parova početnica su zatim pregledane te je za svaki polimorfizam odabran optimalan par prema procjeni Tm početnica i veličina očekivanoga umnoženog produkta.

3.2.6.2. Genotipizacija metodom Q-PCR-HRM

Korišteni materijali:

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- LightCycler® 480 Multiwell pločice s 96 reakcijskih jažica i adhezivnom folijom (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za Q-PCR LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i LightCycler® 480 Software, verzija 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- LightCycler® 480 HRM Master (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), pohranjen na -20 °C, zaštićen od svjetla, sastoji se od:
    - Master Mix, 2 x koncentriran, sastoji se od:
        - DNA-polimeraze FastStart Taq
        - reakcijskoga pufera
        - dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP i dUTP)
        - fluorescirajuće boje LightCycler® 480 ResoLight
    - otopina $MgCl_2$, 25 mM
- otopine oligonukleotidnih početnica, 4 µM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C
    - *SELP* Thr715Pro -F 5'- ATG AAC TGC TCC AAC CTC TG -3'

  - *SELP* Thr715Pro -R 5'- CCC ACA TGA AAA TTG TAC CTT -3'
- otopine oligonukleotidnih početnica, 4 µM (Metabion International AG, Planegg, Njemačka), pohranjene na -20 °C
  - *SELP* Ser290Asn -F 5'- CCT TGG TTA TTC TCT CCA GCT GTG C -3'
  - *SELP* Ser290Asn -R 5'- AGC CGG GCT GGC ACT CAA AT -3'
  - *SELP* Val599Leu -F 5'- TTG CAG GAG CCT CCC TTG TTA TGA A -3'
  - *SELP* Val599Leu -R 5'- GGT TCC CTG CCC AGG AGT GGT -3'
  - *GP6* 13254 T/C-F 5'- ACA GCG ACA GAG CAC AGA TT -3'
  - *GP6* 13254 T/C-R 5'- GAC CCT GCA GAA CCT ACC TG -3'
- destilirana sterilna voda

Postupak:

Reakcijska smjesa za jednoga ispitanika za svaki ispitivani polimorfizam pripravljena je na ledu miješanjem odgovarajućih količina uzorka genomske DNA, prethodno razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju od 10 µg/mL, otopina F i R, LightCycler® 480 HRM Master, otopine $MgCl_2$ i destilirane sterilne vode do ukupnoga volumena od 20 µL prema protokolu u Tablici 20. Svi sastojci reakcijske smjese osim LightCycler® 480 HRM Master Mix-a, koji je nježno promiješan prevrtanjem bočice, prije pipetiranja su promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim svi spušteni na dno epruvete uz pomoć male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka za svaki polimorfizam korištene su i negativna kontrola bez kalupa DNA u kojoj je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane sterilne vode i tri referentne pozitivne kontrole, po jedna za svaki genotip. Nakon pipetiranja reakcijskih smjesa na pločicu s 96 reakcijskih jažica, pločica je pokrivena adhezivnom folijom i centrifugirana na brzini od 1000 g tijekom jedne minute na temperaturi od 4 °C kako bi se sav sadržaj reakcijske smjese spustio na dno reakcijskih jažica i uklonili mjehurići.

Tablica 20. Izrada Q-PCR-HRM smjese za dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C.

Reagens	V (µL)	C
LightCycler® 480 HRM Master Mix	10,0	1 x
otopina $MgCl_2$	2,0	2,5 mM
F	1,0	0,2 µM
R	1,0	0,2 µM
destilirana sterilna voda	5,0	/
genomska DNA	1,0	0,5 µg/mL

V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, HRM – krivulja taljenja visoke razlučivosti, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica, DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

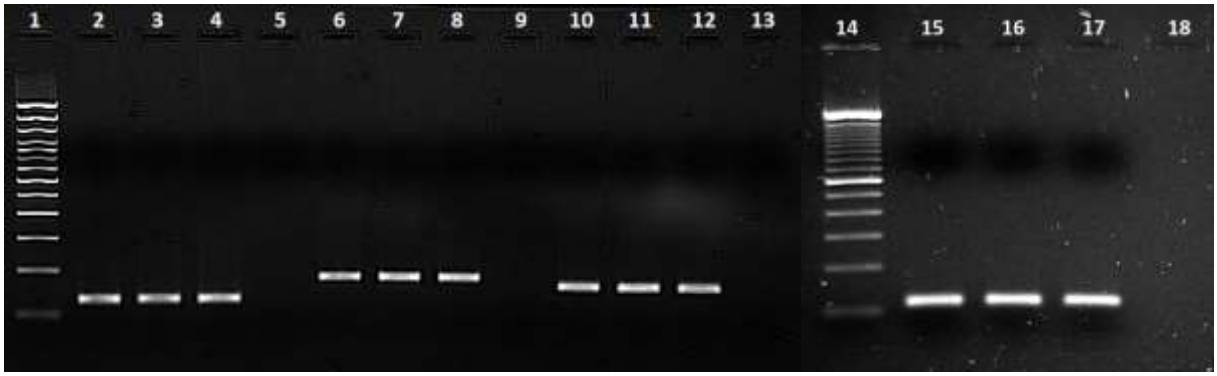
PCR je proveden u uređaju za Q-PCR uz pripadajući računalni program pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 10 min; 45 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 10 s, sljepljivanja početnica na 60 °C tijekom 15 s i produljenja početnica na 72 °C tijekom 25 s tijekom koje je provedeno mjerenje fluorescencije u svrhu praćenja količine umnoženih produkata. Odmah nakon završetka PCR-a provedeno je taljenje umnoženih produkata na istom uređaju pri sljedećim uvjetima: denaturacija na 95 °C tijekom 1 min, renaturacija i vezanje hibridizacijskih sondi na 40 °C tijekom 1 min, postupno zagrijavanje od 70 °C do 95 °C brzinom 0,02 °C/s uz kontinuirano mjerenje fluorescencije. Nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40 °C tijekom 10 s.

Prije HRM analize dobivenih krivulja taljenja za seriju uzoraka nepoznatih genotipa, provjerene su dobivene krivulje umnažanja za sve uzorke. Umnažanje je smatrano uspješnim ako je do 30. ciklusa umnažanja nastala mjerljiva količina produkta, dok je u slučaju kasnoga umnažanja ponovljena analiza za taj uzorak, po potrebi i s većom količinom kalupa DNA.

HRM analiza dobivenih krivulja taljenja provedena je uz pomoć računalnoga programa uz korišteni uređaj za Q-PCR. Nakon normalizacije krivulja i pomaka temperature, kao referentna krivulja taljenja za automatsko grupiranje u pretpostavljene genotipove za svaki genotip odabrana je krivulja taljenja kontrolnoga uzorka referentnoga genotipa, za *SELP* Ser290Asn korišten je genotip SS, za *SELP* Val599Leu genotip VV, za *SELP* Thr715Pro genotip TT, a za *GP6* 13254 T/C genotip TT, uz uobičajena osjetljivost od 0,3 za *SELP* Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C, dok je za *SELP* Ser290Asn po potrebi korištena niža osjetljivost. Rezultat genotipizacije za svakoga ispitanika očitan je iz grafičkoga prikaza relativnih razlika signala između krivulja taljenja različitih uzoraka ovisnih o promjeni temperature, ali i dodatno provjeren usporedbom krivulje za pojedinoga ispitanika s krivuljama za kontrolne referentne uzorke sva tri moguća genotipa (Slika 9.).

3.2.6.3. Kontrolna elektroforeza umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM

Za uspješnu HRM analizu, kao i postupak sekvenciranja, presudna je isključiva prisutnost specifičnih produkata. Odsutnost nespecifičnih produkata provjerena je kontrolnom elektroforezom 5 μL umnoženog produkta u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1 x puferu TBE uz pomoć sustava za horizontalnu elektroforezu uz biljeg molekularne mase od po 100 bp, te vizualizacijom rezultata uz pomoć UV kamere i pripadajućeg računalnog programa, a prema postupku detaljno opisanom u potpoglavlju 3.2.3.2. (Slika 10.).

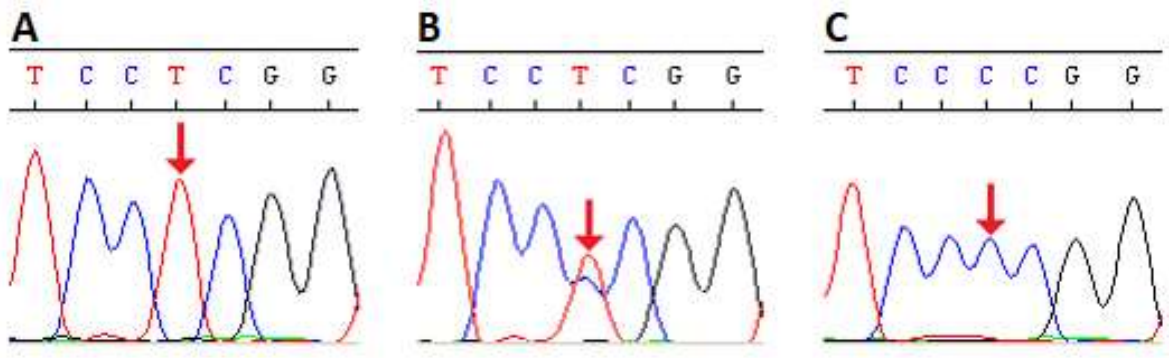


Slika 10. Rezultat kontrolne elektroforeze umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM u svrhu utvrđivanja odsutnosti nespecifičnih produkata umnažanja prilikom genotipizacije polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri naponu od 120 V tijekom 30 minuta. 1 i 14, biljeg molekularne mase od po 100 bp; 2-4, produkt umnažanja veličine 130 bp u tri uzorka različitih genotipa za genotipizaciju *SELP* Ser290Asn; 6-8, produkt umnažanja veličine 184 bp u tri uzorka različitih genotipa za genotipizaciju *SELP* Val599Leu; 10-12, produkt umnažanja veličine 163 bp u tri uzorka različitih genotipa za genotipizaciju *SELP* Thr715Pro; 15-17, produkt umnažanja veličine 114 bp u tri uzorka različitih genotipa za genotipizaciju *GP6* 13254 T/C; 5, 9, 13 i 18, negativna kontrola.

3.2.6.4. Sangerovo sekvenciranje umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM

Nakon početnog testiranja metode Q-PCR-HRM za genotipizaciju *GP6* 13254 T/C za sekvenciranje odabrana su tri uzorka svrstanih u tri različita genotipa, a koji su zatim poslužili kao kontrolni uzorci referentnoga genotipa za optimizaciju metode. Sekvenciranje je korišteno i kao referentna metoda za odabrane uzorke u svrhu ispitivanja analitičke osjetljivosti prilikom validacije metode Q-PCR-HRM za genotipizaciju istoga polimorfizma te za utvrđivanje točnoga genotipa uzoraka koji su dali nepodudarne rezultate genotipizacije *SELP* polimorfizama uz pomoć metoda PCR-SSP i Q-PCR-HRM prilikom ispitivanja analitičke osjetljivosti u sklopu validacije metode Q-PCR-HRM.

Sekvenciranje je provedeno prema postupku prethodno opisanom u potpoglavlju 3.2.5.3. Rezultati sekvenciranja, a time i točan genotip analiziranih uzoraka, očitani su ručno prema referentnim sekvencijama *SELP* (NG_012125.2) (233) i *GP6* (NG_031963.2) (234), uz pomoć podataka o položajima početnica i točnom položaju polimorfizama *SELP* Ser290Asn (237), Val599Leu (238) i Thr715Pro (239) te *GP6* 13254 T/C (240) dostupnim u bazama podataka GenBank i dbSNP na mrežnim stranicama NCBI-a (Slika 11).



Slika 11. Rezultat sekvenciranja umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM na primjeru genotipizacije polimorfizma *GP6* 13254 T/C. Budući da uređaj nema mogućnost očitavanja sekvencija kraćih od ~ 50 bp, prikazan je rezultat sekvenciranja samo jednog lanca jer se polimorfno mjesto nalazi blizu drugog kraja produkta. A, genotip TT; B, genotip TC; C, genotip CC.

3.2.6.5. Validacija metode Q-PCR-HRM

Plan validacije izrađen je prema internom laboratorijskom protokolu validacije metoda preuzetom i prilagođenom prema Standardima i smjernicama za kliničke genetičke laboratorije Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories*) (241).

U svrhu validacije metode Q-PCR-HRM za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro, odabrani su uzorci na temelju rezultata inicijalnoga genotipiziranja prethodno korištenom metodom PCR-SSP, a za validaciju iste metode za genotipizaciju polimorfizma *GP6* 13254 T/C, odabrani su uzorci na temelju rezultata inicijalnoga genotipiziranja istom metodom. Za svaki polimorfizam odabrana su po 3 uzorka različitoga genotipa za ispitivanje preciznosti. Ponovljivost je ispitana u seriji od 20 mjerenja, a međupreciznost (ponovljivost iz dana u dan) je ispitana tijekom 20 dana. Za ispitivanje točnosti, analitičke osjetljivosti i analitičke specifičnosti, odabrano je 20 uzoraka čestog homozigota, 10 heterozigota i 10 uzoraka rijetkoga homozigota za svaki polimorfizam, osim za *GP6* 13254 T/C, gdje su korištena 2 uzorka rijetkoga homozigota jer je samo u dva uzorka pretpostavljen genotip CC inicijalnom genotipizacijom pomoću metode Q-PCR-HRM.

Za određivanje analitičke osjetljivosti metode Q-PCR-HRM za određivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro, kao referentna metoda korišten je PCR-SSP (193). U slučaju nepodudarnih rezultata genotipizacije između metoda, točan genotip utvrđen je Sangerovim sekvenciranjem detaljno opisanom u potpoglavlju 3.2.6.4. Za

određivanje analitičke osjetljivosti metode Q-PCR-HRM za određivanje polimorfizma *GP6* 13254 T/C kao referentna metoda je izravno korišteno sekvenciranje.

Svi rezultati su iskazani kao postotak slaganja s 95 % intervalima pouzdanosti (CI), uz kriterij prihvatljivosti ≥ 95 % i prikazani u Tablici 21.

Tablica 21. Rezultati validacije metode Q-PCR-HRM za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C.

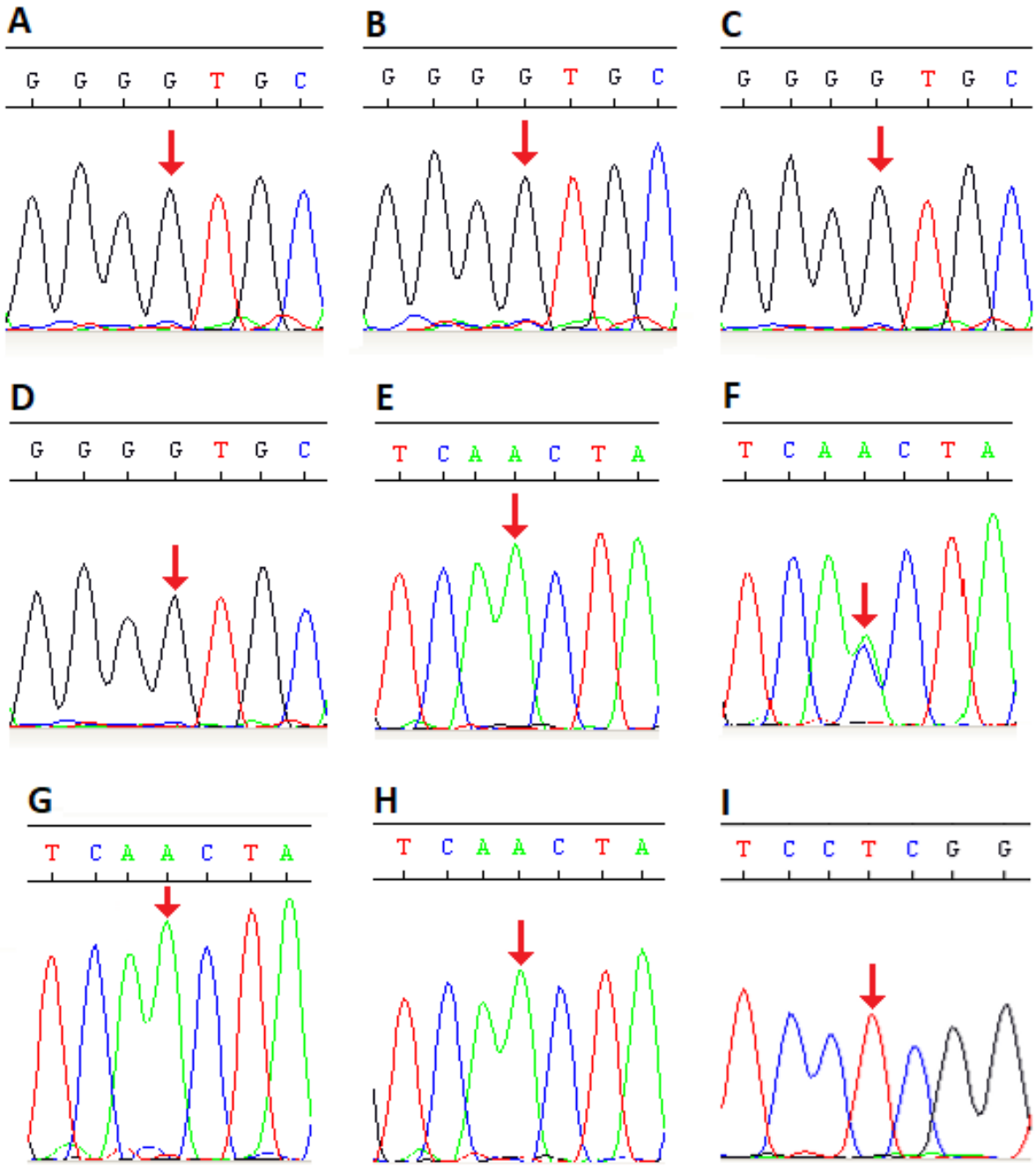
SNP	ponovljivost	međupreciznost	točnost	analitička osjetljivost	analitička specifičnost
	% slaganja (95 % CI)				
***SELP* Ser290Asn**	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)
***SELP* Val599Leu**	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	90 %* (76,3 – 97,2) 100 %** (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)
***SELP* Thr715Pro**	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	90 %* (76,3 – 97,2) 100 %** (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)
***GP6* 13254 T/C**	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	100 % (92,1 – 100)	96,9 % (83,8 – 99,9)	100 % (92,1 – 100)

SNP – polimorfizam jednoga nukleotida, CI – interval pouzadnosti, SELP – P-selektin, GP – glikoprotein, * – rezultat nakon inicijalne genotipizacije; ** – rezultat nakon ponovljene analize pomoću obje metode i sekvenciranja.

Za većinu ispitivanih parametara za sve polimorfizme dobiveno je 100 % slaganje rezultata (95 % CI = 92,1 % – 100 %) prilikom ispitivanja preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti i analitičke specifičnosti metode Q-PCR-HRM. Ispitivanje analitičke osjetljivosti za polimorfizam *SELP* Val599Leu otkrilo je četiri od 40 ispitanih uzoraka s nepodudarnim rezultatom genotipizacije. Naime, genotipizacija metodom PCR-SSP rezultirala je genotipom TT kod sva četiri uzorka, dok je metoda Q-PCR-HRM rezultirala genotipom GG. Slični rezultati dobiveni su i prilikom ispitivanja analitičke osjetljivosti za polimorfizam *SELP* Thr715Pro, gdje je također za četiri od 40 ispitanih uzoraka dobiven nepodudaran rezultati genotipizacije. Genotipizacija metodom PCR-SSP rezultirala je genotipom CC kod sva četiri uzorka, dok je metoda Q-PCR-HRM rezultirala s tri genotipa AA i jednim genotipom AC. Ispitivanje analitičke osjetljivosti za polimorfizam *GP6* 13254 T/C otkrilo je jedan od 32 ispitana uzorka s nepodudarnim rezultatom genotipizacije. Naime, genotipizacija metodom Q-PCR-HRM rezultirala je genotipom CC, dok je sekvenciranje rezultiralo genotipom TT (Slika 12.). Kako je tijekom provođenja ovoga istraživanja metodom Q-PCR-HRM utvrđen genotip

CC u samo dva ispitanika koja su uključena u validaciju, od kojih je jedan genotip korigiran nakon sekvenciranja, u slučaju korištenja ove metode i dobivanja genotipa CC preporuča se dobiveni rezultat potvrditi sekvenciranjem kao referentnom metodom.

Radi provjere zbunjujućih rezultata, uzorci upitnih genotipa ponovo su genotipizirani uz pomoć obje metode. Genotipizacija korištenjem Q-PCR-HRM metode za oba polimorfizma potvrdila je prethodno dobivene rezultate istom metodom. Međutim, PCR-SSP korišten za genotipizaciju Val599Leu rezultirao je svim genotipovima GG, a za Thr715Pro genotipizacija je rezultirala s tri genotipa AA i jednim genotipom AC, što je ukazalo na pogrešnu početnu genotipizaciju pomoću metode PCR-SSP. Da bi se ustanovio točan genotip, provedeno je dodatno Sangerovo sekvenciranje detaljno opisano u potpoglavlju 3.2.6.4. Rezultati sekvenciranja bili su u skladu s rezultatima dobivenim Q-PCR-HRM metodom (Slika 12.) na temelju kojih je korigiran rezultat analitičke osjetljivosti za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Val599Leu i Thr715Pro metodom Q-PCR-HRM.



Slika 12. Rezultat Sangerovog sekvenciranja umnoženih produkata metodom Q-PCR-HRM u svrhu genotipizacije polimorfizma *SELP* Val599Leu i Thr715Pro za uzorkE koji su dali nepodudarne rezultate u odnosu na metodu PCR-SSP te polimorfizma *GP6* 13254 T/C za jedan uzorak s nepodudarnim rezultatom genotipizacije. Polimorfno mjesto označeno je crvenom strelicom. Budući da uređaj nema mogućnost očitavanja sekvencija kraćih od ~ 50 bp, a polimorfno mjesto se nalazi blizu drugoga kraja produkta umnažanja, prikazan je rezultat sekvenciranja samo jednoga lanca uz pomoć F početnice. A-D, Kromatogrami sekvenciranja četiri uzorka nepodudarnih rezultata genotipizacije polimorfizma *SELP* Val599Leu. Ručnim pregledom je utvrđen genotip GG kod sva 4 uzorka; E-H, kromatogrami sekvenciranja četiri uzorka nepodudarnih rezultata genotipizacije polimorfizma *SELP* Thr715Pro. Ručnim pregledom je utvrđen genotip AA kod tri uzorka (E, G i H) i genotip AC kod jednoga uzorka (F); I, kromatogram sekvenciranja jednoga uzorka nepodudarnoga rezultata genotipizacije polimorfizma *GP6* 13254 T/C. Ručnim pregledom je utvrđen genotip TT.

Validacijom Q-PCR-HRM za genotipizaciju polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C utvrđeno je da je metoda precizna, točna specifična i osjetljiva, a da se u slučaju genotipa *GP6* 13254 CC preporuča potvrditi rezultat sekvenciranjem.

3.2.7. Dokazivanje polimofrizma *SELP* Asn562Asp

Dokazivanje polimorfizma *SELP* Asn562Asp provedeno je prethodno opisanom metodom alel-specifičnoga PCR-a uz pomoć SSP-a, nakon koje je slijedila analiza umnoženih produkata elektroforetskim razdvajanjem u 2 % agaroznom gelu (193).

Metoda podrazumijeva pripremu dvije reakcijske smjese za umnažanje za isti uzorak prilikom čega je F početnica u obje reakcijske smjese ista, dok je R početnica u jednoj reakcijskoj smjesi komplementarna slijedu DNA jednogaa alela (divljeg tipa), a R početnica u drugoj reakcijskoj smjesi komplementarna slijedu DNA drugoga alela (mutacija ili polimorfizam). Uz početnice za ispitivane alele, svaka reakcijska smjesa sadrži i par početnica koji umnaža dio kontrolnoga gena *β-globulin*. Rezultat genotipizacije očitava se nakon provedenoga PCR-a i elektroforetskoga razdvajanja umnoženih produkata u agaroznom gelu gdje je moguće razlikovanje homozigota za jedan alel kod kojih je zabilježen nastanak očekivanoga produkta samo u prvoj reakcijskoj smjesi, homozigota za drugi alel kod kojih je zabilježen nastanak očekivanoga produkta samo u drugoj reakcijskoj smjesi, i konačno, heterozigotnih nositelja oba alela kod kojih je zabilježen nastanak očekivanoga produkta u obje reakcijske smjese. Nastanak očekivanoga produkta umnažanja za kontrolni gen *β-globulin* koristi se kao pozitivna kontrola uspješnosti umnažanja u svakoj reakcijskoj smjesi. Kontrolni uzorci poznatih genotipova, dobiveni od autora metode (193), korišteni su kao pozitivna kontrola genotipizacije.

Korišteni materijali:

- otopine oligonukleotidnih početnica, 100 µM, pohranjene na -20 °C (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka)
    - Asn562Asp-F 5'- AAG TAG AAC TGT CTT AGC AAG TAC -3'
    - 562Asn-R 5'- CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TA -3'
    - 562Asp-R 5'- CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TG -3'
- otopine oligonukleotidnih početnica za kontrolni gen *β-globulin*, 10 µM, pohranjene na -20 °C (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka)

  - β-glob-F 5'- GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G -3'
  - β-glob-R 5'- GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG -3'
- DNA-polimeraza AmpliTaq aktivnosti 5 U/µL, pohranjena na -20 °C (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- 10 x PCR pufer I (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), sastoji se od:
  - Tris-HCl 100 mM, pH 8
  - KCl 500 mM
  - $MgCl_2$ 15 mM
- otopina dNTP-ova, 10 mM, (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- destilirana sterilna voda
- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL i 0,2 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- sustav za horizontalnu elektroforezu koji se sastoji od plastičnoga kalupa za izlijevanje gela i pripadajućega nosača, češljića za stvaranje jažica, kadice, poklopca s elektrodama i ispravljača (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- pufer TBE, 10 x koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 x uz pomoć destilirane sterilne vode, priprava opisana u potpoglavlju 3.2.3.2.
- agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- otopina etidijeva bromida 0,07 %, pohranjena na +4 °C (inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka)
- termostatirana magnetska mješalica TK22 (Kartell, New York, New York, SAD)
- pufer za nanošenje uzoraka, alikvotiran i pohranjen na +4 °C, priprava opisana u potpoglavlju 3.2.3.2.
- biljeg molekularne mase od po 100 bp, pohranjen na -20 °C (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)

- UV kamera G-BOX Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) i pripadajući računalni program GeneSys, verzija 1.6.1.0 (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)

Postupak:

Za jednoga ispitanika priređene su dvije reakcijske smjese, jedna za umnažanje alela *SELP* 562Asn i druga za umnažanje alela *SELP* 562Asp, miješanjem odgovarajućih količina uzoraka genomske DNA, po potrebi razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju od 150 – 200 μg/mL, DNA-polimeraze, 10 x PCR pufera I, otopine dNTP-ova, otopina početnica za kontrolni gen, otopine početnice Asn562Asp-F, otopine alel-specifične početnice 562Asn-R ili 562Asp-R, te destilirane sterilne vode do ukupnoga volumena od 10 μL prema protokolu u Tablici 22. Svi sastojci reakcijske smjese osim DNA-polimeraze su prije pipetiranja promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim spušteni na dno epruvete uz pomoć male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka korištena je i negativna kontrola bez kalupa DNA, u kojoj je umjesto uzorka dodan jednak volumen destilirane sterilne vode.

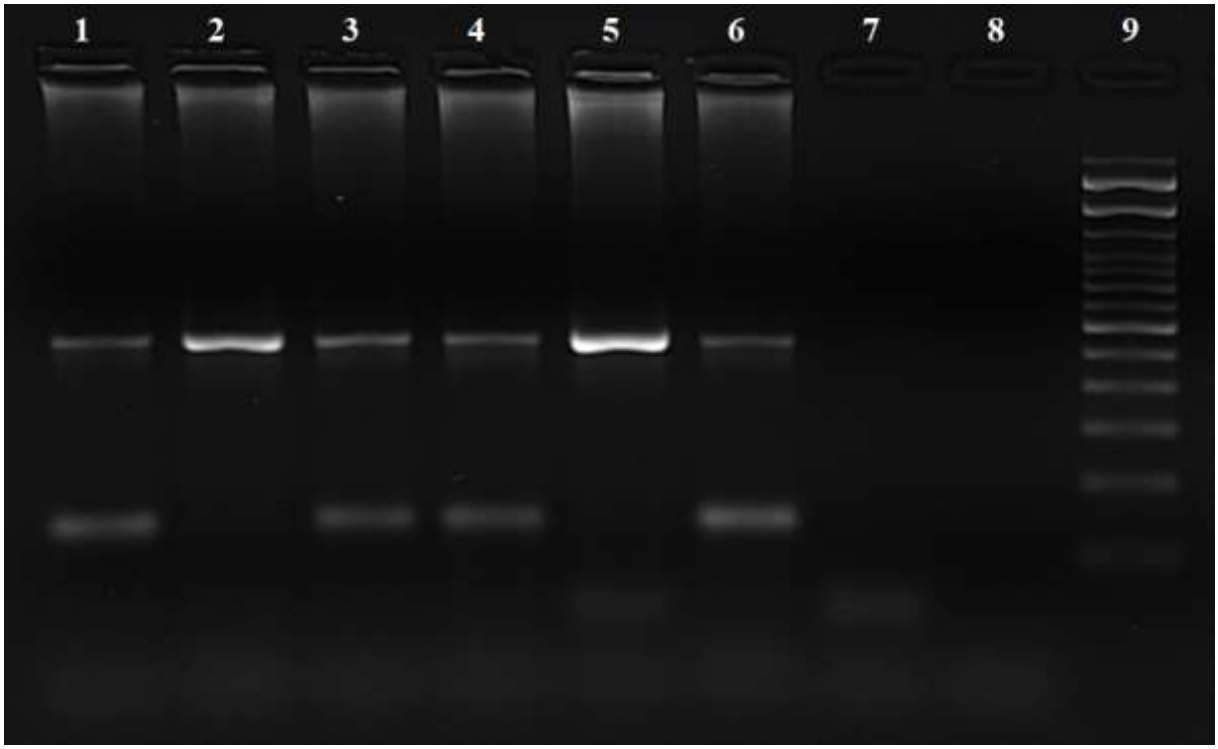
Tablica 22. Izrada PCR smjese za dokazivanje polimorfizma *SELP* Asn562Asp.

Reagens	V (μL)	C
10 x PCR pufer I	1,0	1 x
otopina dNTP-ova	0,8	0,2 mM
DNA-polimeraza AmpliTaq	0,1	0,05 U/μL
β-globin-F	0,2	0,2 μM
β-globin-R	0,2	0,2 μM
Asn562Asp-F	0,1	1,0 μM
562Asn-R ili 562Asp-R	0,1	1,0 μM
destilirana sterilna voda	6,5	/
genomska DNA	1,0	15 – 20 μg/mL

V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, PCR – lančana reakcija polimeraze, dNTP – deoksinukleozid-trifosfati, DNA – deoksiribonukleinska kiselina, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica.

Umnažanje je provedeno u termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 2 min; 10 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 10 s i sljepljivanja početnica na 65 °C tijekom 1 min; 20 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 10 s, sljepljivanja početnica na 61 °C tijekom 1 min i produljenja početnica na 72 °C tijekom 20 s; konačno produljenje početnica na 72 °C tijekom 10 min; hlađenje na 4 °C.

Razdvajanje umnoženih produkata ispitanika provedeno je elektroforezom u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1 x puferu TBE uz pomoć sustava za horizontalnu elektroforezu uz biljeg molekularne mase od po 100 bp i vizualizacijom rezultata uz pomoć UV kamere i pripadajućeg računalnog programa prema postupku detaljno opisanom u potpoglavlju 3.2.3.2. Prisutnost pojedinog alela *SELP* Asn562Asp utvrđen je prema očekivanom produktu umnažanja veličine 141 bp u pojedinoj reakcijskoj smjesi nakon čega je utvrđen genotip ispitanika, dok je prisustvo produkta umnažanja veličine 536 bp u svakoj reakcijskoj smjesi označavao uspješno umnožen dio gena kao unutarnje kontrole uspješnosti umnažanja (Slika 13.). Odsustvo očekivanog produkta umnažanja dijela kontrolnog gena ukazalo je na neuspješnu PCR reakciju za taj uzorak.



Slika 13. Rezultat elektroforetskoga razdvajanja umnoženih produkata metodom PCR-SSP u svrhu genotipizacije polimorfizma *SELP* Asn562Asp. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri naponu od 120 V tijekom 30 minuta. Prisutnost pojedinog alela *SELP* Asn562Asp utvrđen je prema očekivanom produktu umnažanja veličine 141 bp u pojedinoj reakcijskoj smjesi nakon čega je utvrđen genotip ispitanika, dok je prisustvo produkta umnažanja veličine 536 bp u svakoj reakcijskoj smjesi označavao uspješno umnožen dio gena kao unutarnje kontrole uspješnosti umnažanja. 1-2, uzorak genotipa AsnAsn; 3-4, uzorak genotipa AsnAsp; 5-6, uzorak genotipa AspAsp; 7-8, negativna kontrola; 9, biljeg molekularne mase od po 100 bp.

3.2.8. Dokazivanje polimorfizma *GP1BA* VNTR

Dokazivanje polimorfizma *GP1BA* VNTR provedena je prethodno opisanom metodom PCR-a pomoću specifičnih početnica, nakon koje je slijedila analiza umnoženih produkata elektroforetskim razdvajanjem u 2 % agaroznom gelu (171).

Metoda podrazumijeva umnažanje regije bogate GC parovima uz pomoć posebno prilagođenoga kompleta reagensa GC-RICH PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska). Rezultat genotipizacije očitava se nakon provedenoga PCR-a i elektroforetskoga razdvajanja umnoženih produkata u agaroznom gelu gdje je moguće razlikovanje pojedinih alela prema razlici u veličini nastalih PCR produkata ovisno o broju ponavljanja niza od 39 bp. Zbog nemogućnosti pribavljanja kontrolnih uzoraka, za potvrdu metode provedeno je sekvenciranje pet uzoraka različitih genotipa (BB, CC, BC, BD i CD) prema postupku prethodno opisanom u potpoglavlju 3.2.5.3. Rezultati za uzvodnu i nizvodnu sekvenciju su očitani ručno prema referentnoj sekvenciji NG_008767.2 (226) dostupnoj u bazi podataka GenBank na mrežnoj stranici NCBI-ja, a točan genotip analiziranih uzoraka utvrđen je temeljem razlika u broju ponavljanja niza od 39 bp unutar umnoženih sekvencija u odnosu na sekvenciju najučestalijega genotipa CC (rezultati nisu prikazani).

Korišteni materijali:

- otopine oligonukleotidnih početnica, 5 µM, pohranjene na -20 °C (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
    - VNTR-F 5'- ACA CTT CAC ATG GAA TCC AT -3'
    - VNTR-R 5'- GGG TCA TTT CTG GAG CTC TC -3'
- GC-RICH PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), pohranjen na -20 °C, sastoji se od:
    - enzimska mješavina termostabilnih DNA-polimeraza Taq i Tgo koja posjeduje 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, 2 U/µL,
    - pufer za PCR, 5 x koncentriran, sadrži 7,5 mM $MgCl_2$ i DMSO
    - rezolucijska otopina, 5 M (engl. *resolution solution*)
- otopina dNTP-ova, 10 mM, (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- destilirana sterilna voda
- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL i 0,2 mL

- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 µL i 0,1 – 10 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna mješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- sustav za horizontalnu elektroforezu koji se sastoji od plastičnoga kalupa za izlijevanje gela i pripadajućega nosača, češljića za stvaranje jažica, kadice, poklopca s elektrodama i ispravljača (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- pufer TBE, 10 x koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 x uz pomoć destilirane sterilne vode, priprava opisana u potpoglavlju 3.2.3.2.
- agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- otopina etidijeva bromida 0,07 %, pohranjena na +4 °C (inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka)
- termostatirana magnetska mješalica TK22 (Kartell, New York, New York, SAD)
- pufer za nanošenje uzoraka, alikvotiran i pohranjen na +4 °C, priprava opisana u potpoglavlju 3.2.3.2.
- biljeg molekularne mase od po 100 bp, pohranjen na -20 °C (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- UV kamera G-BOX Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) i pripadajući računalni program GeneSys, verzija 1.6.1.0 (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)

Postupak:

Reakcijska smjesa za jednoga ispitanika priređena je miješanjem odgovarajućih količina uzoraka genomske DNA, po potrebi razrijeđene destiliranom sterilnom vodom na koncentraciju 4 – 200 µg/mL, enzimske mješavine, rezolucijske otopine, pufera za PCR, otopine početnica VNTR-F i VNTR-R, otopine dNTP-ova, te destilirane sterilne vode do ukupnoga volumena od 25 µL prema protokolu u Tablici 23. Svi sastojci reakcijske smjese osim DNA-polimeraze su prije pipetiranja promiješani na vrtložnoj miješalici i zatim spušteni na dno epruvete uz pomoć male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka korištena je i

negativna kontrola bez kalupa DNA, u kojoj je umjesto uzorka dodan jednak volumen destilirane sterilne vode.

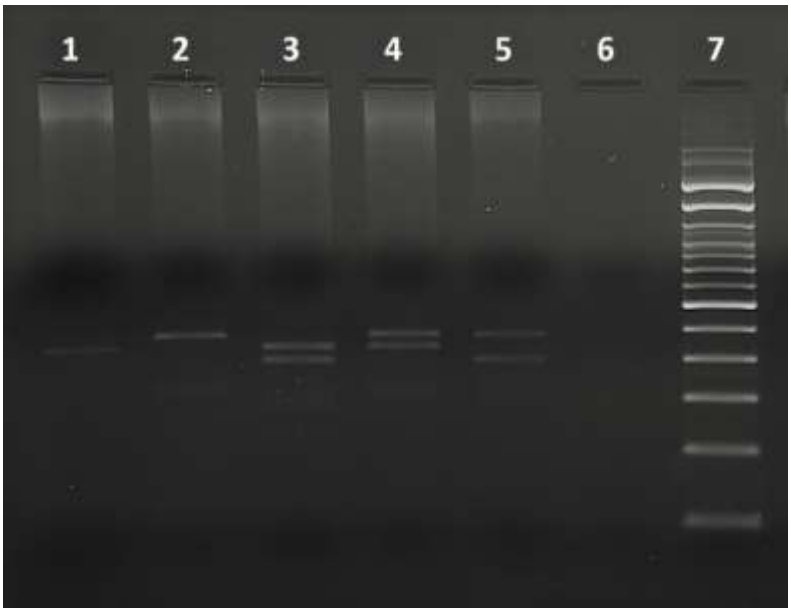
Tablica 23. Izrada PCR smjese za dokazivanje polimorfizma *GP1BA* VNTR.

Reagens	**V (µL)**	**C**
rezolucijska otopina	2,5	0,5 M
otopina dNTP-ova	2,0	0,8 mM
VNTR-F	1,0	0,2 µM
VNTR-R	1,0	0,2 µM
pufer za PCR	5,0	1 x
enzimska mješavina	0,5	0,04 U/µL
destilirana sterilna voda	10,5	/
genomska DNA	2,5	0,4 – 25 µg/mL

V – volumen, C – konačna koncentracija u PCR smjesi, PCR – lančana reakcija polimeraze, dNTP – deoksinukleozid-trifosfati, DNA – deoksiribonukleinska kiselina, F – uzvodna početnica, R – nizvodna početnica.

Umnažanje je provedeno u termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95 °C tijekom 3 min; 35 ciklusa umnažanja koji se sastoje od denaturacije na 95 °C tijekom 30 s, sljepljivanja početnica na 58 °C tijekom 30 s i produljenja početnica na 72 °C tijekom 45 s; konačno produljenje početnica na 72 °C tijekom 7 min; hlađenje na 4 °C.

Razdvajanje umnoženih produkata ispitanika provedeno je elektroforezom u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1 x puferu TBE uz pomoć sustava za horizontalnu elektroforezu uz biljeg molekularne mase od po 100 bp i vizualizacijom rezultata uz pomoć UV kamere i pripadajućega računalnog programa prema postupku detaljno opisanom u potpoglavlju 3.2.3.2. Prisutnost očekivanih produkata umnažanja veličine 479 bb u slučaju alela B, veličine 440 bp u slučaju alela C i 401 bp u slučaju alela D u pojedinoj reakcijskoj smjesi, korištena je za utvrđivanje genotipa *GP1BA* VNTR ispitanika (Slika 14.).



Slika 14. Rezultat elektroforetskoga razdvajanja umnoženih produkata metodom PCR u svrhu genotipizacije polimorfizma *GP1BA* VNTR. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri naponu od 120 V tijekom 45 minuta. 1, uzorak genotipa CC (440 bp); 2, uzorak genotipa BB (479 bp); 3, uzorak genotipa CD (440 i 401 bp); 4, uzorak genotipa BC (479 i 440 bp); 5, uzorak genotipa BD (479 i 401 bp); 6, negativna kontrola; 7, biljeg molekularne mase od po 100 bp.

3.3. Statistička obrada prikupljenih podataka

Ispitane su razlike u zastupljenosti dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i podtipovima testom usporedbe proporcija, dok su razlike između dječaka i djevojčica u dobi, izraženoj kao medijan i raspon, u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i podtipovima ispitane Mann-Whitneyevim testom u statističkom programu MedCalc, verzija 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

Učestalost pojedinih alela i genotipova za sve ispitivane polimorfizme u svim ispitivanim skupinama prikazani su kao postotak i broj. Deskriptivna analiza, ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže (razlika između dobivenih i očekivanih genotipova) i asocijacijska analiza genotipova za sve polimorfizme osim *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 provedeni su u programu za statističku analizu asocijacijskih studija SNPStats (Katalonski institut za onkologiju, Barcelona, Španjolska) koji analizira pojedinačne SNP-ove prema višestrukim modelima i haplotipove na temelju univarijatne logističke regresije uz mogućnost korekcije za kovarijable spol i dob koje mogu utjecati na rezultat statističkih analiza (242, 243).

Odabir najprikladnijega modela pojedinih genotipova za univarijatnu logističku regresiju proveden je u statističkom programu SNPStats pomoću parametra koji procjenjuje prediktivnu mogućnost pogreške i kvalitetu modela (engl. *Akaike information criterion,* AIC) pri čemu je kao najbolji model odabran dominantni model (usporedba heterozigotne i homozigotne varijante s homozigotnim divljim tipom). Zbog nižih, iako i dalje bliskih vrijednosti AIC, za pojedine polimorfizme je dodatno prikazan i recesivan (usporedba homozigotne varijante s heterozigotnom varijantom i homozigotnim divljim tipom) ili prekodominantni model (usporedba heterozigotne varijante s obje homozigotne varijable).

Budući da statistički program SNPStats nema mogućnost asocijacijske analize alela, genskih varijacija s više od tri moguća genotipa, ni mogućnost multivarijatne analize, analiza polimorfizma *GP1BA* VNTR i i *APOE* ε2-4, asocijacijska analiza alela i multivarijatna logistička regresija za polimorfizme u cijelosti su provedene u statističkom programu MedCalc, verzija 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgija) korištenjem logističke regresije. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 procijenjeno je pomoću χ^2 testa.

Za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 uz kodominantni model za svaki mogući genotip, dodatno je dizajnirano i ispitano po tri različita regresijska modela analize: jedan model u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na

referentni genotip (za *GP1BA* VNTR: BB + BD + CD + BC vs. CC; za *APOE* ε2/2 + ε2/3 + ε2/4 + ε3/4 + ε4/4 vs. ε3/3), te dva modela u kojima su s referentnim genotipom uspoređeni grupirani genotipovi koji sadrže pojedini alel u slučaju *GP1BA* VNTR (BB + BD + BC vs. CC i BD + CD vs. CC), to jest, haplotip u slučaju *APOE* ε2-4 (ε2/2 + ε2/3 + ε2/4 vs. ε3/3 i ε2/4 + ε3/4 + ε4/4 vs. ε3/3). Nadalje, za svaku skupinu ispitanika zasebno je analiziran model multivarijatne logističke regresije s kombinacijom polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije ishodili rezultat $P < 0,100$. Sve analize rađene u statističkom programu MedCalc nisu korigirane za kovarijable spol i dob zbog nepodudarnosti s rezultatima dobivenih u statističkom programu SNPStats, to jest, ograničenja korištenoga statističkog programa.

Ispitivani polimorfizmi su kombinirani prema kromosomskoj lokalizaciji te su odabrana i ispitana četiri potencijalna haplotipa smještenih na različitim kromosomima sastavljenih od više različitih polimorfizama kako slijedi:

I. haplotip *F5* 1601 G/A /HR2/*SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/Val599Leu/Thr715Pro na 1. kromosomu,
II. haplotip *ITGA2* 807 C/T /873 G/A /HPA-5 na 5. kromosomu,
III. haplotip *GP1BA* (-5) T/C /VNTR/HPA-1/HPA-2/HPA-3/*ACE* I/D na 17. kromosomu,
IV. haplotip *APOE* ε2-4/*GP6* 13254 T/C na 19. kromosomu.

Analiza odabranih haplotipova provedena je pomoću programa za statističku analizu asocijacijskih studija SNPStats (Katalonski institut za onkologiju, Barcelona, Španjolska) i statističko-programskoga jezika R, verzija 3.2.2. (R Core Team, Beč, Austrija), uz korekcije za spol i dob. Neravnoteža povezivanja (engl. *linkage disequlibrium*, LD; statistička korelacija između različitih polimorfizama lociranih na istome kromosomu koja opisuje vjerojatnost da se pojedini aleli češće nasljeđuju zajedno u populaciji) između različitih polimorfizama koji se nalaze na istom kromosomu ispitana je i prikazana pomoću parametra D', osim za povezanost polimorfizma *GP1BA* VNTR gdje nije moguće odrediti D' već je prikazan Cramerov V. Kao kriterij uključivanja najmanje dva polimorfizma u daljnju analizu haplotipova odabrana je najčešće korištena vrijednost u literaturi $D' > 0,800$, odnosno, Cramerov $V > 0,800$. Najčešće kombinacije alela korištene su kao referentni haplotipovi u analizi povezanosti pojedinoga haplotipa s pojavom IMU-a u djece i podtipova bolesti modelom logističke regresije u odnosu na kontrolnu skupinu.

Povezanost svakoga pojedinačnog alela, genotipa u univarijatnoj logističkoj regresiji, kombinacije polimorfizama u multivarijatnoj logističkoj regresiji i haplotipa s rizikom od

nastanka bolesti izražena je kao omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) s odgovarajućim 95 %-tnim intervalima pouzdanosti (engl. *confidence intervals*, CI). Prikazane su P vrijednosti prije i nakon provedene Benjamini-Hochbergove korekcije radi uklanjanja utjecaja višestrukog testiranja koje može značajno utjecati na dobivene rezultate genetičkih asocijacijskih studija (244–246). P vrijednosti < 0,050 smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike skupina ispitanika te raspodjela IMU-a i podtipova bolesti s obzirom na spol i dob

Karakteristike svih skupina ispitanika uključenih u ovo istraživanje, kao i rezultati ispitivanja razlike u zastupljenosti dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i podtipovima bolesti, te rezultati ispitivanja razlike u dobi dijagnoze između dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i podtipovima bolesti prikazani su u Tablici 24.

Tablica 24. Karakteristike skupina ispitanika.

Skupina ispitanika	**Djevojčice**		**Dječaci**		**P[a]**	**P[b]**
	N	Dob	N	Dob		
Kontrolna skupina	80	7 g (6 d – 18 g)	105	6 g (6 d – 18 g)	/	/
IMU	80	1 g 6 m (0 d – 18 g)	105	3 g 3 m (0 d – 17g 6 m)	**0,008***	0,314
AIMU	64	1 g 8 m (0 d – 18 g)	90	1 g 11 m (0 d – 17 g 6 m)	**0,004***	0,551
PAIMU	33	2 m 7 d (0 d – 12 g)	41	3 m (0 d – 9 g)	0,111	0,728
DAIMU	31	7 g 3 m (4 m 10 d – 18 g)	49	8 g (8 m – 17 g 6 m)	**< 0,001***	0,577
CSVT	16	1 g 5 m (8 d – 13 g 5 m)	15	6 g (9 d – 16 g 6 m)	0,840	0,275
KIMU	30	8 m (2 d – 9 g 10 m)	39	11 m (3 d – 16 g 8 m)	**0,024***	0,256
SIMU	16	3 g 10 m (15 d – 15 g)	27	5 g 2 m (14 d – 18 g)	**<0,001***	0,446

Dob je prikazana kao medijan i raspon, a izražena je u godinama (g), mjesecima (m), odnosno danima (d). Zbog nedostatka podataka o dobi dijagnoze i lokalizaciji IMU-a, prikazani su prikupljeni podaci za 29 djevojčica i 25 dječaka s PAIMU-om, 37 djevojčica i 26 dječaka s DAIMU-om, 14 djevojčica i 13 dječaka s CSVT-om, 25 djevojčica i 34 dječaka s KIMU-om te 12 djevojčica i 24 dječaka sa SIMU-om.

[a] – ispitivanje postojanja razlike u zastupljenosti dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i skupinama po podtipovima bolesti (korišten je test usporedbe proporcija), [b] – ispitivanje postojanja razlike u dobi dijagnoze između dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini ispitanika s IMU-om i skupinama po podtipovima bolesti (korišten je Mann-Whitneyjev test), / – nije primjenjivo, IMU – ishemijski moždani udar, AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, SVT – tromboza venskih sinusa mozga, * – statistički značajan rezultat.

Dobivena je statistički značajna razlika između zastupljenosti dječaka i djevojčica u ukupnoj skupini djece s IMU-om te podtipovima AIMU-a, DAIMU-a, KIMU-a I SIMU-a u vidu veće zastupljenosti dječaka, dok statistički značajna razlika nije uočena u podtipovima PAIMU-a i CSVT-a.

4.2. Povezanost pojedinačnih ispitivanih polimorfizama s IMU-om u djece i s podtipovima bolesti

U svrhu utvrđivanja kvalitete odabrane kontrolne skupine, prije samoga ispitivanja povezanosti odabranih polimorfizama s pojavom bolesti, ispitana je Hardy-Weinbergova ravnoteža u kontrolnoj skupini zasebno za svaki uključeni polimorfizam. Povezanost pojedinačnih ispitivanih polimorfizama s IMU-om u djece i s podtipovima bolesti ispitana je zasebno za svaki tip i podtip bolesti modelima univarijatne i multivarijatne logističke regresije uz korištenje uobičajenih modela analize (kodominantni, dominantni, recesivni, prekodominantni), a prema potrebi i alternativnih modela.

4.2.1. Ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini

Rezultati ispitivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini za sve ispitivane polimorfizme prikazani su u Tablici 25. zajedno s učestalosti pojedinih genotipova i alela u kontrolnoj skupini. Za polimorfizam *SELP* Asn562Asp dobiveno je odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije. Budući da je napravljeno ukupno 21 ispitivanje, vjerojatnost da će biti uočeno odstupanje kao rezultat slučajnosti je razmjerno velika (vjerojatnost dobivena binomnim testom za najmanje jedno odstupanje prilikom 21 ispitivanja iznosi 0,659) (247). Upravo radi uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih vrijednosti te je nastavljeno provođenje korekcije u daljnjoj statističkoj obradi gdje je primjenjivo. Nakon korekcije odbačeno je prethodno odstupanje za polimorfizam *SELP* Asn562Asp koji je zatim uključen u daljnju statističku obradu.

Tablica 25. Rezultati ispitivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže za ispitivane polimorfizme u kontrolnoj skupini.

polimorfizam	genotip	raspodjela genotipova % (N)	P^a	P^b
***F5* 1601 G/A**	GG GA	97,3 (180) 2,7 (5)	1,000	1,000
***F5* HR2**	AA AG GG	81,1 (150) 18,4 (34) 0,5 (1)	1,000	1,000
***F2* 20210 G/A**	GG GA	98,4 (182) 1,6 (3)	1,000	1,000

polimorfizam	genotip	raspodjela genotipova % (N)	P[a]	P[b]
***FGB* -455 G/A**	GG GA AA	49,7 (92) 42,7 (79) 7,6 (14)	0,720	1,000
***F13A1* Val34Leu**	GG GT TT	58,9 (109) 37,3 (69) 3,8 (7)	0,400	1,000
***SERPINE1* PAI-1 I/D**	5G5G 5G4G 4G4G	23,2 (43) 47,0 (87) 29,7 (55)	0,460	1,000
***ITGB3* HPA-1 a/b**	aa ab bb	74,1 (137) 24,3 (45) 1,6 (3)	1,000	1,000
***GP1BA* HPA-2 a/b**	aa ab bb	81,1 (150) 18,4 (34) 0,5 (1)	1,000	1,000
***ITGA2B* HPA-3 a/b**	aa ab bb	29,7 (55) 51,9 (96) 18,4 (34)	0,550	1,000
***ITGA2* HPA-5 a/b**	aa ab bb	79,5 (147) 19,5 (36) 1,1 (2)	1,000	1,000
***ITGA2* 807 C/T**	CC CT TT	35,7 (65) 46,7 (85) 17,6 (32)	0,650	1,000
***ITGA2* 873 G/A**	GG GA AA	35,4 (64) 47,0 (85) 17,7 (32)	0,760	1,000
***GP1BA* (-5) T/C**	TT TC CC	72,3 (133) 23,9 (44) 3,8 (7)	0,170	0,714
***GP1BA* VNTR**	CC CB CD BD BB	65,9 (110) 16,7 (28) 16,2 (27) 0,6 (1) 0,6 (1)	0,786	1,000
***GP6* 13254 T/C**	TT TC CC	76,6 (141) 23,4 (43) 0,0 (0)	0,140	0,777
***SELP* Ser290Asn**	GG GA AA	63,8 (118) 29,7 (55) 6,5 (12)	0,130	0,910
***SELP* Asn562Asp**	GG GA AA	20,3 (36) 60,5 (107) 19,2 (34)	**0,007***	0,147
***SELP* Val599Leu**	GG GT TT	80,0 (148) 19,5 (36) 0,5 (1)	0,700	1,000
***SELP* Thr715Pro**	AA AC CC	86,5 (160) 11,9 (22) 1,6 (3)	0,070	0,735

polimorfizam	genotip	raspodjela genotipova % (N)	P[a]	P[b]
***ACE* I/D**	II ID DD	23,8 (44) 50,3 (93) 25,9 (48)	1,000	1,000
APOE ε2-4	ε3/3 ε3/4 ε2/3 ε4/4 ε2/4 ε2/2	74,0 (131) 12,4 (22) 11,3 (20) 1,1 (2) 0,6 (1) 0,6 (1)	0,984	1,000

Korišten je Fisherov egzaktni test, osim za *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 gdje je korišten χ^2 test. Radi uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti.
[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, * – statistički značajan rezultat.

4.2.2. Pojedinačni polimorfizmi i IMU u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s IMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s IMU-om prikazani su u Tablici 26.

Tablica 26. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece s IMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti genotipova i alela s pojavom bolesti.

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s IMU-om	u kontrolnoj skupini			
F5	GG	93,0 (172)	97,3 (180)			
1601 G/A	GA	7,0 (13)	2,7 (5)	2,62 (0,87 – 7,87)	0,075	0,773
	G	96,5 (357)	98,6 (365)			
	A	3,5 (13)	1,4 (5)	2,66 (0,94 – 7,53)	0,066	0,734
F5	AA	78,7 (144)	81,1 (150)			
HR2	AG	20,8 (38)	18,4 (34)	1,45 (0,84 – 2,51)	0,180	0,773
	GG	5,0 (1)	0,5 (1)			
	A	89,1 (326)	90,3 (334)			
	G	10,9 (40)	9,7 (36)	1,14 (0,71 – 1,83)	0,593	0,775
F2	GG	97,3 (180)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	2,7 (5)	1,6 (3)	2,34 (0,53 – 10,32)	0,250	0,773
	G	98,6 (365)	99,2 (367)			
	A	1,4 (5)	0,8 (3)	1,68 (0,40 – 7,06)	0,482	0,775
FGB	GG	52,5 (96)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	42,6 (78)	42,7 (79)	0,98 (0,62 – 1,53)	0,920	0,980
	AA	4,9 (9)	7,6 (14)	0,46 (0,16 – 1,33)[c]	0,130[c]	0,773
	G	73,8 (270)	71,1 (263)			
	A	26,2 (96)	28,9 (107)	0,87 (0,63 – 1,21)	0,415	0,734

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s IMU-om	u kontrolnoj skupini			
F13A1 **Val34Leu**	GG	60,1 (110)	58,9 (109)			
	GT	34,4 (63)	37,3 (69)	1,21 (0,77 – 1,91)	0,410	0,826
	TT	5,5 (10)	3,8 (7)			
	G	77,3 (283)	77,6 (287)			
	T	22,7 (83)	22,4 (83)	1,01 (0,72 – 1,43)	0,937	0,937
SERPINE1 **PAI-1 I/D**	5G5G	24,6 (45)	23,2 (43)			
	5G4G	43,2 (79)	47,0 (87)	1,09 (0,64 – 1,84)	0,760	0,921
	4G4G	32,2 (59)	29,7 (55)			
	5G	46,2 (169)	46,8 (173)			
	4G	53,8 (197)	53,2 (197)	1,02 (0,77 – 1,37)	0,874	0,914
ITGB3 **HPA-1 a/b**	aa	70,3 (130)	74,1 (137)			
	ab	26,5 (49)	24,3 (45)	1,17 (0,71 – 1,92)	0,540	0,826
	bb	3,2 (6)	1,6 (3)			
	a	83,5 (309)	86,2 (319)			
	b	16,5 (61)	13,8 (51)	1,23 (0,82 – 1,85)	0,306	0,694
GP1BA **HPA-2 a/b**	aa	79,2 (145)	81,1 (150)			
	ab	19,7 (36)	18,4 (34)	1,16 (0,66 – 2,04)	0,600	0,826
	bb	1,1 (2)	0,5 (1)			
	a	89,1 (326)	90,3 (334)			
	b	10,9 (40)	9,7 (36)	1,14 (0,71 – 1,83)	0,593	0,775
ITGA2B **HPA-3 a/b**	aa	38,7 (70)	29,7 (55)			
	ab	43,6 (79)	51,9 (96)	0,64 (0,40 – 1,02)	0,061	0,760
	bb	17,7 (32)	18,4 (34)			
	a	60,5 (219)	55,7 (206)			
	b	39,5 (143)	44,3 (164)	0,82 (0,61 – 1,10)	0,187	0,694
ITGA2 **HPA-5 a/b**	aa	84,5 (152)	79,5 (147)			
	ab	14,4 (26)	19,5 (36)	0,61 (0,33 – 1,12)	0,110	0,760
	bb	1,1 (2)	1,1 (2)			
	a	91,7 (330)	89,2 (330)			
	b	8,3 (30)	10,8 (40)	0,75 (0,46 – 1,23)	0,257	0,694
ITGA2 **807 C/T**	CC	41,7 (73)	35,7 (65)			
	CT	44,0 (77)	46,7 (85)	0,91 (0,57 – 1,46)	0,690	0,863
	TT	14,3 (25)	17,6 (32)	0,78 (0,41 – 1,46)[c]	0,430[c]	0,826
	C	63,7 (223)	59,1 (215)			
	T	36,3 (127)	40,9 (149)	0,82 (0,61 – 1,11)	0,203	0,694
ITGA2 **873 G/A**	GG	40,9 (70)	35,4 (64)			
	GA	45,0 (77)	47,0 (85)	0,89 (0,55 – 1,44)	0,640	0,826
	AA	14,0 (24)	17,7 (32)	0,74 (0,39 – 1,41)[c]	0,360[c]	0,802
	G	63,5 (217)	58,8 (213)			
	A	36,5 (125)	41,2 (149)	0,82 (0,61 – 1,12)	0,210	0,694
GP1BA **(-5) T/C**	TT	76,2 (138)	72,3 (133)			
	TC	21,0 (38)	23,9 (44)	0,87 (0,53 – 1,45)	0,600	0,837
	CC	2,8 (5)	3,8 (7)	0,49 (0,12 – 1,96)[c]	0,290[c]	0,773
	T	86,7 (314)	84,2 (310)			
	C	13,3 (48)	15,8 (58)	0,82 (0,54 – 1,24)	0,338	0,694

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s IMU-om	u kontrolnoj skupini			
***GP1BA* VNTR**	CC	65,5 (114)	65,9 (110)			
	CB	17,2 (30)	16,7 (28)	1,03 (0,58 – 1,84)[d]	0,910[d]	0,974
	CD	13,2 (23)	16,2 (27)	0,82 (0,44 – 1,52)[d]	0,532[d]	0,837
	BD	2,3 (4)	0,6 (1)	3,86 (0,42 – 35,08)[d]	0,230[d]	0,797
	BB	1,7 (3)	0,6 (1)	2,89 (0,30 – 28,25)[d]	0,361[d]	0,802
				1,02 (0,65 – 1,59)[e]	0,946[e]	0,974
				1,19 (0,69 – 2,06)[f]	0,534[f]	0,837
				0,93 (0,52 – 1,68)[g]	0,811[g]	0,954
	C	80,7 (281)	82,3 (275)			
	B	11,5 (40)	9,3 (31)	1,26 (0,77 – 2,08)	0,358	0,694
	D	7,8 (27)	8,4 (28)	0,94 (0,54 – 1,64)	0,838	0,918
***GP6* 13254 T/C**	TT	75,0 (135)	76,6 (141)			
	TC	24,4 (44)	23,4 (43)	1,01 (0,59 – 1,71)	0,980	0,980
	CC	0,6 (1)	0,0 (0)			
	T	87,2 (314)	88,3 (325)			
	C	12,8 (46)	11,7 (43)	1,11 (0,71 – 1,73)	0,653	0,775
***SELP* Ser290Asn**	GG	68,1 (122)	63,8 (118)			
	GA	28,5 (51)	29,7 (55)	0,84 (0,52 – 1,35)	0,470	0837
	AA	3,4 (6)	6,5 (12)	0,53 (0,18 – 1,59)[c]	0,250[c]	0,797
	G	82,4 (295)	78,6 (291)			
	A	17,6 (63)	21,4 (79)	0,79 (0,54 – 1,14)	0,202	0,694
***SELP* Asn562Asp**	GG	20,9 (37)	20,3 (36)			
	GA	54,8 (97)	60,5 (107)	0,98 (0,56 – 1,72)	0,950	0,974
	AA	24,3 (43)	19,2 (34)	1,45 (0,84 – 2,50)[c]	0,190[c]	0,760
	G	48,3 (171)	50,6 (179)			
	A	51,7 (183)	49,4 (175)	1,09 (0,82 – 1,47)	0,548	0,775
***SELP* Val599Leu**	GG	82,1 (147)	80,0 (148)			
	GT	17,3 (31)	19,5 (36)	0,82 (0,46 – 1,46)	0,500	0,837
	TT	0,6 (1)	0,5 (1)			
	G	90,8 (325)	89,7 (332)			
	T	9,2 (33)	10,3 (38)	0,90 (0,55 – 1,47)	0,674	0,775
***SELP* Thr715Pro**	AA	82,9 (150)	86,5 (160)			
	AC	16,6 (30)	11,9 (22)	1,18 (0,63 – 2,21)	0,600	0,837
	CC	0,5 (1)	1,6 (3)			
	A	91,2 (330)	92,4 (342)			
	C	8,8 (32)	7,6 (28)	1,18 (0,70 – 2,01)	0,531	0,814
***ACE* I/D**	II	15,8 (29)	23,8 (44)			
	ID	56,3 (103)	50,3 (93)	**2,03 (1,11 – 3,69)***	**0,018***	0,720
	DD	27,9 (51)	25,9 (48)			
	I	44,0 (161)	48,9 (181)			
	D	56,0 (205)	51,1 (189)	1,22 (0,91 – 1,63)	0,180	0,694

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s IMU-om	u kontrolnoj skupini			
APOE	ε3/3	66,5 (119)	74,0 (131)			
ε2-4	ε3/4	17,3 (31)	12,4 (22)	1,25 (0,85 – 2,83)[d]	0,152[d]	0,797
	ε2/3	14,0 (25)	11,3 (20)	1,38 (0,73 – 2,61)[d]	0,327[d]	0,818
	ε4/4	0,6 (1)	1,1 (2)	0,55 (0,05 – 6,15)[d]	0,628[d]	0,837
	ε2/4	1,1 (2)	0,6 (1)	2,20 (0,20 – 24,59)[d]	0,521[d]	0,906
	ε2/2	0,6 (1)	0,6 (1)	1,10 (0,07 – 17,80)[d]	0,946[d]	1,000
				1,43 (0,91 – 2,27)[e]	0,121[e]	0,797
				1,40 (0,76 – 2,58)[h]	0,279[h]	0,797
				1,50 (0,84 – 2,66)[i]	0,167[i]	0,835
	ε3	82,1 (294)	85,9 (304)			
	ε4	9,8 (35)	7,6 (27)	1,34 (0,79 – 2,27)	0,276	0,694
	ε2	8,1 (29)	6,5 (23)	1,30 (0,74 – 2,31)	0,362	0,694

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), IMU – ishemijski moždani udar, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

Od ispitivanih polimorfizama jedino je za *ACE* I/D uočena statistički značajna povezanost s IMU-om gdje prema dominantnom modelu nositelji genotipa ID ili DD imaju dva puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa II. Također je uočena i veća učestalost genotipa *F5* 1601 GA i alela A, te smanjena učestalost genotipa HPA-3 ab i bb u skupini djece s IMU-om, ali bez dokazane statističke značajnosti.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s IMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat $P < 0,100$ prikazani su u Tablici 27. Multivarijatnom analizom potvrđen je 1,81 puta veći rizik za nastanak IMU-a u djece nositelja genotipa *ACE* ID ili DD, ali je dodatno utvrđen i gotovo tri puta veći rizik za nastanak IMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA, dok se HPA-3 nije pokazao značajnim.

Tablica 27. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s IMU u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	univarijatna logistička regresija		multivarijatna logistička regresija		
	OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
***F5* 1601 G/A**	2,62 (0,87 – 7,87)	0,075	**2,91 (1,00 – 8,46)***	**0,049***	0,074
***ITGA2B* HPA-3 a/b**	0,64 (0,40 – 1,02)	0,061	0,69 (0,44 – 1,07)	0,100	0,100
***ACE* I/D**	**2,03 (1,11 – 3,69)***	**0,018***	**1,81 (1,06 – 3,11)***	**0,031***	0,093

[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

4.2.3. Pojedinačni polimorfizmi i AIMU u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s AIMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s AIMU-om prikazani su u Tablici 28.

Tablica 28. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece s AIMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti genotipova i alela s pojavom AIMU-a.

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s AIMU-om	u kontrolnoj skupini			
F5	GG	92,2 (142)	97,3 (180)			
1601 G/A	GA	7,8 (12)	2,7 (5)	3,01 (0,98 – 9,24)	0,047	0,542
	G	96,1 (296)	98,6 (365)			
	A	3,9 (12)	1,4 (5)	**2,96 (1,03 – 8,50)***	**0,044***	0,652
F5	AA	76,9 (117)	81,1 (150)			
HR2	AG	22,4 (34)	18,4 (34)	1,72 (0,97 – 3,05)	0,063	0,542
	GG	0,7 (1)	0,5 (1)			
	A	88,2 (268)	90,3 (334)			
	G	11,8 (36)	9,7 (36)	1,25 (0,76 – 2,03)	0,378	0,652
F2	GG	97,4 (150)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	2,6 (4)	1,6 (3)	2,51 (0,53 – 11,93)	0,250	0,597
	G	98,7 (304)	99,2 (367)			
	A	1,3 (4)	0,8 (3)	1,61 (0,36 – 7,25)	0,535	0,727
FGB	GG	51,3 (78)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	43,4 (66)	42,7 (79)	1,04 (0,65 – 1,68)	0,860	0,944
	AA	5,3 (8)	7,6 (14)	0,45 (0,14 – 1,45)[c]	0,160[c]	0,591
	G	73,0 (222)	71,1 (263)			
	A	27,0 (82)	28,9 (107)	0,91 (0,65 – 1,27)	0,576	0,727

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u skupini djece s AIMU-om	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
F13A1	GG	58,6 (89)	58,9 (109)			
Val34Leu	GT	35,5 (54)	37,3 (69)	1,35 (0,83 – 2,19)	0,220	0,591
	TT	5,9 (9)	3,8 (7)	2,08 (0,74 – 5,87)[c]	0,160[c]	0,614
	G	76,3 (232)	77,6 (287)			
	T	23,7 (72)	22,4 (83)	1,07 (0,75 – 1,54)	0,701	0,768
SERPINE1	5G5G	25,0 (38)	23,2 (43)			
PAI-1 I/D	5G4G	45,4 (69)	47,0 (87)	1,06 (0,60 – 1,88)	0,830	0,939
	4G4G	29,6 (45)	29,7 (55)			
	5G	47,7 (145)	46,8 (173)			
	4G	52,3 (159)	53,2 (197)	0,96 (0,71 – 1,31)	0,808	0,845
ITGB3	aa	73,4 (113)	74,1 (137)			
HPA-1 a/b	ab	22,7 (35)	24,3 (45)	1,00 (0,58 – 1,71)	0,990	0,990
	bb	3,9 (6)	1,6 (3)	2,60 (0,59 – 11,33)[c]	0,200[c]	0,614
	a	84,7 (261)	86,2 (319)			
	b	15,3 (47)	13,8 (51)	1,13 (0,73 – 1,73)	0,587	0,727
GP1BA	aa	79,6 (121)	81,1 (150)			
HPA-2 a/b	ab	19,1 (29)	18,4 (34)	1,14 (0,62 – 2,08)	0,670	0,922
	bb	1,3 (2)	0,5 (1)	4,92 (0,42 – 57,99)[c]	0,190[c]	0,614
	a	89,1 (271)	90,3 (334)			
	b	10,9 (33)	9,7 (36)	1,13 (0,69 – 1,86)	0,632	0,727
ITGA2B	aa	41,7 (63)	29,7 (55)			
HPA-3 a/b	ab	42,4 (54)	51,9 (96)	**0,55 (0,33 – 0,90)***	**0,018***	0,591
	bb	15,9 (24)	18,4 (34)			
	a	62,9 (190)	55,7 (206)			
	b	37,1 (112)	44,3 (164)	0,74 (0,54 – 1,01)	0,058	0,652
ITGA2	aa	84,0 (126)	79,5 (147)			
HPA-5 a/b	ab	14,7 (22)	19,5 (36)	0,59 (0,30 – 1,13)	0,110	0,591
	bb	1,3 (2)	1,1 (2)			
	a	91,3 (274)	89,2 (330)			
	b	8,7 (26)	10,8 (40)	0,78 (0,47 – 1,32)	0,355	0,652
ITGA2	CC	41,2 (61)	35,7 (65)			
807 C/T	CT	43,9 (65)	46,7 (85)	0,94 (0,57 – 1,56)	0,820	0,933
	TT	14,9 (22)	17,6 (32)	0,85 (0,44 – 1,65)[c]	0,640[c]	0,917
	C	63,2 (187)	59,1 (215)			
	T	36,8 (109)	40,9 (149)	0,84 (0,61 – 1,15)	0,282	0,652
ITGA2	GG	41,0 (59)	35,4 (64)			
873 G/A	GA	44,4 (64)	47,0 (85)	0,93 (0,56 – 1,54)	0,770	0,933
	AA	14,6 (21)	17,7 (32)	0,82 (0,42 – 1,60)[c]	0,550[c]	0,860
	G	63,2 (182)	58,8 (213)			
	A	36,8 (106)	41,2 (149)	0,83 (0,61 – 1,14)	0,259	0,652
GP1BA	TT	77,3 (116)	72,3 (133)			
(-5) T/C	TC	20,7 (31)	23,9 (44)	0,86 (0,50 – 1,47)	0,570	0,860
	CC	2,0 (3)	3,8 (7)	0,37 (0,07 – 1,84)[c]	0,190[c]	0,577
	T	87,7 (263)	84,2 (310)			
	C	12,3 (37)	15,8 (58)	0,75 (0,48 – 1,17)	0,208	0,652

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u skupini djece s AIMU-om	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
GP1BA	CC	65,0 (93)	65,9 (110)			
VNTR	CB	16,8 (24)	16,7 (28)	1,01 (0,55 – 1,87)[d]	0,965[d]	0,988
	CD	14,0 (20)	16,2 (27)	0,88 (0,46 – 1,66)[d]	0,686[d]	0,922
	BD	2,1 (3)	0,6 (1)	3,55 (0,36 – 34,69)[d]	0,276[d]	0,614
	BB	2,1 (3)	0,6 (1)	3,55 (0,36 – 34,69)[d]	0,276[d]	0,614
				1,04 (0,65 – 1,66)[e]	0,878[e]	0,933
				1,18 (0,66 – 2,11)[f]	0,568[f]	0,860
				0,93 (0,52 – 1,68)[g]	0,811[g]	0,933
	C	80,4 (230)	82,3 (275)			
	B	11,5 (33)	9,3 (31)	1,27 (0,76 – 2,14)	0,364	0,652
	D	8,0 (23)	8,4 (28)	0,98 (0,55 – 1,75)	0,951	0,951
GP6	TT	73,1 (109)	76,6 (141)			
13254 T/C	TC	26,2 (39)	23,4 (43)	1,19 (0,68 – 2,06)	0,540	0,860
	CC	0,7 (1)	0,0 (0)			
	T	86,2 (257)	88,3 (325)			
	C	13,8 (41)	11,7 (43)	1,21 (0,76 – 1,91)	0,423	0,652
SELP	GG	69,6 (103)	63,8 (118)			
Ser290Asn	GA	27,0 (40)	29,7 (55)	0,80 (0,48 – 1,32)	0,380	0,729
	AA	3,4 (5)	6,5 (12)	0,55 (0,17 – 1,79)[c]	0,300[c]	0,614
	G	83,1 (246)	78,6 (291)			
	A	16,9 (50)	21,4 (79)	0,75 (0,51 – 1,11)	0,149	0,652
SELP	GG	21,1 (31)	20,3 (36)			
Asn562Asp	GA	55,1 (81)	60,5 (107)	0,96 (0,53 – 1,74)	0,890	0,933
	AA	23,8 (35)	19,2 (34)	1,29 (0,72 – 2,32)[c]	0,390[c]	0,729
	G	48,6 (143)	50,6 (179)			
	A	51,4 (151)	49,4 (175)	1,08 (0,79 – 1,47)	0,626	0,758
SELP	GG	83,8 (124)	80,0 (148)			
Val599Leu	GT	15,5 (23)	19,5 (36)	0,66 (0,35 – 1,26)	0,200	0,577
	TT	0,7 (1)	0,5 (1)			
	G	91,6 (271)	89,7 (332)			
	T	8,4 (25)	10,3 (38)	0,81 (0,47 – 1,37)	0,425	0,652
SELP	AA	82,0 (123)	86,5 (160)			
Thr715Pro	AC	17,3 (26)	11,9 (22)	1,21 (0,62 – 2,34)	0,580	0,860
	CC	0,7 (1)	1,6 (3)			
	A	90,7 (272)	92,4 (342)			
	C	9,3 (28)	7,6 (28)	1,26 (0,73 – 2,17)	0,412	0,729
ACE	II	16,4 (25)	23,8 (44)			
I/D	ID	55,3 (84)	50,3 (93)	**1,97 (1,04 – 3,72)***	**0,032***	0,577
	DD	28,3 (43)	25,9 (48)			
	I	44,1 (134)	48,9 (181)			
	D	55,9 (170)	51,1 (189)	1,22 (0,90 – 1,65)	0,210	0,772

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s AIMU-om	u kontrolnoj skupini			
APOE	ε3/3	64,4 (96)	74,0 (131)			
ε2-4	ε3/4	18,1 (27)	12,4 (22)	1,67 (0,90 – 3,12)[d]	0,104[d]	0,577
	ε2/3	14,8 (22)	11,3 (20)	1,50 (0,78 – 2,91)[d]	0,228[d]	0,577
	ε4/4	0,7 (1)	1,1 (2)	0,68 (0,06 – 7,63)[d]	0,756[d]	0,961
	ε2/4	1,3 (2)	0,6 (1)	2,73 (0,24 – 30,54)[d]	0,415[d]	0,744
	ε2/2	0,7 (1)	0,6 (1)	1,36 (0,08 – 22,09)[d]	0,827[d]	0,961
				1,57 (0,98 – 2,53)[e]	0,062[e]	0,667
				1,55 (0,83 – 2,91)[h]	0,173[h]	0,676
				1,64 (0,91 – 2,96)[i]	0,103[i]	0,738
	ε3	80,9 (241)	85,9 (304)			
	ε4	10,4 (31)	7,6 (27)	1,45 (0,84 – 2,49)	0,181	0,772
	ε2	8,7 (26)	6,5 (23)	1,43 (0,79 – 2,56)	0,235	0,772

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

Uočena je statistički značajna povezanost nekoliko polimorfizama s AIMU-om u djece. Nositelji genotipa *ACE* ID ili DD prema dominantnom modelu imaju dva puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa II, a nositelji alela *F5* 1601A imaju tri puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosi na nositelje divljega tipa. Primijećena je i veća učestalost genotipa *F5* 1601 GA u skupini djece s AIMU-om, ali rezultat nije dokazan kao statistički značajan. Suprotno tome nositelji genotipa HPA-3 ab i bb prema dominantnom modelu imaju umjereno smanjen rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa aa, a uočena je i smanjena učestalost alela b u skupini djece s AIMU u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane statističke značajnosti. Također je uočena i veća učestalost svih genotipova različitog od referentnoga u odnosu na referentni genotip *APOE* ε3/3 u skupini djece s AIMU-om, ali također bez utvrđene statističke značajnosti.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s AIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke

regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat P < 0,100 prikazani su u Tablici 29. Multivarijatnom analizom potvrđen je smanjen rizik za nastanak AIMU-a u djece nositelja genotipa HPA-3 ab ili bb, ali je dodatno utvrđen i četiri puta veći rizik za nastanak AIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA, dok polimorfizam *ACE* I/D ipak nije pokazao povezanost s AIMU-om u multivarijatnom modelu logističke regresije.

Tablica 29. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s AIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	**univarijatna logistička regresija**		**multivarijatna logistička regresija**		
	OR (95 % CI)	**P**	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
***F5* 1601 G/A**	3,01 (0,98 – 9,24)	0,047	**4,22 (1,29 – 13,81)**	**0,017***	0,058
***F5* HR2**	1,72 (0,97 – 3,05)	0,063	1,27 (0,730 – 2,22)	0,394	0,394
***ITGA2B* HPA-3 a/b**	**0,55 (0,33 – 0,90)***	**0,018***	**0,58 (0,36 – 0,93)***	**0,023***	0,058
***ACE* I/D**	**1,97 (1,04 – 3,72)***	**0,032***	1,63 (0,91 – 2,92)	0,101	0,126
***APOE* ε2-4[c]**	1,57 (0,98 – 2,53)	0,062	1,59 (0,97 – 2,60)	0,066	0,110

[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnog u odnosu na referentni genotip, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

4.2.4. Pojedinačni polimorfizmi i PAIMU

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s PAIMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s PAIMU-om prikazani su u Tablici 30.

Tablica 30. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece s PAIMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti genotipova i alela s pojavom PAIMU-a.

polimorfizam	**genotip / alel**	**raspodjela genotipova, % (N)** / **raspodjela alela, % (N)**		**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
		u skupini djece s PAIMU-om	**u kontrolnoj skupini**			
***F5* 1601 G/A**	GG	89,2 (66)	97,3 (180)			
	GA	10,8 (8)	2,7 (5)	3,16 (0,71 – 14,01)	0,120	0,725
	G	94,6 (140)	98,6 (365)			
	A	5,4 (8)	1,4 (5)	**4,17 (1,34 – 12,97)***	**0,014***	0,322

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u skupini djece s PAIMU-om	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
F5	AA	78,1 (57)	81,1 (150)			
HR2	AG	21,9 (16)	18,4 (34)	1,99 (0,78 – 5,09)	0,150	0,725
	GG	0,0 (0)	0,5 (1)			
	A	89,0 (130)	90,3 (334)			
	G	11,0 (16)	9,7 (36)	1,14 (0,61 – 2,13)	0,676	0,810
F2	GG	97,3 (72)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	2,7 (2)	1,6 (3)	9,59 (0,18 – 500,39)	0,210	0,725
	G	98,6 (146)	99,2 (367)			
	A	1,4 (2)	0,8 (3)	1,68 (0,28 – 10,13)	0,574	0,806
FGB	GG	49,3 (36)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	46,6 (34)	42,7 (79)	0,81 (0,39 – 1,68)	0,570	0,848
	AA	4,1 (3)	7,6 (14)	0,42 (0,08 – 2,20)[c]	0,270[c]	0,779
	G	72,6 (106)	71,1 (263)			
	A	27,4 (40)	28,9 (107)	0,93 (0,60 – 1,42)	0,730	0,810
F13A1	GG	67,1 (49)	58,9 (109)			
Val34Leu	GT	27,4 (20)	37,3 (69)	1,21 (0,57 – 2,56)	0,620	0,873
	TT	5,5 (4)	3,8 (7)	2,61 (0,48 – 14,23)[c]	0,260[c]	0,760
	G	80,8 (118)	77,6 (287)			
	T	19,2 (28)	22,4 (83)	0,82 (0,51 – 1,32)	0,418	0,806
SERPINE1	5G5G	28,8 (21)	23,2 (43)			
PAI-1 I/D	5G4G	45,2 (33)	47,0 (87)	1,18 (0,51 – 2,69)	0,700	0,917
	4G4G	26,0 (19)	29,7 (55)	0,72 (0,32 – 1,60)[c]	0,410[c]	0,779
	5G	51,4 (75)	46,8 (173)			
	4G	48,6 (71)	53,2 (197)	0,83 (0,57 – 1,22)	0,345	0,806
ITGB3	aa	75,3 (55)	74,1 (137)			
HPA-1 a/b	ab	23,0 (17)	24,3 (45)	1,03 (0,44 – 2,39)	0,950	0,995
	bb	2,7 (2)	1,6 (3)			
	a	85,8 (127)	86,2 (319)			
	b	14,2 (21)	13,8 (51)	1,03 (0,60 – 1,79)	0,904	0,928
GP1BA	aa	87,5 (63)	81,1 (150)			
HPA-2 a/b	ab	12,5 (9)	18,4 (34)	0,44 (0,14 – 1,34)	0,130	0,737
	bb	0,0 (0)	0,5 (1)			
	a	93,8 (135)	90,3 (334)			
	b	6,3 (9)	9,7 (36)	0,619 (0,29 – 1,32)	0,214	0,806
ITGA2B	aa	41,7 (30)	29,7 (55)			
HPA-3 a/b	ab	37,5 (27)	51,9 (96)	0,57 (0,27 – 1,22)	0,150	0,737
	bb	20,8 (15)	18,4 (34)	**0,42 (0,20 – 0,91)[d]***	**0,024[d]***	0,650
	a	60,4 (87)	55,7 (206)			
	b	39,6 (57)	44,3 (164)	0,82 (0,56 – 1,22)	0,330	0,806
ITGA2	aa	77,5 (55)	79,5 (147)			
HPA-5 a/b	ab	19,7 (14)	19,5 (36)	0,75 (0,31 – 1,82)	0,510	0,843
	bb	2,8 (2)	1,1 (2)			
	a	87,3 (124)	89,2 (330)			
	b	12,7 (18)	10,8 (40)	1,20 (0,66 – 2,17)	0,552	0,806

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u skupini djece s PAIMU-om	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
ITGA2 **807 C/T**	CC	44,3 (31)	35,7 (65)			
	CT	41,4 (29)	46,7 (85)	0,88 (0,41 – 1,90)	0,750	0,905
	TT	14,3 (10)	17,6 (32)			
	C	65,0 (91)	59,1 (215)			
	T	35,0 (49)	40,9 (149)	0,78 (0,52 – 1,17)	0,222	0,806
ITGA2 **873 G/A**	GG	43,5 (30)	35,4 (64)			
	GA	42,0 (29)	47,0 (85)	0,88 (0,41 – 1,90)	0,750	0,905
	AA	14,5 (10)	17,7 (32)			
	G	64,5 (89)	58,8 (213)			
	A	35,5 (49)	41,2 (149)	0,79 (0,52 – 1,18)	0,248	0,806
GP1BA **(-5) T/C**	TT	75,0 (54)	72,3 (133)			
	TC	20,8 (15)	23,9 (44)	0,95 (0,41 – 2,19)	0,900	0,995
	CC	4,2 (3)	3,8 (7)			
	T	85,4 (123)	84,2 (310)			
	C	14,6 (21)	15,8 (58)	0,91 (0,53 – 1,57)	0,740	0,810
GP1BA **VNTR**	CC	74,6 (50)	65,9 (110)			
	CB	11,9 (8)	16,7 (28)	0,63 (0,27 – 1,48)[e]	0,287[e]	0,760
	CD	11,9 (8)	16,2 (27)	0,65 (0,27 – 1,54)[e]	0,328[e]	0,760
	BD	1,5 (1)	0,6 (1)	2,20 (0,13 – 35,89)[e]	0,580[e]	0,848
	BB	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,995[e]	0,995
				0,66 (0,35 – 1,24)[f]	0,194[f]	0,737
				0,66 (0,29 – 1,49)[g]	0,319[g]	0,760
				0,71 (0,31 – 1,61)[h]	0,409[h]	0,818
	C	86,6 (116)	82,3 (275)			
	B	6,7 (9)	9,3 (31)	0,69 (0,32 – 1,49)	0,344	0,806
	D	6,7 (9)	8,4 (28)	0,76 (0,35 – 1,67)	0,496	0,806
GP6 **13254 T/C**	TT	72,9 (51)	76,6 (141)			
	TC	27,1 (19)	23,4 (43)	0,98 (0,43 – 2,27)	0,970	0,996
	T	86,4 (121)	88,3 (325)			
	C	13,6 (19)	11,7 (43)	1,19 (0,67 – 2,13)	0,562	0,806
SELP **Ser290Asn**	GG	67,1 (47)	63,8 (118)			
	GA	27,1 (19)	29,7 (55)	0,97 (0,45 – 2,10)	0,940	1,000
	AA	5,7 (4)	6,5 (12)			
	G	80,7 (113)	78,6 (291)			
	A	19,3 (27)	21,4 (79)	0,88 (0,54 – 1,43)	0,608	0,806
SELP **Asn562Asp**	GG	21,4 (15)	20,3 (36)			
	GA	52,9 (37)	60,5 (107)	0,76 (0,31 – 1,87)	0,560	0,887
	AA	25,7 (18)	19,2 (34)			
	G	47,9 (67)	50,6 (179)			
	A	52,1 (73)	49,4 (175)	1,11 (0,75 – 1,65)	0,588	0,806
SELP **Val599Leu**	GG	81,4 (57)	80,0 (148)			
	GT	17,1 (12)	19,5 (36)	0,63 (0,24 – 1,64)	0,340	0,760
	TT	1,4 (1)	0,5 (1)			
	G	90,0 (126)	89,7 (332)			
	T	10,0 (14)	10,3 (38)	0,97 (0,51 – 1,85)	0,928	0,928

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s PAIMU-om	u kontrolnoj skupini			
SELP **Thr715Pro**	AA	87,5 (63)	86,5 (160)			
	AC	12,5 (9)	11,9 (22)	0,63 (0,21 – 1,87)	0,400	0,820
	CC	0,0 (0)	1,6 (3)			
	A	93,8 (135)	92,4 (342)			
	C	6,3 (9)	7,6 (28)	0,81 (0,37 – 1,77)	0,604	0,806
ACE **I/D**	II	19,2 (14)	23,8 (44)			
	ID	54,8 (40)	50,3 (93)	1,22 (0,48 – 3,07)	0,680	0,905
	DD	26,0 (19)	25,9 (48)			
	I	46,6 (68)	48,9 (181)			
	D	53,4 (78)	51,1 (189)	1,10 (0,75 – 1,61)	0,631	0,806
APOE **ε2-4**	ε3/3	64,3 (45)	74,0 (131)			
	ε3/4	20,0 (14)	12,4 (22)	1,85 (0,87 – 3,93)[e]	0,108[e]	0,650
	ε2/3	10,0 (7)	11,3 (20)	1,02 (0,40 – 2,57)[e]	0,968[e]	1,000
	ε4/4	1,4 (1)	1,1 (2)	1,46 (0,129 – 16,44)[e]	0,762[e]	0,905
	ε2/4	2,9 (2)	0,6 (1)	5,82 (0,516 – 65,76)[e]	0,154[e]	0,650
	ε2/2	1,4 (1)	0,6 (1)	2,91 (0,178 – 47,51)[e]	0,453[e]	0,820
				1,58 (0,87 – 2,86)[f]	0,130[f]	0,871
				1,32 (0,58 – 3,01)[i]	0,504[i]	0,871
				1,98 (0,98 – 4,00)[j]	0,057[j]	1,000
	ε3	79,3 (111)	85,9 (304)			
	ε4	12,9 (18)	7,6 (27)	1,83 (0,97 – 3,44)	0,063	0,725
	ε2	7,9 (11)	6,5 (23)	1,31 (0,62 – 2,77)	0,481	1,000

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat dobiven prema prekodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [j] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat, n. d. – nije dostupno.

Uočena je statistički značajna povezanost *F5* 1601 G/A i HPA-3 s PAIMU-om gdje nositelji alela *F5* 1601A imaju četiri puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosi na nositelje divljega tipa, a prema prekodominantnom modelu nositelji genotipa HPA-3 ab imaju umjereno smanjen rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje homozigotnih genotipova.

Također je uočena veća učestalost genotipova koji sadrže haplotip *APOE* ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), ali bez zadovoljavajuće statističke značajnosti.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s PAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat P < 0,100 prikazani su u Tablici 31. Multivarijatnim modelom logističke regresije potvrđen je umjereni smanjeni rizik za nastanak PAIMU-a u djece nositelja genotipa HPA-3 ab prema prekodominantnom modelu, ali je dodatno utvrđen i šest puta veći rizik za nastanak PAIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA, dok *APOE* ε2-4 nije pokazao povezanost s PAIMU-om.

Tablica 31. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s PAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	**univarijatna logistička regresija**		**multivarijatna logistička regresija**		
	OR (95 % CI)	**P**	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
***F5* 1601 G/A[c]**	3,16 (0,71 – 14,01)	0,120	**6,04 (1,69 – 21,67)***	**0,006***	**0,018***
***ITGA2B* HPA-3 a/b[d]**	**0,42 (0,20 – 0,91)***	**0,024***	**0,46 (0,24 – 0,86)***	**0,016***	**0,024***
***APOE* ε2-4[e]**	1,98 (0,98 – 4,00)	0,057	2,03 (0,97 – 4,27)	0,061	0,061

[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – polimorfizam je uključen u multivarijatnu analizu unatoč rezultatu univarijatne logističke regresije zbog uočene povezanosti alela A s pojavom IMU, [d] – prikazan je rezultat dobiven prema prekodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

4.2.5. Pojedinačni polimorfizmi i DAIMU

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s DAIMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s DAIMU-om prikazani su u Tablici 32.

Tablica 32. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece s DAIMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti genotipova i alela s pojavom DAIMU-a.

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s DAIMU-om	u kontrolnoj skupini			
F5	GG	95,0 (76)	97,3 (180)			
1601 G/A	GA	5,0 (4)	2,7 (5)	2,59 (0,67 – 10,05)	0,180	0,413
	G	97,5 (156)	98,6 (365)			
	A	2,5 (4)	1,4 (5)	1,87 (0,50 – 7,06)	0,355	0,628
F5	AA	75,9 (60)	81,1 (150)			
HR2	AG	22,8 (18)	18,4 (34)	1,67 (0,86 – 3,26)	0,140	0,413
	GG	1,3 (1)	0,5 (1)			
	A	87,3 (138)	90,3 (334)			
	G	12,7 (20)	9,7 (36)	1,34 (0,75 – 2,41)	0,318	0,610
F2	GG	975 (78)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	2,5 (2)	1,6 (3)	1,81 (0,29 – 11,20)	0,530	0,768
	G	98,8 (158)	99,2 (367)			
	A	1,3 (2)	0,8 (3)	1,55 (0,26 – 9,36)	0,634	0,694
FGB	GG	53,2 (42)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	40,5 (32)	42,7 (79)	1,09 (0,62 – 1,95)	0,760	0,912
	AA	6,3 (5)	7,6 (14)	0,38 (0,08 – 1,74)[c]	0,170[c]	0,413
	G	73,4 (116)	71,1 (263)			
	A	26,6 (42)	28,9 (107)	0,89 (0,59 – 1,35)	0,585	0,696
F13A1	GG	50,6 (40)	58,9 (109)			
Val34Leu	GT	43,0 (34)	37,3 (69)	1,53 (0,85 – 2,73)	0,150	0,413
	TT	6,3 (5)	3,8 (7)			
	G	72,2 (114)	77,6 (287)			
	T	27,8 (44)	22,4 (83)	1,33 (0,87 – 2,04)	0,183	0,468
SERPINE1	5G5G	21,5 (17)	23,2 (43)			
PAI-1 I/D	5G4G	45,6 (36)	47,0 (87)	1,17 (0,58 – 2,35)	0,670	0,853
	4G4G	32,9 (26)	29,7 (55)	1,23 (0,67 – 2,29)[c]	0,510[c]	0,772
	5G	44,3 (70)	46,8 (173)			
	4G	55,7 (88)	53,2 (197)	1,10 (0,76 – 1,61)	0,605	0,696
ITGB3	aa	72,5 (58)	74,1 (137)			
HPA-1 a/b	ab	22,5 (18)	24,3 (45)	1,05 (0,55 – 2,01)	0,880	0,948
	bb	5,0 (4)	1,6 (3)	4,34 (0,94 – 20,16)[c]	0,062[c]	0,413
	a	83,8 (134)	86,2 (319)			
	b	16,3 (26)	13,8 (51)	1,21 (0,73 – 2,03)	0,460	0,724
GP1BA	aa	72,5 (58)	81,1 (150)			
HPA-2 a/b	ab	25,0 (20)	18,4 (34)	1,72 (0,89 – 3,34)	0,110	0,413
	bb	2,5 (2)	0,5 (1)			
	a	85,0 (136)	90,3 (334)			
	b	15,0 (24)	9,7 (36)	1,64 (0,94 – 2,85)	0,081	0,332

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u skupini djece s DAIMU-om	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
ITGA2B	aa	41,8 (33)	29,7 (55)			
HPA-3 a/b	ab	46,8 (37)	51,9 (96)	0,59 (0,32 – 1,07)	0,084	0,413
	bb	11,4 (9)	18,4 (34)	0,39 (0,14 – 1,05)[c]	0,041[c]	0,413
	a	65,2 (103)	55,7 (206)			
	b	34,8 (55)	44,3 (164)	**0,67 (0,46 – 0,99)***	**0,043***	0,330
ITGA2	aa	89,9 (71)	79,5 (147)			
HPA-5 a/b	ab	10,1 (8)	19,5 (36)	0,40 (0,16 – 1,01)	0,037	0,413
	bb	0,0 (0)	1,1 (2)			
	a	94,9 (150)	89,2 (330)			
	b	5,1 (8)	10,8 (40)	**0,44 (0,20 – 0,96)***	**0,040***	0,332
ITGA2	CC	38,5 (30)	35,7 (65)			
807 C/T	CT	46,1 (36)	46,7 (85)	0,94 (0,52 – 1,73)	0,850	0,939
	TT	15,4 (12)	17,6 (32)	0,76 (0,34 – 1,71)[c]	0,500[c]	0,770
	C	61,5 (96)	59,1 (215)			
	T	38,5 (60)	40,9 (149)	0,90 (0,61 – 1,32)	0,598	0,724
ITGA2	GG	38,7 (29)	35,4 (64)			
873 G/A	GA	46,6 (35)	47,0 (85)	0,93 (0,50 – 1,73)	0,830	0,942
	AA	14,7 (11)	17,7 (32)	0,70 (0,30 – 1,63)[c]	0,400[c]	0,730
	G	62,0 (93)	58,8 (213)			
	A	38,0 (57)	41,2 (149)	0,88 (0,59 – 1,29)	0,507	0,729
GP1BA	TT	79,5 (62)	72,3 (133)			
(-5) T/C	TC	20,5 (16)	23,9 (44)	0,83 (0,42 – 1,61)	0,570	0,772
	CC	0,0 (0)	3,8 (7)			
	T	89,7 (140)	84,2 (310)			
	C	10,3 (16)	15,8 (58)	0,61 (0,34 – 1,10)	0,101	0,332
GP1BA	CC	56,6 (43)	65,9 (110)			
VNTR	CB	21,1 (16)	16,7 (28)	1,46 (0,72 – 2,97)[d]	0,293[d]	0,586
	CD	15,8 (12)	16,2 (27)	1,14 (0,53 – 2,45)[d]	0,743[d]	0,918
	BD	2,6 (2)	0,6 (1)	5,12 (0,45 – 57,90)[d]	0,187[d]	0,413
	BB	3,9 (3)	0,6 (1)	7,67 (0,78 – 75,82)[d]	0,081[d]	0,436
				1,48 (0,85 – 2,58)[e]	0,166[e]	0,436
				1,79 (0,93 – 3,46)[f]	0,084[f]	0,448
				1,28 (0,62 – 2,66)[g]	0,510[g]	0,770
	C	75,0 (114)	82,3 (275)			
	B	15,8 (24)	9,3 (31)	**1,87 (1,05 – 3,32)***	**0,034***	0,357
	D	9,2 (14)	8,4 (28)	1,21 (0,61 – 2,38)	0,588	0,751
GP6	TT	73,4 (58)	76,6 (141)			
13254 T/C	TC	25,3 (20)	23,4 (43)	1,09 (0,56 – 2,12)	0,800	0,933
	CC	1,3 (1)	0,0 (0)			
	T	86,1 (136)	88,3 (325)			
	C	13,9 (22)	11,7 (43)	1,22 (0,70 – 2,12)	0,475	0,728
SELP	GG	71,8 (56)	63,8 (118)			
Ser290Asn	GA	26,9 (21)	29,7 (55)	0,77 (0,41 – 1,43)	0,400	0,730
	AA	1,3 (1)	6,5 (12)	0,22 (0,03 – 1,73)[c]	0,079[c]	0,448
	G	85,3 (133)	78,6 (291)			
	A	14,7 (23)	21,4 (79)	0,64 (0,38 – 1,06)	0,082	0,357

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u skupini djece s DAIMU-om	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
SELP **Asn562Asp**	GG	20,8 (16)	20,3 (36)			
	GA	57,1 (44)	60,5 (107)	1,20 (0,57 – 2,54)	0,630	0,827
	AA	22,1 (17)	19,2 (34)	1,24 (0,61 – 2,52)[c]	0,550[c]	0,770
	G	49,4 (76)	50,6 (179)			
	A	50,6 (78)	49,4 (175)	1,05 (0,72 – 1,53)	0,801	0,801
SELP **Val599Leu**	GG	85,9 (67)	80,0 (148)			
	GT	14,1 (11)	19,5 (36)	0,68 (0,31 – 1,50)	0,320	0,611
	TT	0,0 (0)	0,5 (1)			
	G	92,9 (145)	89,7 (332)			
	T	7,1 (11)	10,3 (38)	0,66 (0,33 – 1,33)	0,249	0,521
SELP **Thr715Pro**	AA	76,9 (60)	86,5 (160)			
	AC	21,8 (17)	11,9 (22)	1,74 (0,82 – 3,68)	0,160	0,448
	CC	1,3 (1)	1,6 (3)			
	A	87,8 (137)	92,4 (342)			
	C	12,2 (19)	7,6 (28)	1,69 (0,92 – 3,13)	0,093	0,357
ACE **I/D**	II	13,9 (11)	23,8 (44)			
	ID	55,7 (44)	50,3 (93)	**2,51 (1,06 – 5,91)***	**0,023***	0,466
	DD	30,4 (24)	25,9 (48)			
	I	41,8 (66)	48,9 (181)			
	D	58,2 (92)	51,1 (189)	1,33 (0,92 – 1,94)	0,132	0,380
APOE **ε2-4**	ε3/3	64,6 (51)	74,0 (131)			
	ε3/4	16,5 (13)	12,4 (22)	1,52 (0,71 – 3,24)[d]	0,281[d]	0,590
	ε2/3	19,0 (15)	11,3 (20)	1,93 (0,92 – 4,05)[d]	0,084[d]	0,466
	ε4/4	0,0 (0)	1,1 (2)	n. d.	0,996[d]	1,000
	ε2/4	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,996[d]	1,000
	ε2/2	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,996[d]	1,000
				1,56 (0,88 – 2,77)[e]	0,125[e]	0,466
				1,75 (0,84 – 3,64)[h]	0,133[h]	0,466
				1,28 (0,62 – 2,66)[i]	0,510[i]	0,824
	ε3	82,3 (130)	85,9 (304)			
	ε4	8,2 (13)	7,6 (27)	1,13 (0,56 – 2,25)	0,737	0,771
	ε2	9,5 (15)	6,5 (23)	1,53 (0,77 – 3,02)	0,225	0,518

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, OR – omjer rizika

(engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat, n. d. – nije dostupno.

Dokazana je statistički značajna povezanost *ACE* I/D s DAIMU-om gdje prema dominantnom modelu nositelji genotipa *ACE* ID ili DD imaju 2,5 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa I/I. Također, uočena je statistički značajna povezanost *GP1BA* VNTR s DAIMU-om gdje nositelji alela B imaju 1,87 puta veći rizik za nastanak bolesti, a suprotno tome nositelji alela HPA-3b i HPA-5b imaju umjereno smanjen rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje referentnih alela. Uočena je i povećana učestalost genotipova HPA-3 i HPA-5 aa, ali dodatno i genotipova HPA-1 bb, *SELP* 290 AsnAsn, *APOE* ε2/3 i genotipova *GP1BA* VNTR koji sadrže barem jedan alel B te alela HPA-2b, *SELP* 290Asn i 715Pro u skupini s DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali u svim slučajevima bez dokazane statističke značajnosti.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat $P < 0,100$ prikazani su u Tablici 33. Multivarijatnom analizom nije potvrđena povezanost *ACE* I/D s DAIMU-om, ali je utvrđen statistički značajna povezanost s polimorfizmima *GP1BA* VNTR i HPA-5 gdje genotipovi *GP1BA* VNTR koji sadrže barem jedan alel B povećavaju rizik za nastanak bolesti 2,43 puta, dok HPA-5 prema dominantnom modelu taj rizik prilično smanjuje.

Tablica 33. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	**univarijatna logistička regresija**		**multivarijatna logistička regresija**		
	OR (95 % CI)	**P**	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
***ITGB3* HPA-1 a/b[c]**	4,34 (0,94 – 20,16)	0,062	3,11 (0,31 – 30,82)	0,333	0,466
***ITGA2B* HPA-3 a/b**	0,59 (0,32 – 1,07)	0,084	0,52 (0,25 – 1,10)	0,089	0,156
***ITGA2* HPA-5 a/b**	0,40 (0,16 – 1,01)	0,037	**0,26 (0,09 – 0,79)***	**0,018***	0,102
***GP1BA* VNTR[d]**	1,79 (0,93 – 3,46)	0,084	**2,51 (1,01 – 5,74)***	**0,029***	0,102
***SELP* Ser290Asn[c]**	0,22 (0,03 – 1,73)	0,079	n. d.	0,994	0,994
***ACE* I/D**	**2,51 (1,06 – 5,91)***	**0,023***	2,34 (0,90 – 6,10)	0,081	0,189
***APOE* ε2-4[e]**	1,93 (0,92 – 4,05)	0,084	0,90 (0,36 – 2,26)	0,820	0,957

[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [e] – prikazan je rezultat modela u kojem je uspoređen genotip ε2/3 u odnosu na referentni genotip (ε3/3), OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), n. d. – nije dostupno, * – statistički značajan rezultat

4.2.6. Pojedinačni polimorfizmi i CSVT u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s CSVT-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s CSVT-om prikazani su u Tablici 34.

Tablica 34. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u skupini djece s CSVT-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti polimorfizama s pojavom CSVT-a.

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u skupini djece s CSVT-om	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
F5	GG	96,8 (30)	97,3 (180)			
1601 G/A	GA	3,2 (1)	2,7 (5)	1,09 (0,12 – 9,94)	0,940	1,000
	G	98,4 (61)	98,6 (365)			
	A	1,6 (1)	1,4 (5)	1,20 (14 – 10,42)	0,871	0,911
F5	AA	87,1 (27)	81,1 (150)			
HR2	AG	12,9 (4)	18,4 (34)	0,59 (0,16 – 2,10)	0,390	1,000
	GG	0,0 (0)	0,5 (1)			
	A	93,5 (58)	90,3 (334)			
	G	6,5 (4)	9,7 (36)	0,64 (0,22 – 1,87)	0,413	0,843
F2	GG	96,8 (30)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	3,2 (1)	1,6 (3)	2,59 (0,25 – 26,97)	0,460	1,000
	G	98,4 (61)	99,2 (367)			
	A	1,6 (1)	0,8 (3)	2,01 (0,21 – 19,59)	0,550	0,843
FGB	GG	58,1 (18)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	38,7 (12)	42,7 (79)	0,75 (0,33 – 1,72)	0,500	1,000
	AA	3,2 (1)	7,6 (14)	0,49 (0,06 – 3,92)[c]	0,460[c]	1,000
	G	77,4 (48)	71,1 (263)			
	A	22,6 (14)	28,9 (107)	0,72 (0,38 – 1,35)	0,305	0,843
F13A1	GG	67,7 (21)	58,9 (109)			
Val34Leu	GT	29,0 (9)	37,3 (69)	0,77 (0,32 – 1,81)	0,540	1,000
	TT	3,2 (1)	3,8 (7)			
	G	82,3 (51)	77,6 (287)			
	T	17,7 (11)	22,4 (83)	0,75 (0,37 – 1,50)	0,409	0,843
SERPINE1	5G5G	22,6 (7)	23,2 (43)			
PAI-1 I/D	5G4G	32,3 (10)	47,0 (87)	1,14 (0,42 – 3,05)	0,800	1,000
	4G4G	45,1 (14)	29,7 (55)	1,55 (0,67 – 3,58)[c]	0,310[c]	1000
	5G	38,7 (24)	46,8 (173)			
	4G	61,3 (38)	53,2 (197)	1,39 (0,80 – 2,41)	0,240	0,843
ITGB3	aa	54,8 (17)	74,1 (137)			
HPA-1 a/b	ab	45,2 (14)	24,3 (45)	2,28 (0,99 – 5,25)	0,056	1,000
	bb	0,0 (0)	1,6 (3)	**2,48 (1,07 – 5,72)[d]***	**0,037[d]***	1,000
	a	77,4 (48)	86,2 (319)			
	b	22,6 (14)	13,8 (51)	1,82 (0,94 – 3,55)	0,076	0,843

polimorfizam	genotip alel	raspodjela genotipova, % (N) raspodjela alela, % (N) u skupini djece s CSVT-om	 u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
GP1BA **HPA-2 a/b**	aa ab bb	77,4 (24) 22,6 (7) 0,0 (0)	81,1 (150) 18,4 (34) 0,5 (1)	1,20 (0,45 – 3,22)	0,720	1,000
	a b	88,7 (55) 11,3 (7)	90,3 (334) 9,7 (36)	1,18 (0,50 – 2,79)	0,704	0,843
ITGA2B **HPA-3 a/b**	aa ab bb	23,3 (7) 50,0 (15) 26,7 (8)	29,7 (55) 51,9 (96) 18,4 (34)	 1,42 (0,54 – 3,76) 1,71 (0,66 – 4,44)[c]	 0,470 0,290[c]	 1,000 1,000
	a b	46,8 (29) 53,2 (31)	55,7 (206) 44,3 (164)	1,34 (0,78 – 2,32)	0,290	0,843
ITGA2 **HPA-5 a/b**	aa ab bb	86,7 (26) 13,3 (4) 0,0 (0)	79,5 (147) 19,5 (36) 1,1 (2)	0,68 (0,22 – 2,11)	0,490	1,000
	a b	93,3 (56) 6,7 (4)	89,2 (330) 10,8 (40)	0,59 (0,20 – 1,71)	0,331	0,843
ITGA2 **807 C/T**	CC CT TT	44,4 (12) 44,4 (12) 11,1 (3)	35,7 (65) 46,7 (85) 17,6 (32)	 0,72 (0,30 – 1,77) 0,47 (0,10 – 2,11)[c]	 0,480 0,280[c]	 1,000 1,000
	C T	66,7 (36) 33,3 (18)	59,1 (215) 40,9 (149)	0,72 (0,39 – 1,32)	0,289	0,843
ITGA2 **873 G/A**	GG GA AA	40,7 (11) 48,1 (13) 11,1 (3)	35,4 (64) 47,0 (85) 17,7 (32)	 0,71 (0,29 – 1,75) 0,46 (0,10 – 2,09)[c]	 0,460 0,270[c]	 1,000 1,000
	G A	64,8 (35) 35,2 (19)	58,8 (213) 41,2 (149)	0,78 (0,43 – 1,41)	0,405	0,843
GP1BA **(-5) T/C**	TT TC CC	70,9 (22) 22,6 (7) 6,5 (2)	72,3 (133) 23,9 (44) 3,8 (7)	0,91 (0,36 – 2,30)	0,840	1,000
	T C	82,3 (51) 17,7 (11)	84,2 (310) 15,8 (58)	1,15 (0,57 – 2,34)	0,694	0,843
GP1BA **VNTR**	CC CB CD BD BB	67,7 (21) 19,4 (6) 9,7 (3) 3,2 (1) 0,0 (0)	65,9 (110) 16,7 (28) 16,2 (27) 0,6 (1) 0,6 (1)	 1,12 (0,41 – 3,04)[e] 0,58 (0,16 – 2,10)[e] 5,24 (0,32 – 87,08)[e] n. d. 0,92 (0,41 – 2,08)[f] 1,22 (0,47 – 3,15)[g] 0,75 (0,24 – 2,36)[h]	 0,821[e] 0,408[e] 0,248[e] 0,995[e] 0,840[f] 0,678[g] 0,620[h]	 1,000 1,000 1,000 1,000 1,000 1,000 1,000
	C B D	82,3 (51) 11,3 (7) 6,5 (4)	82,3 (275) 9,3 (31) 8,4 (28)	1,22 (0,51 – 2,91) 0,77 (0,26 – 2,29)	0,659 0,639	0,843 0,843
GP6 **13254 T/C**	TT TC	83,9 (26) 16,1 (5)	76,6 (141) 23,4 (43)	0,40 (0,12 – 1,41)	0,120	1,000
	T C	91,9 (57) 8,1 (5)	88,3 (325) 11,7 (43)	0,66 (0,25 – 1,75)	0,405	0,843

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s CSVT-om	u kontrolnoj skupini			
SELP	GG	61,3 (16)	63,8 (118)			
Ser290Asn	GA	35,5 (11)	29,7 (55)	1,02 (0,44 – 2,39)	0,960	1,000
	AA	3,2 (1)	6,5 (12)	0,58 (0,07 – 4,71)[c]	0,580[c]	1,000
	G	79,0 (49)	78,6 (291)			
	A	21,0 (13)	21,4 (79)	0,98 (0,51 – 1,89)	0,946	0,946
SELP	GG	20,0 (6)	20,3 (36)			
Asn562Asp	GA	53,3 (16)	60,5 (107)	1,11 (0,39 – 3,20)	0,840	1,000
	AA	26,7 (8)	19,2 (34)	1,94 (0,77 – 4,93)[c]	0,170[c]	1,000
	G	46,7(28)	50,6 (179)			
	A	53,3 (32)	49,4 (175)	1,17 (0,68 – 2,02)	0,577	0,843
SELP	GG	74,2 (23)	80,0 (148)			
Val599Leu	GT	25,8 (8)	19,5 (36)	1,42 (0,56 – 3,64)	0,470	1,000
	TT	0,0 (0)	0,5 (1)			
	G	93,5 (54)	89,7 (332)			
	T	6,5 (8)	10,3 (38)	1,29 (0,57 – 2,92)	0,535	0,843
SELP	AA	87,1 (27)	86,5 (160)			
Thr715Pro	AC	12,9 (4)	11,9 (22)	1,08 (0,34 – 3,40)	0,900	1,000
	CC	0,0 (0)	1,6 (3)			
	A	93,5 (58)	92,4 (342)			
	C	6,5(4)	7,6 (28)	0,84 (0,58 – 2,49)	0,756	0,843
ACE	II	12,9 (4)	23,8 (44)			
I/D	ID	61,3 (19)	50,3 (93)	2,44 (0,70 – 8,54)	0,120	1,000
	DD	25,8 (8)	25,9 (48)			
	I	43,5 (27)	48,9 (181)			
	D	56,5 (35)	51,1 (189)	1,24 (0,72 – 2,13)	0,434	0,843
APOE	ε3/3	76,7 (23)	74,0 (131)			
ε2-4	ε3/4	13,3 (4)	12,4 (22)	1,04 (0,33 – 3,28)[e]	0,953[e]	1,000
	ε2/3	10,0 (3)	11,3 (20)	0,85 (0,23 – 3,11)[e]	0,811[e]	1,000
	ε4/4	0,0 (0)	1,1 (2)	n. d.	0,955[e]	1,000
	ε2/4	0,0 (0)	0,6 (1)	n.d.	0,997[e]	1,000
	ε2/2	0,0 (0)	0,6 (1)	n.d.	0,997[e]	1,000
				0,87 (0,35 – 2,15)[f]	0,758[f]	1,000
				0,78 (0,21 – 2,81)[i]	0,700[i]	1,000
				0,91 (0,29 – 2,86)[j]	0,874[j]	1,000
	ε3	88,3 (53)	85,9 (304)			
	ε4	6,7 (4)	7,6 (27)	0,85 (0,29 – 2,53)	0,770	0,874
	ε2	5,0 (3)	6,5 (23)	0,75 (0,22 – 2,58)	0,646	0,929

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat dobiven prema prekodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su

uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [j] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat, n. d. – nije dostupno.

Od svih ispitivanih polimorfizama, dokazana je statistički značajna povezanost sa CSVT-om jedino za HPA-1 gdje prema prekodominantnom modelu nositelji genotipa ab imaju 2,5 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje homozigotnih genotipa aa ili bb. Također, uočena je i veća učestalost alela HPA-1 b te moguća povezanost HPA-1 s nastankom bolesti prema dominantnom modelu. Međutim, analiza logističkom regresijom dala je granične, ali ne i statistički značajne P vrijednosti za ove potencijalne povezanosti.

Budući da je univarijatnom logističkom regresijom dobiven rezultat $P < 0,100$ samo za polimorfizam HPA-1, u skupini djece s CSVT-om nije napravljena daljnja analiza multivarijatnom logističkom regresijom.

4.2.7. Pojedinačni polimorfizmi i KIMU u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece s KIMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece s KIMU-om prikazani su u Tablici 35.

Tablica 35. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece s KIMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti polimorfizama s pojavom KIMU-a.

polimorfizam	**genotip / alel**	**raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N)**		**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
		u skupini djece s KIMU-om	**u kontrolnoj skupini**			
F5	GG	87,0 (60)	97,3 (180)			
1601G/A	GA	13,0 (9)	2,7 (5)	**4,22 (1,23 – 14,48)***	**0,022***	0,476
	G	93,5 (129)	98,6 (365)			
	A	6,5 (9)	1,4 (5)	**5,09 (1,68 – 15,48)***	**0,004***	0,092
F5	AA	75,4 (52)	81,1 (150)			
HR2	AG	23,2 (16)	18,4 (34)	1,92 (0,92 – 4,03)	0,088	0,476
	GG	1,4 (1)	0,5 (1)			
	A	87,0 (120)	90,3 (334)			
	G	13,0 (18)	9,7 (36)	1,39 (0,76 – 2,54)	0,283	0,874

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s KIMU-om	u kontrolnoj skupini			
F2	GG	97,1 (67)	98,4 (182)			
20210 G/A	GA	2,9 (2)	1,6 (3)	2,85 (0,42 – 19,30)	0,300	0,623
	G	98,6 (136)	99,2 (367)			
	A	1,4 (2)	0,8 (3)	1,80 (0,30 – 1,88)	0,523	0,874
FGB	GG	44,9 (31)	49,7 (92)			
-455 G/A	GA	47,8 (33)	42,7 (79)	1,37 (0,74 – 2,55)	0,310	0,623
	AA	7,2 (5)	7,6 (14)			
	G	68,8 (95)	71,1 (263)			
	A	31,2 (43)	28,9 (107)	0,11 (0,73 – 1,70)	0,625	0,874
F13A1	GG	58,0 (40)	58,9 (109)			
Val34Leu	GT	34,8 (24)	37,3 (69)	1,62 (0,87 – 3,30)	0,130	0,476
	TT	7,2 (5)	3,8 (7)			
	G	75,4 (104)	77,6 (287)			
	T	24,6 (34)	22,4 (83)	1,13 (0,72 – 1,79)	0,600	0,874
SERPINE1	5G5G	18,8 (13)	23,2 (43)			
PAI-1 I/D	5G4G	53,6 (37)	47,0 (87)	1,54 (0,70 – 3,38)	0,270	0,623
	4G4G	27,5 (19)	29,7 (55)	1,62 (0,87 – 3,01)[d]	0,120[d]	0,476
	5G	45,7 (63)	46,8 (173)			
	4G	54,3 (75)	53,2 (197)	1,05 (0,71 – 1,55)	0,824	0,889
ITGB3	aa	75,4 (52)	74,1 (137)			
HPA-1 a/b	ab	20,3 (14)	24,3 (45)	0,85 (0,41 – 1,76)	0,660	0,872
	bb	4,3 (3)	1,6 (3)	3,51 (0,64 – 19,29)[c]	0,160[c]	0,476
	a	85,5 (118)	86,2 (319)			
	b	14,5 (20)	13,8 (51)	1,06 (0,61 – 1,85)	0,838	0,889
GP1BA	aa	79,4 (54)	81,1 (150)			
HPA-2 a/b	ab	20,6 (14)	18,4 (34)	1,02 (0,46 – 2,22)	0,970	1,000
	bb	0,0 (0)	0,5 (1)			
	a	89,7 (122)	90,3 (334)			
	b	10,3 (14)	9,7 (36)	1,06 (0,56 – 2,04)	0,850	0,889
ITGA2B	aa	42,6 (29)	29,7 (55)			
HPA-3 a/b	ab	42,6 (29)	51,9 (96)	0,64 (0,34 – 1,21)	0,170	0,476
	bb	14,7 (10)	18,4 (34)			
	a	64,0 (87)	55,7 (206)			
	b	36,0 (49)	44,3 (164)	0,71 (0,47 – 1,06)	0,095	0,828
ITGA2	aa	84,1 (58)	79,5 (147)			
HPA-5 a/b	ab	14,5 (10)	19,5 (36)	0,57 (0,24 – 1,35)	0,180	0,476
	bb	1,4 (1)	1,1 (2)			
	a	91,3 (126)	89,2 (330)			
	b	8,7 (12)	10,8 (40)	0,79 (0,40 – 1,55)	0,485	0,874
ITGA2	CC	41,8 (28)	35,7 (65)			
807 C/T	CT	40,3 (27)	46,7 (85)	0,91 (0,48 – 1,73)	0,760	0,900
	TT	17,9 (12)	17,6 (32)			
	C	61,9 (83)	59,1 (215)			
	T	38,1 (51)	40,9 (149)	0,89 (0,59 – 1,33)	0,562	0,874

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s KIMU-om	u kontrolnoj skupini			
ITGA2	GG	40,9 (27)	35,4 (64)			
873 G/A	GA	40,9 (27)	47,0 (85)	0,90 (0,47 – 1,72)	0,750	0,900
	AA	18,2 (12)	17,7 (32)			
	G	61,4 (81)	58,8 (213)			
	A	38,6 (51)	41,2 (149)	0,90 (0,60 – 1,35)	0,613	0,874
GP1BA	TT	80,9 (55)	72,3 (133)			
(-5) T/C	TC	17,6 (12)	23,9 (44)	0,69 (0,33 – 1,45)	0,320	0,623
	CC	1,5 (1)	3,8 (7)			
	T	89,7 (122)	84,2 (310)			
	C	10,3 (14)	15,8 (58)	0,61 (0,33 – 1,14)	0,122	0,828
GP1BA	CC	60,6 (40)	65,9 (110)			
VNTR	CB	19,7 (13)	16,7 (28)	1,28 (0,60 – 2,71)[e]	0,524[e]	0,764
	CD	16,7 (11)	16,2 (27)	1,12 (0,51 – 2,47)[e]	0,778[e]	0,900
	BD	3,0 (2)	0,6 (1)	5,50 (0,49 – 62,33)[e]	0,169[e]	0,487
	BB	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,995[e]	0,997
				1,25 (0,70 – 2,26)[f]	0,450[f]	0,757
				1,38 (0,67 – 2,82)[g]	0,385[g]	0,678
				1,28 (0,60 – 2,71)[h]	0,524[h]	0,764
	C	78,8 (104)	82,3 (275)			
	B	11,4 (15)	9,3 (31)	1,28 (0,66 – 2,47)	0,462	0,874
	D	9,8 (13)	8,4 (28)	1,23 (0,61 – 2,46)	0,563	0,874
GP6	TT	70,1 (47)	76,6 (141)			
13254 T/C	TC	29,9 (20)	23,4 (43)	1,13 (0,56 – 2,30)	0,730	0,908
	T	85,1 (114)	88,3 (325)			
	C	14,9 (20)	11,7 (43)	1,33 (0,75 – 2,35)	0,333	0,874
SELP	GG	62,7 (42)	63,8 (118)			
Ser290Asn	GA	31,3 (21)	29,7 (55)	1,08 (0,57 – 2,05)	0,810	0,908
	AA	6,0 (4)	6,5 (12)			
	G	78,4 (105)	78,6 (291)			
	A	21,6 (29)	21,4 (79)	1,02 (0,63 – 1,65)	0,944	0,944
SELP	GG	22,4 (15)	20,3 (36)			
Asn562Asp	GA	49,3 (33)	60,5 (107)	0,77 (0,37 – 1,60)	0,480	0,764
	AA	28,4 (19)	19,2 (34)	0,63 (0,34 – 1,18)[d]	0,150[d]	0,487
	G	47,0 (63)	50,6 (179)			
	A	53,0 (71)	49,4 (175)	1,15 (0,77 – 1,72)	0,484	0,874
SELP	GG	88,1 (59)	80,0 (148)			
Val599Leu	GT	11,9 (8)	19,5 (36)	0,50 (0,21 – 1,22)	0,110	0,487
	TT	0,0 (0)	0,5 (1)			
	G	94,0 (126)	89,7 (332)			
	T	6,0 (8)	10,3 (38)	0,55 (0,25 – 1,22)	0,144	0,828
SELP	AA	85,3 (58)	86,5 (160)			
Thr715Pro	AC	13,2 (9)	11,9 (22)	0,79 (0,31 – 2,00)	0,620	0,850
	CC	1,5 (1)	1,6 (3)			
	A	91,9 (125)	92,4 (342)			
	C	8,1 (11)	7,6 (28)	1,07 (0,52 – 2,22)	0,846	0,927

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece s KIMU-om	u kontrolnoj skupini			
ACE	II	20,3 (14)	23,8 (44)			
I/D	ID	53,6 (37)	50,3 (93)	1,55 (0,71 – 3,38)	0,260	0,641
	DD	26,1 (18)	25,9 (48)			
	I	47,1 (65)	48,9 (181)			
	D	52,9 (73)	51,1 (189)	1,08 (0,73 – 1,59)	0,715	0,914
APOE	ε3/3	65,2 (45)	74,0 (131)			
ε2-4	ε3/4	18,8 (13)	12,4 (22)	1,72 (0,80 – 3,70)[e]	0,164[e]	0,487
	ε2/3	13,0 (9)	11,3 (20)	1,31 (0,56 – 3,09)[e]	0,537[e]	0,764
	ε4/4	0,0 (0)	1,1 (2)	n. d.	0,996[e]	0,997
	ε2/4	2,9 (2)	0,6 (1)	5,82 (0,52 – 65,76)[e]	0,154[e]	0,487
	ε2/2	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,997[e]	0,997
				1,52 (0,83 – 2,76)[f]	0,171[f]	0,487
				1,46 (0,65 – 3,24)[i]	0,357[i]	0,661
				1,75 (0,85 – 3,60)[j]	0,131[j]	0,808
	ε3	81,1 (112)	85,9 (304)			
	ε4	10,9 (15)	7,6 (27)	1,38 (0,71 – 2,69)	0,338	0,874
	ε2	8,0 (11)	6,5 (23)	1,19 (0,56 – 2,52)	0,646	0,874

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat dobiven prema prekodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [j] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), KIMU – kortikalni ishemijski moždani udar, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat, n. d. – nije dostupno.

Dokazana je statistički značajna povezanost *F5* 1601 G/A s pojavom KIMU-a gdje nositelji genotipa GA, odnosno alela A maju 4, odnosno 5 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa GG, odnosno alela G. Također, uočena je veća učestalost genotipa *F5* HR2 AA i alela HPA-3 b u kontrolnoj skupini u odnosu na djecu s KIMU-om, ali statistički značaj ovih rezultata nije utvrđen.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s KIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat $P < 0,100$ prikazani su u Tablici 36. Multivarijatnom analizom samo je potvrđena povezanost *F5* 1601

GA s nastankom KIMU-a u djece te je utvrđen 5,3 puta veći rizik za nastanak bolesti za nositelje genotipa *F5* 1601 GA u odnosu na nositelje divljega tipa.

Tablica 36. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s KIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	**univarijatna logistička regresija**		**multivarijatna logistička regresija**		
	OR (95 % CI)	**P**	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
***F5* 1601 G/A**	**4,22 (1,23 – 14,48)***	**0,022***	**5,30 (1,70 – 16,47)***	**0,004***	**0,008***
***F5* HR2**	1,92 (0,92 – 4,03)	0,088	1,35 (0,69 – 2,65)	0,387	0,387

[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat.

4.2.8. Pojedinačni polimorfizmi i SIMU u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama u ukupnoj skupini djece sa SIMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijatne logističke regresije u skupini djece sa SIMU-om prikazani su u Tablici 37.

Tablica 37. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih ispitanih polimorfizama u djece sa SIMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti polimorfizama s pojavom SIMU-a.

polimorfizam	**genotip / alel**	**raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N)**		**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
		u skupini djece sa SIMU-om	**u kontrolnoj skupini**			
***F5* 1601 G/A**	GG	95,3 (41)	97,3 (180)			
	GA	4,7 (2)	2,7 (5)	2,14 (0,39 – 11,71)	0,410	0,911
	G	97,7 (84)	98,6 (365)			
	A	2,3 (2)	1,4 (5)	1,74 (0,33 – 9,11)	0,513	0,881
***F5* HR2**	AA	79,1 (34)	81,1 (150)			
	AG	20,9 (9)	18,4 (34)	1,73 (0,73 – 4,12)	0,220	0,800
	GG	0,0 (0)	0,5 (1)			
	A	89,5 (77)	90,3 (334)			
	G	10,5 (9)	9,7 (36)	1,08 (0,50 – 2,35)	0,837	0,955
***F2* 20210 G/A**	GG	1,0 (43)	98,4 (182)			
	GA	0,0 (0)	1,6 (3)	n. d.	0,330	0,880
	G	100,0 (86)	99,2 (367)			
	A	0,0 (0)	0,8 (3)	0,61 (0,03 – 11,86)	0,742	0,955

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u skupini djece sa SIMU-om	raspodjela genotipova, % (N) / raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
FGB **-455 G/A**	GG	53,5 (23)	49,7 (92)			
	GA	46,5 (20)	42,7 (79)	1,08 (0,51 – 2,28)	0,840	0,995
	AA	0,0 (0)	7,6 (14)	n. d.	**0,029[c]***	0,370
	G	76,7 (66)	71,1 (263)			
	A	23,3 (20)	28,9 (107)	0,74 (0,43 – 1,29)	0,292	0,840
F13A1 **Val34Leu**	GG	46,5 (20)	58,9 (109)			
	GT	44,2 (19)	37,3 (69)	1,98 (0,93 – 4,22)	0,076	0,457
	TT	9,3 (4)	3,8 (7)			
	G	68,6 (59)	77,6 (287)			
	T	31,4 (27)	22,4 (83)	1,58 (0,94 – 2,65)	0,082	0,844
SERPINE1 **PAI-1 I/D**	5G5G	30,2 (13)	23,2 (43)			
	5G4G	39,6 (17)	47,0 (87)	0,72 (0,32 – 1,64)	0,440	0,926
	4G4G	30,2 (13)	29,7 (55)	0,65 (0,30 – 1,41)[d]	0,280[d]	0,800
	5G	50,0 (43)	46,8 (173)			
	4G	50,0 (43)	53,2 (197)	0,88 (0,55 – 1,40)	0,588	0,881
ITGB3 **HPA-1 a/b**	aa	67,4 (29)	74,1 (137)			
	ab	25,6 (11)	24,3 (45)	1,43 (0,64 – 3,17)	0,390	0,918
	bb	7,0 (3)	1,6 (3)	3,60 (0,57 – 22,71)[c]	0,200[c]	0,831
	a	80,2 (69)	86,2 (319)			
	b	19,8 (17)	13,8 (51)	1,54 (0,84 – 2,83)	0,163	0,844
GP1BA **HPA-2 a/b**	aa	78,5 (33)	81,1 (150)			
	ab	16,7 (7)	18,4 (34)	1,63 (0,70 – 3,83)	0,270	0,831
	bb	4,8 (2)	0,5 (1)	**13,15 (1,12 – 154,96)[c]***	**0,037[c]***	0,370
	a	86,9 (73)	90,3 (334)			
	b	13,1 (11)	9,7 (36)	1,40 (0,68 – 2,88)	0,363	0,881
ITGA2B **HPA-3 a/b**	aa	42,9 (18)	29,7 (55)			
	ab	35,7 (15)	51,9 (96)	0,55 (0,26 – 1,18)	0,130	0,650
	bb	21,4 (9)	18,4 (34)			
	a	60,7 (51)	55,7 (206)			
	b	39,3 (33)	44,3 (164)	0,81 (0,50 – 1,32)	0,401	0,881
ITGA2 **HPA-5 a/b**	aa	88,1 (37)	79,5 (147)			
	ab	11,9 (5)	19,5 (36)	0,37 (0,11 – 1,28)	0,080	0,457
	bb	0,0 (0)	1,1 (2)			
	a	94,0 (79)	89,2 (330)			
	b	6,0 (5)	10,8 (40)	0,52 (0,20 – 1,37)	0,185	0,844
ITGA2 **807 C/T**	CC	41,5 (17)	35,7 (65)			
	CT	48,7 (20)	46,7 (85)	1,04 (0,47 – 2,29)	0,920	0,995
	TT	9,8 (4)	17,6 (32)	0,31 (0,07 -1,39)[c]	0,078[c]	0,520
	C	65,9 (54)	59,1 (215)			
	T	34,1 (28)	40,9 (149)	0,75 (0,45 – 1,24)	0,257	0,844
ITGA2 **873 G/A**	GG	42,1 (14)	35,4 (64)			
	GA	50,0 (19)	47,0 (85)	1,05 (0,46 – 2,39)	0,900	1,000
	AA	7,9 (3)	17,7 (32)	0,17 (0,02 – 1,32)[c]	0,029[c]	0,413
	G	67,1 (51)	58,8 (213)			
	A	32,9 (25)	41,2 (149)	0,70 (0,42 – 1,18)	0,182	0,881

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u skupini djece sa SIMU-om	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N) u kontrolnoj skupini	OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
GP1BA **(-5) T/C**	TT	73,8 (31)	72,3 (133)			
	TC	26,2 (11)	23,9 (44)	1,14 (0,51 – 2,58)	0,750	1,000
	CC	0,0 (0)	3,8 (7)			
	T	86,9 (73)	84,2 (310)			
	C	13,1 (11)	15,8 (58)	0,81 (0,40 – 1,61)	0,541	0,881
GP1BA **VNTR**	CC	65,0 (26)	65,9 (110)			
	CB	12,5 (5)	16,7 (28)	0,76 (0,27 – 2,14)[e]	0,598[e]	1,000
	CD	15,0 (6)	16,2 (27)	0,94 (0,35 – 2,51)[e]	0,902[e]	1,000
	BD	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,994[e]	1,000
	BB	7,5 (3)	0,6 (1)	**12,69 (1,27 – 127,00)[e]***	**0,031[e]***	0,413
				1,04 (0,50 – 2,14)[f]	0,917[f]	1,000
				1,13 (0,46 – 2,75)[g]	0,790[g]	1,000
				0,91 (0,34 – 2,42)[h]	0,845[h]	1,000
	C	78,7 (63)	82,3 (275)			
	B	13,8 (11)	9,3 (31)	1,55 (0,74 – 3,25)	0,247	0,881
	D	7,5 (6)	8,4 (28)	0,94 (0,37 – 2,35)	0,887	0,955
GP6 **13254 T/C**	TT	78,6 (33)	76,6 (141)			
	TC	19,0 (8)	23,4 (43)	1,25 (0,54 – 2,89)	0,610	1,000
	CC	2,4 (1)	0,0 (0)			
	T	88,1 (74)	88,3 (325)			
	C	11,9 (10)	11,7 (43)	1,02 (0,49 – 2,13)	0,955	0,955
SELP **Ser290Asn**	GG	73,2 (30)	63,8 (118)			
	GA	24,4 (10)	29,7 (55)	0,67 (0,30 – 1,54)	0,340	0,850
	AA	2,4 (1)	6,5 (12)			
	G	85,4 (70)	78,6 (291)			
	A	14,6 (12)	21,4 (79)	0,63 (0,33 – 1,22)	0,173	0,881
SELP **Asn562Asp**	GG	24,4 (10)	20,3 (36)			
	GA	53,7 (22)	60,5 (107)	0,87 (0,35 – 2,20)	0,780	1,000
	AA	21,9 (9)	19,2 (34)			
	G	51,2 (42)	50,6 (179)			
	A	48,8 (40)	49,4 (175)	0,97 (0,60 – 1,58)	0,915	0,957
SELP **Val599Leu**	GG	78,0 (32)	80,0 (148)			
	GT	22,0 (9)	19,5 (36)	0,88 (0,34 – 2,29)	0,790	1,000
	TT	0,0 (0)	0,5 (1)			
	G	91,2 (73)	89,7 (332)			
	T	8,8 (9)	10,3 (38)	1,08 (0,50 – 2,33)	0,850	0,978
SELP **Thr715Pro**	AA	81,0 (34)	86,5 (160)			
	AC	19,0 (8)	11,9 (22)	1,79 (0,70 – 4,58)	0,240	0,833
	CC	0,0 (0)	1,6 (3)			
	A	90,5 (76)	92,4 (342)			
	C	9,5 (8)	7,6 (28)	1,24 (0,54 – 2,82)	0,613	0,881
ACE **I/D**	II	18,6 (8)	23,8 (44)			
	ID	53,5 (23)	50,3 (93)	1,77 (0,64 – 4,87)	0,250	0,833
	DD	27,9 (12)	25,9 (48)			
	I	45,3 (39)	48,9 (181)			
	D	54,7 (47)	51,1 (189)	1,15 (0,72 – 1,85)	0,551	0,915

polimorfizam	genotip / alel	raspodjela genotipova, % (N); raspodjela alela, % (N)		OR (95 % CI)	P[a]	P[b]
		u skupini djece sa SIMU-om	u kontrolnoj skupini			
APOE	ε3/3	69,7 (30)	74,0 (131)			
ε2-4	ε3/4	14,0 (6)	12,4 (22)	1,19 (0,44 – 3,19)[e]	0,728[e]	1,000
	ε2/3	14,0 (6)	11,3 (20)	1,31 (0,48 – 3,54)[e]	0,595[e]	1,000
	ε4/4	2,3 (1)	1,1 (2)	2,18 (0,19 – 24,88)[e]	0,529[e]	1,000
	ε2/4	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,996[e]	1,000
	ε2/2	0,0 (0)	0,6 (1)	n. d.	0,996[e]	1,000
				1,23 (0,59 – 2,57)[f]	0,574[f]	1,000
				1,19 (0,44 – 3,19)[i]	0,728[i]	1,000
				1,22 (0,48 – 3,09)[j]	0,671[j]	1,000
	ε3	83,7 (72)	85,9 (304)			
	ε4	9,3 (8)	7,6 (27)	1,25 (0,55 – 2,87)	0,597	0,915
	ε2	7,0 (6)	6,5 (23)	1,10 (0,43 – 2,80)	0,839	1,000

Analiza povezanosti genotipova i bolesti je izrađena logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizme *GP1BA* VNTR i *APOE* ε2-4 te analiza alela su rađene u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Radi višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih P vrijednosti. [a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat dobiven prema prekodominantnom modelu, [e] – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, [f] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, [g] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), [h] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), [i] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε2 u odnosu na referentni genotip (ε2/3 + ε2/4 + ε2/2 vs. ε3/3), [j] – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan ε4 u odnosu na referentni genotip (ε3/4 + ε4/4 + ε2/4 vs. ε3/3), SIMU – subkortikalni ishemijski moždani udar, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), * – statistički značajan rezultat, n. d. – nije dostupno.

Dokazana je statistički značajna povezanost polimorfizama *FGB* G-455A i HPA-2 prema recesivnom modelu te genotipa *GP1BA* VNTR BB s pojavom SIMU-a, uz vrlo široke intervale pouzdanosti zbog maloga broja ispitanika s navedenim genotipovima. Genotip *FGB* -455 AA zabilježen je samo u kontrolnoj skupini, ali ne i u djece sa SIMU-om. Također, uočena je veća učestalost genotipova *F13A1* Val34Leu GT i TT i alela T skupini djece sa SIMU-om, a suprotno tome genotipa HPA-5 ab i bb te *ITGA2* 807 TT i 873 AA u kontrolnoj skupini. Međutim, statistički značaj ovih rezultata u ulozi SIMU-a u djece nije utvrđen.

Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece sa SIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu za kombinaciju polimorfizama koji su u modelima univarijatne logističke regresije prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije ishodili rezultat $P < 0,100$ prikazani su u Tablici 38. Multivarijatnom analizom utvrđena je povezanost *ITGA2* 807 C/T,

873 G/A i HPA-2 prema recesivnom modelu te genotipa *GP1BA* VNTR BB s pojavom SIMU-a u djece, dok ostali uključeni polimorfizmi nisu pokazali statistički značajnu povezanost s bolesti. Valja napomenuti da su u ovom slučaju pojedine genske varijante uključene u multivarijatnu analizu relativno rijetke (genotipovi *GP1BA* HPA-2 bb, *ITGA2* 807 TT i 873 AA) što može značajno utjecati na pouzdanost rezultata statističke analize.

Tablica 38. Rezultati multivarijatne logističke regresije u skupini djece s SIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

polimorfizam	**univarijatna logistička regresija**		**multivarijatna logistička regresija**		
	OR (95 % CI)	**P**	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
***FGB* -455 G/A[c]**	n. d.	**0,029***	$2{,}90 \times 10^{-16}$ (n. d.)	0,995	0,995
***F13A1* Val34Leu**	1,98 (0,93 – 4,22)	0,076	2,04 (0,81 – 5,13)	0,130	0,288
***GP1BA* HPA-2 a/b[c]**	**13,15 (1,12 – 154,96)***	**0,037***	**0,01 (n. d.)**	**< 0,001***	**0,007***
***ITGA2* HPA-5 a/b**	0,37 (0,11 – 1,28)	0,080	0,46 (0,12 – 1,72)	0,247	0,288
***ITGA2* 807 C/T[c]**	0,31 (0,07 -1,39)	0,078	**0,01 (n. d.)**	**< 0,001***	**0,007***
***ITGA2* 873 G/A[c]**	0,17 (0,02 – 1,32)	0,029	**53,87 (n. d.)**	**< 0,001***	**0,007***
***GP1BA* VNTR[d]**	**12,69 (1,27 – 127,00)***	**0,031***	**$3{,}75 \times 10^{9}$ (n. d.)**	**< 0,001***	**0,007***

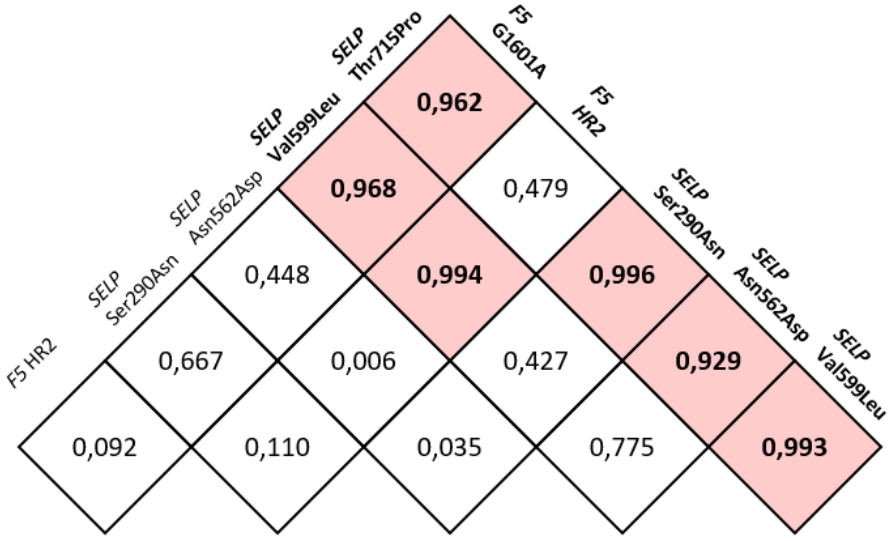
[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, [c] – prikazan je rezultat dobiven prema recesivnom modelu, [d] – prikazan je rezultat modela u kojem je uspoređen genotip BB u odnosu na referentni genotip CC, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), n. d. – nije dostupno, * – statistički značajan rezultat.

4.3. Povezanost odabranih haplotipova s IMU-om u djece i podtipovima bolesti

Osim pojedinačnih polimorfizama, ispitana je i potencijalna udruženost pojedinačnih polimorfizama smještenih na različitim kromosomima u zasebne haplotipove određivanjem neravnoteže povezanosti polimorfizama. U slučaju utvrđene neravnoteže povezanosti dvaju ili više polimorfizama, napravljena je daljnja analiza haplotipova u odnosu na referentni najčešći haplotip te je uz pomoć logističke regresije ispitana potencijalna povezanost pojedinoga haplotipa s nastankom IMU-a u djece i podtipova bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.3.1. Ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama

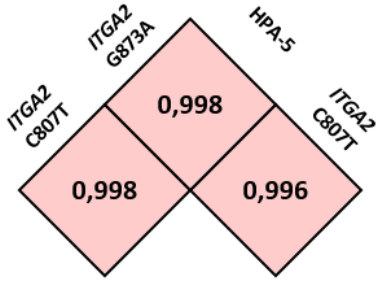
Rezultati ispitivanja neravnoteže povezanosti, nužni radi ispravnoga odabira relevantnih polimorfizama smještenih na 1. kromosomu koji će se dalje zajednički analizirati kao predloženi haplotip, prikazani su na Slici 15. Dokazana je međusobna neravnoteža povezanosti svih šest ispitivanih polimorfizama smještenih na 1. kromosomu što je omogućilo njihovo zajedničko uključivanje u daljnju analizu povezanosti haplotipa *F5/SELP* s IMU-om u djece.



Slika 15. Rezultati ispitivanja neravnoteže polimorfizama za kombinaciju šest polimorfizama unutar *F5* i *SELP* smještenih na 1. kromosomu. Prikazane su D' vrijednosti za svaki par polimorfizama.

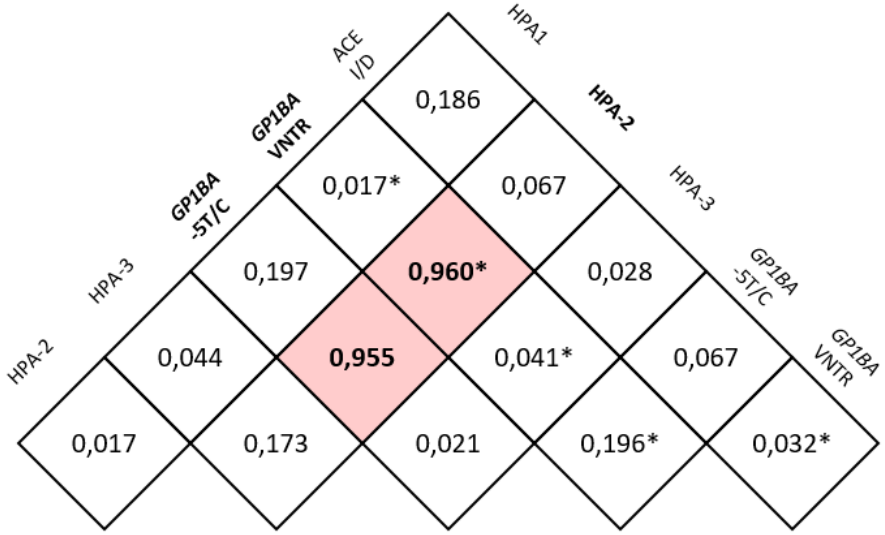
Rezultati ispitivanja neravnoteže povezanosti nužni radi ispravnoga odabira relevantnih polimorfizama sadržanih na 5. kromosomu koji će se dalje zajednički analizirati kao predloženi haplotip prikazani su na Slici 16. Dokazana je međusobna neravnoteža povezanosti svih triju ispitivanih polimorfizama smještenih na 5. kromosomu što je

omogućilo njihovo zajedničko uključivanje u daljnju analizu povezanosti haplotipa *ITGA2* s IMU-om u djece.



Slika 16. Rezultati ispitivanja neravnoteže polimorfizama za kombinaciju tri polimorfizama unutar *ITGA2* smještenog na 5. kromosomu. Prikazane su D' vrijednosti za svaki par polimorfizama.

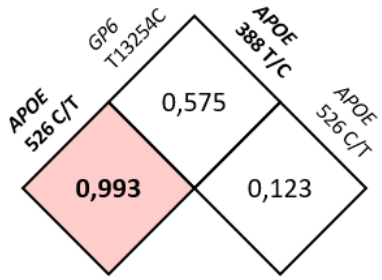
Rezultati ispitivanja neravnoteže povezanosti nužni radi ispravnoga odabira relevantnih polimorfizama sadržanih na 17. kromosomu koji će se dalje zajednički analizirati kao predloženi haplotip prikazani su na Slici 17. Dokazana je je neravnoteža povezanosti samo između polimorfizama *GP1BA* (-5) T/C, VNTR i HPA-2. Iz toga razloga u daljnju su analizu povezanosti haplotipa s IMU-om u djece uključena samo ova tri polimorfizma.



Slika 17. Rezultati ispitivanja neravnoteže polimorfizama za kombinaciju šest polimorfizama unutar *GP1BA* i smještenih na 17. kromosomu. Prikazane su D' vrijednosti za svaki par polimorfizama, dok su za opisivanje neravnoteže kombinacija polimorfizama koje uključuju *GP1BA* VNTR prikazane vrijednosti Cramerovog V (označene zvjezdicom).

U ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama smještenih u *APOE* i *GP6* za svakoga ispitanika uključen je točan genotip za polimorfizme *APOE* 388 T/C i 526 C/T definirane genotipom *APOE* ε2-4. Rezultati ispitivanja neravnoteže povezanosti, nužni radi ispravnoga odabira relevantnih polimorfizama sadržanih na 19. kromosomu koji će se dalje

zajednički analizirati kao predloženi haplotip, prikazani su na Slici 18. Potvrđena je neravnoteža povezanosti polimorfizama koji sastavljaju dobro poznate haplotipove *APOE* ε2-4, dok neravnoteža povezanosti nije utvrđena u odnosu na odabrani polimorfizam u *GP6*. Kako je metoda genotipizacije *APOE* ε2-4 dizajnirana tako da za svakoga pacijenta daje točnu kombinaciju haplotipa u genotipu, a dobiveni podaci o učestalosti već su uključeni u ispitivanje povezanosti haplotipa *APOE* i genotipa s pojavom IMU-a u djece u univarijatnoj i gdje je prikladno u multivarijatnoj logističkoj regresiji, ponovna analiza haplotipova nije potrebna.



Slika 18. Rezultati ispitivanja neravnoteže polimorfizama za kombinaciju ukupno tri polimorfizma unutar *APOE* i *GP6* smještenih na 19. kromosomu. Prikazane su D' vrijednosti za svaki par polimorfizama.

4.3.2. Haplotip *F5/SELP* na 1. kromosomu i IMU udjece

Učestalosti haplotipa *F5/SELP* smještenoga na 1. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te rezultati logističke regresije kojom je ispitana potencijalna povezanost haplotipa s pojavom IMU-a u djece u odnosu na kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 39.

Tablica 39. Raspodjela haplotipova sačinjenih od ispitivanih polimorfizama smještenih na 1. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti haplotipa s pojavom bolesti.

haplotip *F5* 1601 G/A /HR2/ *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/ Val599Leu/Thr715Pro	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
1. G/A/Ser/Asp/Val/Thr	IMU	0,371	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	AIMU	0,360	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	PAIMU	0,391	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	DAIMU	0,341	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	CSVT	0,373	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	KIMU	0,334	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	SIMU	0,421	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	kontrolna skupina	0,353	/	/	/
2. G/A/Ser/Asn/Val/Thr	IMU	0,207	1,01 (0,61 – 1,69)	0,960	0,960
	AIMU	0,223	1,13 (0,66 – 1,93)	0,650	0,813
	PAIMU	0,200	1,78 (0,78 – 4,07)	0,180	0,750
	DAIMU	0,235	1,13 (0,59 – 2,15)	0,710	0,888
	CSVT	0,178	0,63 (0,21 – 1,87)	0,410	0,920
	KIMU	0,232	1,46 (0,75 – 2,84)	0,260	0,616
	SIMU	0,187	0,97 (0,39 – 2,39)	0,940	1,000
	kontrolna skupina	0,212	/	/	/
3. G/A/Ser/Asn/Val/Pro	IMU	0,070	1,06 (0,55 – 2,03)	0,870	0,928
	AIMU	0,075	1,15 (0,57 – 2,30)	0,700	0,813
	PAIMU	0,033	0,78 (0,23 – 2,62)	0,680	0,850
	DAIMU	0,118	1,57 (0,71 – 3,51)	0,270	0,633
	CSVT	0,000	0,84 (0,25 – 2,85)	0,780	0,920
	KIMU	0,079	0,81 (0,30 – 2,20)	0,690	0,940
	SIMU	0,096	1,63 (0,61 – 4,36)	0,330	1,000
	kontrolna skupina	0,069	/	/	/
4. G/A/Asn/Asn/Val/Thr	IMU	0,060	0,54 (0,23 – 1,29)	0,170	0,880
	AIMU	0,039	0,40 (0,15 – 1,09)	0,074	0,693
	PAIMU	0,046	0,58 (0,16 – 2,16)	0,420	0,888
	DAIMU	0,027	0,19 (0,02 – 1,50)	0,120	0,600
	CSVT	0,136	1,27 (0,38 – 4,23)	0,700	0,920
	KIMU	0,034	0,35 (0,09 – 1,40)	0,140	0,616
	SIMU	0,071	0,95 (0,26 – 3,57)	0,940	1,000
	kontrolna skupina	0,089	/	/	/
5. G/A/Asn/Asp/Val/Thr	IMU	0,054	1,16 (0,50 – 2,67)	0,730	0,936
	AIMU	0,064	1,40 (0,58 – 3,34)	0,460	0,813
	PAIMU	0,061	2,46 (0,62 – 9,79)	0,200	0,750
	DAIMU	0,075	1,57 (0,57 – 4,34)	0,380	0,633
	CSVT	0,040	0,93 (0,25 – 3,50)	0,920	0,920
	KIMU	0,104	2,10 (0,75 – 5,92)	0,160	0,616
	SIMU	0,031	0,66 (0,13 – 3,33)	0,610	1,000
	kontrolna skupina	0,068	/	/	/

haplotip *F5* 1601 G/A /HR2/ *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/ Val599Leu/Thr715Pro	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
6. G/A/Ser/Asn/Leu/Thr	IMU	0,077	0,76 (0,37 – 1,57)	0,430	0,880
	AIMU	0,077	0,80 (0,38 – 1,69)	0,560	0,813
	PAIMU	0,092	0,99 (0,33 – 3,01)	0,990	0,990
	DAIMU	0,067	0,82 (0,31 – 2,17)	0,690	0,922
	CSVT	0,091	0,74 (0,18 – 3,05)	0,670	0,975
	KIMU	0,046	0,48 (0,15 – 1,53)	0,220	0,616
	SIMU	0,078	1,22 (0,40 – 3,73)	0,730	1,000
	kontrolna skupina	0,076	/	/	/
7. G/G/Ser/Asp/Val/Thr	IMU	0,051	1,67 (0,61 – 4,58)	0,320	0,880
	AIMU	0,058	2,21 (0,80 – 6,11)	0,130	0,693
	PAIMU	0,028	2,30 (0,36 – 14,59)	0,380	0,888
	DAIMU	0,073	2,91 (0,86 – 9,83)	0,086	0,645
	CSVT	0,029	0,81 (0,08 – 8,13)	0,860	0,975
	KIMU	0,053	2,09 (0,54 – 8,13)	0,290	0,616
	SIMU	0,021	3,14 (0,75 – 13,19)	0,120	0,900
	kontrolna skupina	0,033	/	/	/
8. G/G/Ser/Asn/Val/Thr	IMU	0,034	1,72 (0,54 – 5,50)	0,360	0,880
	AIMU	0,034	1,94 (0,60 – 6,31)	0,270	0,812
	PAIMU	0,059	3,45 (0,66 – 18,19)	0,150	0,888
	DAIMU	0,020	0,98 (0,17 – 5,64)	0,980	0,980
	CSVT	0,015	1,12 (0,15 – 8,07)	0,910	0,975
	KIMU	0,031	1,,84 (0,35 – 9,57)	0,470	0,836
	SIMU	0,025	2,11 (0,37 – 11,84)	0,400	1,000
	kontrolna skupina	0,028	/	/	/
9. G/G/Asn/Asn/Val/Thr	IMU	0,008	0,34 (0,02 – 4,57)	0,410	0,880
	AIMU	0,008	0,50 (0,05 – 4,95)	0,560	0,813
	PAIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	DAIMU	0,016	1,07 (0,16 – 7,17)	0,950	1,000
	CSVT	0,021	n. d.	n. d.	n.d.
	KIMU	0,013	0,92 (0,10 – 8,45)	0,940	0,940
	SIMU	0,018	0,19 (0,00 – 2037049,89)	0,840	1,000
	kontrolna skupina	0,018	/	/	/
10. A/A/Asn/Asp/Val/Thr	IMU	0,018	1,96 (0,35 – 10,94)	0,440	0,880
	AIMU	0,022	3,45 (0,75 – 15,82)	0,110	0,693
	PAIMU	0,036	7,92 (0,61 – 102,88)	0,120	0,888
	DAIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	CSVT	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	KIMU	0,033	5,11 (0,72 – 36,52)	0,110	0,616
	SIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	kontrolna skupina	0,006	/	/	/
11. G/A/Ser/Asp/Leu/Thr	IMU	0,008	n. d.	n. d.	n. d.
	AIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	PAIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	DAIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	CSVT	0,024	**19,76 (1,21 – 323,64)***	**0,038***	0,570
	KIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	SIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	kontrolna skupina	0,006	/	/	/

haplotip *F5* 1601 G/A /HR2/ *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/ Val599Leu/Thr715Pro	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
12. ostali nenavedeni (rijetki)	IMU	0,050	1,25 (0,41 – 3,77)	0,690	0,935
	AIMU	0,040	0,56 (0,16 – 2,01)	0,380	0,812
	PAIMU	0,054	0,93 (0,18 – 4,82)	0,930	0,996
	DAIMU	0,028	0,76 (0,21 – 2,74)	0,670	0,922
	CSVT	0,093	055 (0,06 – 4,99)	0,600	1,000
	KIMU	0,041	1,26 (0,32 – 5,03)	0,740	0,987
	SIMU	0,052	0,84 (0,16 – 4,45)	0,840	1,000
	kontrolna skupina	0,048	/	/	/

Analiza haplotipova je izrađena u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol. Radi uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti.
[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), IMU – ishemijski moždani udar, AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, KIMU – kortikalni ishemijski moždani udar, SIMU – subkortikalni arterijski moždani udar, Ref. – referentni haplotip, n. d. – nije dostupno, / – nije primjenjivo, * – statistički značajan rezultat.

Dobiven je statistički značajan rezultat samo za rijetki haplotip *F5/SELP* G/A/Ser/Asp/Leu/Thr (11. u Tablici 39.) u skupini djece s CSVT-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeni haplotip uočen je samo u skupini djece s CSVT-om gdje povećava rizik za nastanak CSVT-a gotovo 20 puta u odnosu na referentni haplotip¸ dok njegova prisutnost nije zabilježena u skupini djece s AIMU-om. Osim toga, uočena je nešto manja učestalost haplotipa G/A/Asn/Asn/Val/Thr (4. u Tablici 39.) u skupini djece s AIMU-om i nešto veća učestalost haplotipa G/G/Ser/Asp/Val/Thr (7. u Tablici 39.) u skupini djece s DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane statističke značajnosti ovih rezultata.

4.3.3. Haplotip *ITGA2* na 5. kromosomu i IMU u djece

Učestalosti haplotipa *ITGA2* smještenoga na 5. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te rezultati logističke regresije kojom je ispitana potencijalna povezanost haplotipa s pojavom IMU-a u djece i u skupinama po podtipovima bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 40.

Dobiven je statistički značajan rezultat samo za haplotip *ITGA2* C/G/b u skupini s DAIMU-om. Navedeni haplotip uočen je s manjom učestalošću u skupini s DAIMU-om gdje smanjuje rizik za nastanak DAIMU-a u odnosu na referentni haplotip. Osim toga, uočena je nešto manja učestalost haplotipa C/G/b u skupini djece s IMU-om i u skupini djece s KIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane statističke značajnosti ovih rezultata.

Rijetki haplotipovi *ITGA2* C/A/a, T/G/a i T/A/b uočeni su samo u nekoliko slučajeva DAIMU-a i CSVT-a, ali ne i u skupini djece s KIMU-om ili PAIMU-om niti u kontrolnoj skupini.

Tablica 40. Raspodjela haplotipova sačinjenih od ispitivanih polimorfizama smještenih na 5. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti haplotipa s pojavom bolesti.

haplotip *ITGA2* 807C/T / 873 G/A /HPA-5 a/b	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
1. C/G/a	IMU	0,550	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	AIMU	0,544	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	PAIMU	0,522	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	DAIMU	0,506	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	CSVT	0,603	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	KIMU	0,531	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	SIMU	0,608	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	kontrolna skupina	0,482	/	/	/
2. T/A/a	IMU	0,360	0,81 (0,58 – 1,14)	0,230	0,935
	AIMU	0,366	0,85 (0,59 – 1,22)	0,370	0,812
	PAIMU	0,352	0,92 (0,52 – 1,62)	0,770	0,888
	DAIMU	0,379	0,77 (0,50 – 1,18)	0,230	0,686
	CSVT	0,313	0,63 (0,32 – 1,24)	0,180	1,000
	KIMU	0,382	0,92 (0,58 – 1,47)	0,740	0,987
	SIMU	0,319	0,62 (0,34 – 1,13)	0,120	0,900
	kontrolna skupina	0,410	/	/	/
3. C/G/b	IMU	0,083	0,62 (0,35 – 1,09)	0,096	0,935
	AIMU	0,087	0,62 (0,34 – 1,14)	0,130	0,693
	PAIMU	0,126	0,81 (0,37 – 1,78)	0,600	0,912
	DAIMU	0,051	**0,38 (0,15 – 0,94)***	**0,038***	0,570
	CSVT	0,046	0,54 (0,18 – 1,66)	0,280	1,000
	KIMU	0,087	0,61 (0,28 – 1,36)	0,230	0,616
	SIMU	0,050	0,31 (0,09 – 1,08)	0,068	1,000
	kontrolna skupina	0,108	/	/	/
4. ostali nenavedeni (rijetki) **C/A/a** **T/G/a** **T/A/b**	IMU	0,007	n. d.	n. d.	n. d.
	AIMU	0,003	n. d.	n. d.	n. d.
	PAIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	DAIMU	0,064	n. d.	n. d.	n. d.
	CSVT	0,038	n. d.	n. d.	n. d.
	KIMU	0,000	n. d.	n. d.	n. d.
	SIMU	0,023	n. d.	n. d.	n. d.
	kontrolna skupina	0,000	/	/	/

Analiza haplotipova je izrađena u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob i spol. Radi uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti.
[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), IMU – ishemijski moždani udar, AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, KIMU – kortikalni ishemijski moždani udar, SIMU – subkortikalni arterijski moždani udar, Ref. – referentni haplotip, / – nije primjenjivo, * – statistički značajan rezultat.

4.3.4. Haplotip *GP1BA* na 17. kromosomu i IMU u djece

Učestalosti haplotipa *GP1BA* (-5)T/C /VNTR/HPA-2 smještenoga na 17. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te rezultati logističke regresije kojom je ispitana potencijalna povezanost haplotipa s pojavom IMU-a u djece i skupinama po podtipovima bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 41.

Tablica 41. Raspodjela haplotipova sačinjenih od ispitivanih polimorfizama smještenih na 17. kromosomu u skupini djece s IMU-om, u skupinama po podtipovima bolesti i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti haplotipa s pojavom bolesti.

haplotip *GP1BA* (-5) T/C /VNTR/HPA-2	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
1. T/C/a	IMU	0,675	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	AIMU	0,681	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	PAIMU	0,724	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	DAIMU	0,641	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	CSVT	0,645	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	KIMU	0,688	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	SIMU	0,653	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	kontrolna skupina	0,659	/	/	/
2. C/C/a	IMU	0,133	0,83 (0,46 – 1,49)	0,529	0,935
	AIMU	0,124	0,76 (0,41 – 1,44)	0,406	0,812
	PAIMU	0,146	0,85 (0,39 – 1,82)	0,669	0,912
	DAIMU	0,104	0,68 (0,29 – 1,57)	0,366	0,686
	CSVT	0,177	1,15 (0,41 – 3,22)	0,786	1,000
	KIMU	0,104	0,63 (0,26 – 1,53)	0,308	0,616
	SIMU	0,132	0,85 (0,31 – 2,27)	0,740	1,000
	kontrolna skupina	0,157	/	/	/
3. T/B/b	IMU	0,106	1,10 (0,55 – 2,19)	0,793	0,935
	AIMU	0,104	1,07 (0,52 – 2,22)	0,850	0,854
	PAIMU	0,062	0,60 (0,20 – 1,76)	0,353	0,930
	DAIMU	0,144	1,57 (0,69 – 3,53)	0,280	0,700
	CSVT	0,113	1,22 (0,35 – 4,24)	0,750	1,000
	KIMU	0,103	1,05 (0,41 – 2,67)	0,924	0,992
	SIMU	0,128	1,37 (0,48 – 3,88)	0,557	1,000
	kontrolna skupina	0,094	/	/	/

haplotip *GP1BA* (-5) T/C /VNTR/HPA-2	**skupina**	**ukupni ispitanici**			
		učestalost haplotipa	**OR (95 % CI)**	**P[a]**	**P[b]**
4. T/D/a	IMU	0,077	0,91 (0,42 – 1,94)	0,800	0,935
	AIMU	0,080	0,93 (0,42 – 2,05)	0,854	0,854
	PAIMU	0,067	0,74 (0,26 – 2,12)	0,570	0,930
	DAIMU	0,092	1,13 (0,44 – 2,88)	0,799	0,922
	CSVT	0,065	0,79 (0,17 – 3,71)	0,765	1,000
	KIMU	0,098	1,13 (0,43 – 2,96)	0,802	0,987
	SIMU	0,076	0,91 (0,26 – 3,24)	0,890	1,000
	kontrolna skupina	0,083	/	/	/
5. ostali (rijetki)	IMU	0,008	1,33 (0,12 – 14,85)	0,818	0,935
	AIMU	0,010	1,58 (0,14 – 17,70)	0,711	0,813
	PAIMU	0,000	n. d.	0,620	0,930
T/B/a	DAIMU	0,019	3,16 (0,28 – 36,06)	0,355	0,761
T/C/b	CSVT	0,000	n. d.	0,858	1,000
C/D/a	KIMU	0,008	1,16 (0,04 – 31,03)	0,930	0,992
C/B/b	SIMU	0,012	2,00 (0,08 – 52,75)	0,677	1,000
	kontrolna skupina	0,007	/	/	/

Analiza haplotipova je izrađena u statističkom programu R uz korekciju za dob i spol. Radi uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti.
[a] – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, [b] – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika (engl. *odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), IMU – ishemijski moždani udar, AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, KIMU – kortikalni ishemijski moždani udar, SIMU – subkortikalni arterijski moždani udar, Ref. – referentni haplotip, / – nije primjenjivo, n. d. – nije dostupno, * – statistički značajan rezultat.

Kako se raspodjela haplotipova nije značajno razlikovala između djece s IMU-om i podtipovima bolesti u usporedbi s kontrolnom skupinom, logističkom regresijom nije utvrđena povezanost haplotipova *GP1BA* s IMU-om u djece i s podtipovima bolesti. Rijetki haplotipovi uočeni su samo u djece s DAIMU-om, dok njihova prisutnost nije utvrđena u djece s PAIMU-om ili CSVT-om.

5. RASPRAVA

Razumijevanje genetičke osnove IMU-a osnovni je preduvjet razvoju i primjeni standardiziranih protokola za dijagnozu, procjenu ishoda i terapiju bolesti, a u duhu današnje medicine usmjerene na novi koncept osobnoga pristupa, prevenciju i predviđanje bolesti. U sklopu ovog istraživanja ispitane su genske varijacije u literaturi spomenute u kontekstu IMU-a u djece, ali i one koje još uopće nisu ispitane u djece s IMU-om, dok za dio varijacija postoji tek malen broj objavljenih radova ograničenih na manje populacije sa značajnim metodološkim razlikama. Ovim istraživanjem nastojale su se prikupiti nove informacije o pojedinačnoj i eventualnoj zajedničkoj ulozi ispitivanih genskih čimbenika u etiologiji IMU-a u djece s obzirom na dob pojave bolesti, tip i lokalizaciju IMU-a.

Različita objavljena epidemiološka istraživanja pokazala su da se rizik za nastanak IMU-a mijenja ovisno o dobi djeteta, što je posebno zanimljivo ako se uzme u obzir i činjenica da su za pojedina dobna razdoblja u djece karakteristični različiti čimbenici za pojavu bolesti (12). IMU se u djece najčešće javlja u perinatalnom periodu, što je i prikazano rezultatima ovog istraživanja gdje je čak 40 % svih slučajeva predstavljalo PAIMU. Dobiveni rezultati u skladu su s nedavno objavljenom meta-analizom (22) i velikom studijom koja je pokazala da se četvrtina svih slučajeva AIMU-a javlja u perinatalnom periodu (24). Zabilježen veći udio PAIMU-a u odnosu na ostale podtipove u ispitivanoj populaciji vjerojatno je prouzročen poboljšanjem dijagnostičkih mogućnosti, odnosno, zahvaljujući dostupnosti moćnijih slikovnih tehnika za dijagnostiku bolesti, ali i primjeni novijih dijagnostičkih smjernica za PAIMU kojega je ponekad moguće previdjeti zbog blaže ekspresije simptoma i plastičnosti mladoga mozga. Međutim, također je moguće da je dobiveni rezultat ograničen na geografsku lokaciju. Dakle, ovim istraživanjem je utvrđena podjednaka zastupljenost PAIMU-a (N = 74) i DAIMU-a (N = 80) te rjeđa učestalost CSVT-a (N = 31) u Hrvatskoj, što je u skladu i s prethodnim istraživanjima provedenim tijekom perioda 1998. do 2005. godine (28, 32). Dodatno je utvrđena i pet puta veća učestalost AIMU-a u odnosu na CSVT u djece u Hrvatskoj.

Velike međunarodne multicentrične studije utvrdile su veću učestalost pojave IMU-a u dječaka nego u djevojčica bez obzira na tip IMU-a, gdje je objavljeni omjer dječaka u odnosu na djevojčice iznosio 1,49 prema jedan (13, 33). U ovom istraživanju također je utvrđena veća zastupljenost dječaka u ukupnoj skupini djece s IMU-om, ali i podtipovima AIMU-a, DAIMU-a, KIMU-a i SIMU-a, dok razlika u zastupljenosti djece prema spolu nije uočena u podtipovima PAIMU-a i CSVT-a. Zabilježeni su omjeri dječaka u odnosu na djevojčice s

IMU-om, AIMU-om, PAIMU-om, DAIMU-om i CSVT-om od 1,31, 1,41, 1,24, 1,58, odnosno, 0,94 prema jedan. U prethodno objavljenim studijama ograničenim na Hrvatsku tijekom perioda od 1998. do 2010. godine dobiveni su slični rezultati osim za PAIMU gdje je također dobiven nešto veći omjer dječaka (1,33 prema jedan), dok je za DAIMU dobiven omjer dječaka od čak 2,8 prema jedan (28, 32, 34). Dobiven podjednak udio dječaka i djevojčica s PAIMU-om također se može objasniti kao i ranije komentirana veća učestalost PAIMU-a u odnosu na ostale podtipove u populaciji Hrvatske, odnosno, vjerojatno je posljedica poboljšanja dijagnostičkih mogućnosti ili predstavlja geografsku posebnost. Međutim, prethodno objavljena istraživanja u Hrvatskoj obuhvaćala su razmjerno manji broj ispitanika u odnosu na opisano istraživanje pa njihove rezultate treba tumačiti kao preliminarne. Nadalje, u ovom istraživanju zabilježena je podjednaka zastupljenost dječaka i djevojčica u skupini djece s CSVT-om (omjer u odnosu na djevojčice jest 0,94 prema jedan) što je prvi objavljeni podatak o raspodjeli CSVT-a unutar spolova u djece u Hrvatskoj. Iako dobiveni rezultat nije u skladu s rezultatima velikih međunarodnih multicentričnih studija koje su utvrdile veću učestalost CSVT-a u dječaka (60 – 70 %) nego u djevojčica (29), rezultat se može protumačiti kao geografski uvjetovan. Ovim istraživanjem je utvrđeno da spol ne predstavlja rizični čimbenik za nastanak CSVT-a u djece u Hrvatskoj, ali dobiveni rezultat treba potvrditi na većem uzorku.

Uvidom u dostupne literaturne baze podataka nisu pronađena istraživanja u kojima je napravljena analiza IMU-a u djece prema lokalizaciji na opisan način pa je dobiveni rezultat za pojavnost KIMU-a i SIMU-a jedinstven. Utvrđena je 1,6 puta veća učestalost KIMU-a u odnosu na SIMU, a najveći omjer dječaka u odnosu na djevojčice dobiven je upravo u skupini djece sa SIMU-om gdje iznosi 1,69 prema jedan. Ovaj rezultat može upućivati na lokalizirani nastanak IMU-a ovisno o spolu. Međutim, zbog zahtjevnosti određivanja lokalizacije IMU-a u djece za koje su potrebne stručnost i znanje koje izlazi van područja ovoga doktorskog rada, ovim istraživanjem samo su djelomično prikupljeni podaci o lokalizaciji IMU-a u djece (60,5 %). Kako je također moguća i miješana kortikalno-subkortikalna lokalizacija IMU-a, koja nije obuhvaćena ovim doktorskim radom zbog složenosti utvrđivanja točne lokalizacije, za potvrdu dobivenih podataka potrebna su daljnja istraživanja koja bi suradnjom s kliničkim radiolozima omogućila precizno određivanje lokalizacije IMU-a u sve djece.

Unatoč utvrđenoj većoj pojavnosti IMU-a u dječaka, uzroci tome ostaju nejasni. Jedan od mogućih uzroka različite pojavnosti mogu biti hormonske razlike između dječaka i djevojčica zbog većih koncentracija estrogena u adolescentnoj dobi u djevojčica ili moguće uloge endogenoga testosterona (20, 248). Logično je pretpostaviti i gensku sklonost dječaka

pojavi IMU-a, ali kako ovim ispitivanjem nisu obuhvaćene genske varijacije izravno smještene na spolnim kromosomima, to jest, uključene genske varijacije nisu izravno povezane sa spolom, unatoč većoj učestalosti pojedinih podtipova bolesti u dječaka, daljnje ispitivanje utjecaja odabranih genskih varijacija ovisno o spolu nije opravdano pa stoga nije ni napravljeno. Uvođenje podjele po spolu dodatno bi umanjilo pouzdanost rezultata statističke obrade zbog dodatnoga dijeljenja ispitivanih skupina.

Do danas je prepoznat velik broj nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika za razvoj IMU-a u djece čija se učestalost može razlikovati ovisno o geografskom području i etničkim karakteristikama, kao i s obzirom na tip IMU-a i dob djeteta (1, 46). Međutim, u više od 60 % djece s IMU-om moguće je utvrditi prisutnost više rizičnih čimbenika (47), dok je u oko 30 % slučajeva etiologija bolesti nerazjašnjena (1, 48). Trombofilija je prepoznata kao jedan od čimbenika rizika za nastanak IMU-a u djece koja pridonosi pojavi tromboze narušavanjem fiziološke ravnoteže između protrombotičkih i antitrombotičkih čimbenika hemostatskoga sustava, odnosno, pomicanjem ravnoteže u smjeru tromboze. Također, polimorfizmi u trombocitnim glikoproteinskim receptorima koji uzrokuju pojačanu aktivaciju i agregaciju trombocita također mogu doprinijeti nastanku protrombotičkoga stanja. Međutim, postoje dokazi da pojedini trombofilni čimbenici neovisno povećavaju rizik pojave bolest (1, 6). Primjerice, povišena koncentracija lipoproteina(a), *F5* 1601 G/A, *F2* 20210 G/A, manjak proteina C i polimorfizmi *MTHFR* pokazali su se kao neovisni čimbenici rizika za AIMU (68, 69). Protrombotički rizični čimbenici koji povećavaju rizik nastanka CSVT-a u djece uključuju mutaciju *F5* 1601 G/A, lupus antikoagulant i nedostatke proteina C, proteina S, antitrombina i čimbenika XII (65). Trombofilna stanja koja predstavljaju čimbenike rizika za razvoj CSVT-a u djece mogu biti genetički uvjetovana, ali je uočena snažnija povezanost stečenih protrombotičkih poremećaja nastalih pod utjecajem aktivne bolesti s pojavom CSVT-a u djece (74). Potencijalni protrombotički rizični čimbenici su mnogobrojni, ali su i dalje nedovoljno istraženi u IMU-u u djece, pogotovo u pojedinim podtipovima, ali i u smislu udruženosti ovih čimbenika. Naime, poznato je da prisutnost pojedinoga rizičnog čimbenika može biti od manjega značaja, ali istodobna prisutnost više rizičnih čimbenika može povećati rizik (1, 68, 75). Kako bi se ispitala hipoteza da su različiti podtipovi IMU-a u djece okarakterizirani različitim genetičkim rizičnim čimbenicima, u ovom istraživanju ispitan je potencijal 21 polimorfizma u 13 gena kandidata, koji uključuju polimorfizme čimbenika zgrušavanja i fibrinolize, polimorfizme GP-a trombocitne membrane i polimorfizme vezane uz intermedijarne rizične čimbenike (Tablica 15.), te odabranih udruženih polimorfizama i

haplotipova kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak IMU-a u djece ovisno o tipu IMU-a, dobi i lokalizaciji lezije u odnosu na kontrolnu skupinu u populaciji Hrvatske.

Za sljedećih 10 ispitanih genskih varijacija u ovome je istraživanju dokazana povezanost s pojavom IMU-a ili podtipa bolesti: *F5* 1601 G/A, *FGB* -455 G/A, *ITGB3* HPA-1 a/b, *GP1BA* HPA-2 a/b, *ITGA2* 807 C/T, 873 G/A i HPA-5 a/b, *ITGA2B* HPA-3 a/b, *GP1BA* VNTR i *ACE* I/D.

FV je ključni čimbenik koji sudjeluje u održavanju hemostatske ravnoteže jer sudjeluje i u prokoagulacijskom i u antikoagulacijskom putu hemostaze (79, 81). Dobro je poznato da *F5* 1601 G/A uzrokuje rezistenciju na APC jer uzrokuje promjenu AK-a u glavnom ciljnom mjestu djelovanja APC-a, čime se narušava APC-om posredovana razgradnja FVa i aktivnost FV kao kočimbenika za APC prilikom inaktivacije FVIIIa (79, 85). Time se FVa duže zadržava u cirkulaciji zbog čega podupire pojačanu aktivnost protrombinaznoga kompleksa i daljnje stvaranje trombina. *F5* 1601 G/A najčešće se povezuje s nastankom venske tromboze gdje prisutnost povećava rizik nastanka bolesti 5 do 7 puta u heterozigota i do 80 puta u homozigota (79, 83). Rezultati ovoga istraživanja pokazali su gotovo tri puta veći rizik za nastanak IMU u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA u multivarijatnoj analizi zajedno s ACE I/D, iako prisutnost genotipa *F5* 1601 GA sama za sebe ipak nije pokazala povezanost s bolesti. Nadalje, u djece s AIMU-om i PAIMU-om, uočeno je da nositelji alela *F5* 1601A imaju tri, odnosno četiri puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosi na nositelje divljega tipa, a multivarijatnim modelom logističke regresije je dodatno utvrđen i četiri, odnosno šest puta veći rizik za nastanak AIMU-a, odnosno PAIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA. U djece s KIMU-om dokazana je statistički značajna povezanost *F5* G1601A gdje nositelji genotipa GA, odnosno alela A maju 4, odnosno 5 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje genotipa GG, odnosno alela G, te je multivarijatnom analizom potvrđen 5,3 puta veći rizik za nastanak KIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA. Međutim, nije dokazana povezanost ove genske promjene s nastankom DAIMU-a ni SIMU-a zbog čega bi *F5* 1601 G/A mogao biti važan čimbenik u etiologiju PAIMU-a i razlikovanju od DAIMU-a, odnosno, u etiologiji KIMU-a i razlikovanju od SIMU-a. Ranija istraživanja provedena u Hrvatskoj utvrdila su čak više od sedam puta veći rizik za nastanak PAIMU-a i DAIMU-a, odnosno AIMU-a (34) (32), dok je kasnijim istraživanjem utvrđen oko pet puta veći rizik za nastanak AIMU-a i više od osam puta veći rizik za nastanak PAIMU-a (32). Razlika u uočenim dosezima utjecaja ovog genotipa na nastanak bolesti vjerojatno je posljedica veličine ispitivane skupine uključene u pojedino objavljeno istraživanje pa se dobiveni rezultat u predloženom istraživanju može smatrati

najpouzdanijim za populaciju Hrvatske jer uključuje najveći broj slučajeva. Objavljeni rezultati u drugim populacijama objedinjeni su u nekoliko meta analiza, od kojih je najstarija obuhvatila 9 pojedinačnih istraživanja, ali nije dokazala povezanost s AIMU-om (249), dok su kasnije veće meta analize pokazale da prisutnost *F5* 1601 G/A približno tri puta povećava rizik za pojavu AIMU-a i PAIMU-a, ali i CSVT-a, što je razlika u odnosu na rezultate ovoga istraživanja (68, 250, 251).

Polimorfizam *FGB* -455 G/A povećava sintezu β-lanaca fibrinogena i posljedično koncentraciju fibrinogena u plazmi što predstavlja rizični čimbenik za arterijsku i vensku trombozu jer utječe na strukturu fibrinskoga ugruška, ali i fibrinogena jer sudjeluje u drugim važnim hemostatskim procesima gdje sudjeluje kao preteča fibrina, medijator agregacije trombocita i značajno utječe na viskoznost krvne plazme (111–113, 117). Kao protrombotički rizični čimbenik povezuje se s pojavom kardiovaskularnih bolesti, uključujući IMU (111, 116, 252). Nedavna meta-analiza uključila je 49 studija te je utvrdila povezanost alela *FGB* -455A s povećanim rizikom nastanka IMU-a u općoj azijskoj populaciji, ali ne i u bijelaca koji su bili zastupljeni u samo tri studije (118). Meta-analizom je utvrđena povezanost *FGB* -455 G/A sa smanjenim rizikom od venske tromboembolije među bijelom populacijom (119). U istraživanjima provedenim na hrvatskoj, poljskoj i indijskoj populaciji nije utvrđena povezanost polimorfizma *FGB* -455 G/A s nastankom AIMU-a u djece (32, 120, 253), dok uloga u CSVT-u i drugim podtipovima bolesti do danas nije ispitana. U ovom istraživanju dokazana je statistički značajna povezanost polimorfizama *FGB* -455 G/A gdje je genotip *FGB* -455 AA zabilježen je samo u kontrolnoj skupini, ali ne i u djece sa SIMU-om zbog čega se može zaključiti da genotip AA može imati zaštitni učinak na pojavu SIMU-a u djece. Ne postoje drugi rezultati ispitivanja povezanosti polimorfizama sa SIMU u djece, zbog čega je dobiveni rezultat jedinstven.

Kompleks GPIIb/IIIa najzastupljeniji je receptor trombocitne membrane čija je uloga u hemostazi posredovanje u adheziji trombocita na izvanstanični matriks vezanjem na glavni ligand fibrinogen, ali i VWF, fibronektin i vitronektin, a veže i slijed Lys-Gln-AlaGly-Asp-Val (KQAGDV) na C-kraju γ-lanca fibrinogena zbog čega je ključan i za agregaciju trombocita te stvaranje ugruška premošćivanjem susjednih trombocita pomoću fibrinogena (138, 148). Ovim istraživanjem potvrđena je povezanost dva polimorfizma u dva gena koji kodiraju za podjedinice kompleksa GPIIb/IIIa s nastankom IMU-a u djece.

Prisutnost polimorfizma *ITGB3* HPA-1 a/b (varijante Pl^{A1} i Pl^{A2}) usmjerava kompleks GPIIb/IIIa prema aktivnom stanju (176) i uzrokuje pojačan agregacijski odgovor *in vitro* potaknut adenozin-difosfatom, adrenalinom i kolagenom, te povećanu osjetljivost na

antiagregacijske lijekove u odnosu na alel a (177, 178), a povezan je i s povećanjem ekspresije P-selektina na površini trombocita (148). Učestalost alela *ITGB3* HPA-1b u Hrvatskoj iznosi 27,4 % (153), dok je ovim istraživanjem u kontrolnoj skupini djece utvrđena učestalost od samo 13,8 %, u ukupnoj skupini djece s IMU-om utvrđena je učestalost od 16,5 %, dok je najveća učestalost utvrđena u skupini djece s CSVT-om gdje iznosi 22,6 %. Meta-analize sažele su objavljene radove koji su ispitivali povezanost *ITGB3* HPA-1 s pojavom IMU-a u odraslih. U meta-analizi iz 2014. godine dokazano je da prisutnost *ITGB3* HPA-1b povećava rizik za nastanak bolesti, dok je meta-analiza objavljena 2017. opovrgnula taj prethodno objavljeni rezultat (77, 179). Uloga *ITGB3* HPA-1 u IMU-u u djece do danas je ispitana u nekoliko geografski ograničenih istraživanja na manjem broju slučajeva s oprečnim rezultatima (32, 34, 120, 163, 180). U grčkom, sjevernoameričkom i dva hrvatska istraživanja nije utvrđena povezanost s pojavom bolesti (32, 34, 163, 180). Suprotno tome, sjevernoindijsko istraživanje sugerira da polimorfizam *ITGB3* HPA-1 a/b može povećati rizik za nastanak IMU-a u djece (120). Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s većinom prethodno objavljenih istraživanja (32, 34, 163, 180) osim sjevernoindijskog (120): utvrđena je značajna povezanost *ITGB3* HPA-1 a/b s CSVT-om gdje prema prekodominantnom modelu nositelji genotipa ab sada imaju 2,5 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje homozigotnih genotipa aa ili bb. Također, uočena je i veća učestalost alela *ITGB3* HPA-1 b te moguća povezanost *ITGB3* HPA-1 a/b s nastankom bolesti prema dominantnom modelu, ali bez dokaza statističke značajnosti nakon analize logističkom regresijom. Kako u literaturi nema usporedivih rezultata za CSVT u djece, dok su azijska istraživanja ukazala na eventualnu povezanost *ITGB3* HPA-1 a/b s IMU-om u odraslih bez daljnje podjele bolesti prema dobi i podjeli prema djelu zahvaćene cirkulacije (77, 179), zbog moguće geografske specifičnosti pojedinih genetičkih varijacija svakako bi rezultate dobivene ovim istraživanjem trebalo potvrditi na većem broju ispitanika s CSVT-om te obuhvatiti i druge populacije.

Polimorfizam *ITGA2B* HPA-3 a/b (varijante Bak^a i Bak^b) nalazi se uz regiju koja je uključena u adheziju trombocita na kolagen, iako za nositelje *ITGA2B* HPA-3b nije dokazan pojačan agregacijski odgovor trombocita *in vitro* potaknut adrenalinom i kolagenom u odnosu na nositelje *ITGA2B* HPA-3a, kao kod učinka *ITGB3* HPA-1 a/b (178). Učestalost alela *ITGA2B* HPA-3b iznosi 48 % u bijelaca, 32 % u Afrikanaca te 40,5 % u Azijata, dok je u Hrvatskoj zabilježena veća učestalost koja iznosi 68,0 % (150, 153). Ovim istraživanjem utvrđene su snižene učestalosti u svim ispitivanim skupinama: u kontrolnoj skupini djece utvrđena je učestalost od samo 44,3 %, u ukupnoj skupini djece s IMU-om utvrđena je učestalost od 39,5 %, dok je najmanja učestalost utvrđena u skupini djece s DAIMU-om gdje

iznosi 34,8 %. Povezanost *ITGA2B* HPA-3 s pojavom IMU-a u odraslih ispitana je u nizu radova i sažeta meta-analizom gdje je utvrđeno da prisutnost *ITGA2B* HPA-3b povećava rizik za IMU u Azijata, ali ne i u bijelaca (77). Međutim, povezanost *ITGA2B* HPA-3 s IMU-om u djece do danas je ispitana samo u populaciji Hrvatske u nekoliko istraživanja na manjem broju slučajeva s oprečnim rezultatima. U starijem istraživanju nije utvrđena povezanost ovih polimorfizama s pojavom bolesti (34), dok su rezultati novijega hrvatskog istraživanja na većem uzorku sugerirali moguć zaštitni učinak alela *ITGA2B* HPA-3b na pojavu AIMU-a u djece, a daljnjom analizom povezanost je dokazana za PAIMU, ali ne i za DAIMU (32).

U ovom istraživanju uočena je smanjena učestalost genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab i bb u skupini djece s IMU-om, ali ipak bez dokazane statističke značajnosti, što nije u skladu sa starijem istraživanju u populaciji Hrvatske (34), ali se slaže s prethodno objavljenim rezultatima u hrvatske djece (32). Dokazani umjereni smanjeni rizik za nastanak bolesti za nositelje genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab i bb prema dominantnom modelu u skupini djece s AIMU-om u ovom istraživanju, potvrđen je i multivarijatnom analizom, a dodatno je uočena i smanjena učestalost alela b u skupini djece s AIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane statističke značajnosti. Navedeni rezultati u skladu su s prethodno objavljenim istraživanjem IMU-a u djece u Hrvatskoj (32), osim s prvim objavljenim rezultatima (34). U djece s PAIMU-om u ovom je istraživanju uočena statistički značajna povezanost genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab gdje prema prekodominantnom modelu nositelji imaju umjereno smanjen rizik za nastanak bolesti u odnosu na nositelje homozigotnih genotipova, što je potom dodatno potvrđeno i multivarijatnom analizom, dok rezultat nije bio značajan u dominantnom modelu. Navedeni rezultati djelomično se slažu s prethodno objavljenim istraživanjem IMU-a u djece u Hrvatskoj gdje je povezanost dobivena za dominantni model (32), ali ne i s najstarijim i ujedno najmanjim istraživanjem gdje uopće nije utvrđena povezanost polimorfizma *ITGA2B* HPA-3 a/b s PAIMU-om (34). Iako nositelji alela *ITGA2B* HPA-3b imaju umjereno smanjen rizik za nastanak DAIMU-a u odnosu na nositelje referentnih alela u ovom istraživanju, unatoč uočenoj povećanoj učestalosti genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab i bb u kontrolnoj skupini u odnosu na DAIMU, statističkom analizom nije dokazan zaštitni učinak prema dominantnom i recesivnom modelu. Ovaj je rezultat u skladu sa svim prethodno objavljenim rezultatima (32, 34). Ovim istraživanjem nije dokazana povezanost polimorfizma *ITGA2B* HPA-3 a/b s pojavom CSVT-a u djece. Međutim, niska incidencija CSVT-a u djece utječe na pouzdanost dobivenih rezultata pa bi bez obzira na sve do sada dobivene rezultate trebalo uključiti potreban broj slučajeva u većem ispitivanju radi postizanja zadovoljavajuće snage dokaza.

GPIbα djeluje u sklopu kompleksa GPIb/IX/V kao ključan sudionik hemostaze jer započinje adheziju trombocita na imobilizirani VWF na stijenci krvnih žila pri uvjetima povećane brzine protoka arterijske krvi, što se događa prilikom vaskularne ozljede, ali i patološkim stanjima poput IMU-a (148). Multifunkcionalni je receptor pa se smatra koordinatorom koagulacije i upalnoga odgovora te bi mogao predstavljati zajednički regulatorni receptor koji regulira vremenski ovisan prijelaz od početne adhezije trombocita, aktivacije i agregacije, do koagulacije i upale kao odgovora na vaskularnu ozljedu ili bolest, primjerice, vezanjem na VWF, trombin ili P-selektin (165, 166). Ovim istraživanjem dokazana je povezanost genotipa *GP1BA* HPA-2 bb te genotipa *GP1BA* VNTR BB s pojavom SIMU-a gdje prisutnost svakoga pojedinog genotipa neovisno povećava rizik nastanka bolesti 13 puta. Multivarijatnom analizom potvrđena je povezanost genotipa *GP1BA* VNTR BB i genotipa *GP1BA* HPA-2 bb s pojavom SIMU-a u djece, a slična je povezanost dobivena i za *ITGA2* 807 TT i 873 AA. Međutim, još jednom je potrebno naglasiti kao i u slučaju polimorfizma *FGB* -455 G/A da su i u ovom slučaju genske varijante uključene u multivarijatnu analizu relativno rijetke što može značajno utjecati na pouzdanost rezultata statističke analize na što upućuju, na primjer, zbunjujuće vrijednosti omjera rizika za *GP1BA* HPA-2 a/b i *ITGA2* 873 G/A te općenito dobiveni široki intervali pouzdanosti zbog maloga broja ispitanika s pojedinim genotipovima.

Najčešće opisani polimorfizam *GP1BA* HPA-2 ne utječe na vezanje trombina, ali uzrokuje veći afinitet za vezanje na VWF potaknuto ristocetinom ili botrocetinom (172). Učestalost alela *GP1BA* HPA-2b iznosi 14 % u bijelaca, 29 % u Afrikanaca te 5 % u Azijata (150), dok je za zdravu populaciju Hrvatske objavljena učestalost od 21,0 % (153). Ovim istraživanjem u kontrolnoj skupini djece utvrđena je nešto niža učestalost od samo 9,7 %, u ukupnoj skupini djece s IMU-om utvrđena je učestalost 10,9 %, dok je najveća učestalost utvrđena u skupini djece sa SIMU-om gdje iznosi 13,1 %. Iako su pojedinačna novija istraživanja (173) kao i ranije meta-analize (174), utvrdile povezanost *GP1BA* HPA-2 s pojavom IMU-a, meta-analiza koja je uključila 13 neovisnih istraživanja, nije potvrdila takve nalaze niti u miješanoj populaciji niti u odvojenim populacijama odraslih bijelaca i Azijata (77). Uloga *GP1BA* HPA-2 u IMU-u u dječjoj populaciji do danas je ispitana samo u tri istraživanja, dva hrvatska (32, 34) i jedno sjevernoameričko (163), ali niti jednim nije utvrđena povezanost s pojavom bolesti, što se slaže s rezultatima ovoga istraživanja. Međutim, dobivene rezultate u skupini djece sa SIMU-om treba tumačiti oprezno s obzirom na već raspravljenu rijetku učestalost genotipa *GP1BA* HPA-2bb.

Polimorfizam *GP1BA* VNTR također može utjecati na hemostazu te se smatra da prisutnost dugih alela polimorfizma *GPIBA* VNTR A ili B može biti povezana s povećanim rizikom od nastanka tromboze (170), dok genotip VNTR CD u odnosu na CC može utjecati na stvaranje trombocitnog ugruška pod povećanom brzinom protoka arterijske krvi (171). Već spomenuta meta-analiza obuhvatila je i 9 istraživanja u kojima je ispitivana povezanost *GPIBA* VNTR s nastankom IMU-a te je utvrđena povezanost alela *GP1BA* VNTR B s pojavom IMU-a u miješanoj populaciji i u bijelaca, ali ne i u azijskoj populaciji (77). Ovim istraživanjem povezanost za genotip *GP1AB* VNTR BB nije dobivena u ukupnoj populaciji djece s IMU-om već samo u skupini djece sa SIMU-om. Ovim istraživanjem dobiven je jedinstveni rezultat budući da uloga *GP1AB* VNTR u IMU-u u dječjoj populaciji do danas nije ispitana u dostupnim literaturnim podatcima niti u Hrvatskoj niti u drugim populacijama, ali ga također treba tumačiti oprezno s obzirom na već raspravljen utjecaj rijetkih genotipova u koje se ubraja i *GP1BA* VNTR BB. Ovim istraživanjem dobiveni su vrijedni rezultati koje je svakako potrebno dalje potvrditi na većem broju ispitanika i u različitim populacijama.

Polimorfizmi *ITGA2* 807 C/T, 873 G/A i HPA-5 a/b u literaturi su spominjani u kontekstu hemostaze i tromboze te vezanih bolesti (145, 147–149). Nositelji alela *ITGA2* 807T, 873A i HPA-5b pokazuju visoke razine ekspresije GPIa/IIa na površini trombocita, dok nositelji alela 807C, 873G pokazuju nižu ekspresiju toga kompleksa (145, 150) jer mogu utjecati na stabilnost mRNA što utječe na njegovu ekspresiju (148, 151). Osim toga, dokazano je da HPA-5 utječe na smanjenje adhezije trombocita na dekorin, ali ne i na kolagen (152). Ovim istraživanjem dobivena je učestalost u kontrolnoj skupini djece od 10,8 %, što je niža učestalost nego prethodno objavljena koja je iznosila 20,1 % (153), te se slaže s objavljenim učestalostima u bijelaca (150). Ovo istraživanje je pokazalo samo umjereno smanjen rizik za nastanak DAIMU-a u nositelja alela *ITGA2* HPA-5 b u odnosu na nositelje referentnoga genotipa. Uočena je i povećana učestalost genotipa HPA-5 aa u skupini s DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane statističke značajnost, međutim, multivarijatnom analizom je utvrđeno da genotipovi koji sadrže barem jedan alel b alel prilično smanjuju rizik nastanka bolesti. Prethodno objavljena istraživanja uloge *ITGA2* HPA-5 u IMU-u u djece u populaciji Hrvatske nisu utvrdila povezanost s podtipovima bolesti (32, 34). Od objavljenih radova i meta-analiza u odrasloj populaciji (77, 162), samo je tuniško istraživanje pokazalo povezanost *ITGA2* HPA-5 s povećanim rizikom za nastanak IMU-a (147).

U ovom istraživanju uočena je veća učestalost genotipa *ITGA2* 807 TT i 873 AA u kontrolnoj skupini što može upućivati na zaštitnu ulogu ovih genotipova. Međutim, statistički

značaj ovih rezultata u ulozi SIMU-a u djece nije utvrđen. Multivarijatnom analizom utvrđena je zaštitna uloga genotipa *ITGA2* 807 TT, dok je za genotip *ITGA2* 873 AA dobiven zbunjujući rezultat koji ukazuje na povećanje rizika nastanka SIMU-a u djece. Kako su i ovom slučaju genotipovi *GP1BA ITGA2* 807 TT i 873 AA relativno rijetki u ispitivanim skupinama, dobiveni rezultati statističke analize nisu pouzdani što se posebno očituje u zbunjujućim rezultatima multivarijatne logističke regresije jer se smatra da su polimorfizmi *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A međusobno povezani te podjednako utječu na stabilnost mRNA i posljedično na ekspresiju GPIa/IIa (148, 151). Ovo je prvo istraživanje koja ispituje povezanost polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A s nastankom IMU-a u djece u populaciji Hrvatske. Od ostalih populacija, objavljeni su rezultati na sjevernoameričkoj populaciji gdje također nije utvrđena povezanost *ITGA2* 873 G/A s pojavom IMU-a u djece (163), dok povezanost *ITGA2* 807C/T s pojavom IMU-a u djece do danas nije ispitana. Istraživanja povezanosti *ITGA2* 807 C/T s IMU-om u odraslih pronašla su povezanost između alela *ITGA2* 807T i IMU-a u cjelokupnoj i azijskoj populaciji, u populacijama Han i južne Kine, ali ne i u bijeloj populaciji (77, 157, 158), a dodatno je utvrđen i zaštitni učinak genotipa *ITGA2* 807 TT (77). Genotip *ITGA2* 873 AA pokazao je značajnu povezanost s pojavom IMU-a u osmogodišnjoj prospektivnoj skupini kineskih pacijenata s dijabetesom tipa 2 (159), dok meta-analiza i novije istraživanje nisu pokazali povezanost s nastankom IMU-a (160, 161). Uzimajući u obzir objavljene rezultate u odraslih, dobiveni rezultati ispitivanja povezanosti *ITGA2* 807 C/T i ITGA2 873 G/A u SIMU-u u djece mogli bi upućivati na potencijalnu ulogu ovih polimorfizama u lokacijski uvjetovanom nastanku IMU-a u djece.

Dobiveni rezultati doista ukazuju na potencijalnu ulogu trombocitnih glikoproteinskih receptora u nastanku IMU-a u djece jer su utvrđene povezanosti većine ispitivanih genskih varijacija glikoproteinskih receptora s IMU-om u djece, što je jedan od ciljeva ovoga rada, iako je za dio varijacija utvrđena povezanost bila slaba zbog niske incidencije pojedinog tipa IMU-a ili prisutnosti rijetkih alela. Promjene u strukturi i funkciji proteina membrane trombocita mogu dovesti do promjena u staničnoj signalizaciji te posljedično promijeniti uobičajenu funkciju trombocita, uključujući adheziju i agregaciju trombocita, i tako doprinijeti patofiziološkim procesima među kojima je i IMU (137–141). Nadalje, dobiveni zaštitni učinak polimorfizma *ITGA2B* HPA-3 a/b u djece s IMU-om i u podskupinama bolesti, te povećan rizik za nastanak CSVT-a u djece vezan uz polimorfizam *ITGB3* HPA-1 a/b, u usporedbi s rezultatima dostupnim u literaturi u djece i u odrasloj populaciji, pokazuju da pojedine genske varijacije istoga proteina, u ovom slučaju GPIIb/IIIa, mogu imati različitu ulogu u etiologiji IMU-a ovisno o dobi pojave bolesti. Stoga su potrebna daljnja sveobuhvatna

klinička, genetička, ali i bazična ispitivanja koja bi objasnila konkretan mehanizam protrombotičkoga učinka ovih genskih varijacija na funkcionalni ishod glikoproteinskih receptora i koji predstavlja rizik za nastanak pojedinog tipa IMU-a u djece.

Uobičajeni rizični čimbenici povezani s nastankom IMU-a u odraslih oskudno su ispitani u djece s IMU-om. Kako je u djece kao i u odraslih moguća povezanost hipertenzije, vaskulopatije i poremećaja metabolizma lipida s nastankom bolesti (32, 206), ispitivanje uloge odabranih intermedijarnih čimbenika u dječjoj populaciji s IMU-om moglo bi doprinijeti boljem razumijevanju etiologije bolesti. Polimorfizam ACE I/D utječe na aktivnost ACE ovisno o genotipu (207) i tako utječe regulaciju krvnoga tlaka, a time i ima važnu ulogu u patofiziologiji kardiovaskularnih bolesti (207). Objavljene meta-analize dokazale su povezanost alela D s brojnim stanjima, uključujući IMU u azijskoj populaciji (210) i u bijelaca (211). U ovom istraživanju dokazan je dva puta veći rizik za nastanak IMU-a i AIMU-a te 2,51 puta veći rizik za nastanak DAIMU-a u nositelja genotipa *ACE* ID ili DD, što je dodatno provjereno multivarijatnom analizom gdje je dobiven 1,81 puta veći rizik za nastanak bolesti u slučaju IMU-a u djece, dok povezanost *ACE* I/D s AIMU-om i DAIMU-om ipak nije potvrđena. Povezanost *ACE* I/D s pojavom IMU-a u djece istražena je samo u jednom istraživanju populacije Hrvatske, gdje je unatoč većoj učestalosti alela D u djece s AIMU-om, dobivena tek rubna, ali ne i statistički značajna povezanost *ACE* I/D s pojavom bolesti, dok nije bilo uočenog utjecaja u slučaju PAIMU-a i DAIMU-a (32). Stoga rezultati ovoga istraživanja potvrđuju *ACE* I/D kao rizični čimbenik za nastanak IMU-a u djece u Hrvatskoj, te dodatno za nastanak AIMU-a i DAIMU-a, te potvrđuju prethodno objavljene rezultate o rubnoj, ali ne i statistički značajnoj povezanosti s AIMU-om u manjoj skupini ispitanika. Kako ne postoje radovi koji ispituju ulogu ovoga polimorfizma s pojavom IMU-a u drugim populacijama, dobiveni rezultat za sad je geografski ograničen na populaciju Hrvatske.

Za sljedećih jedanaest ispitanih genskih varijacija ovim istraživanjem nije utvrđena značajna povezanost s pojavom IMU-a u djece i podtipova bolesti: *F5* HR2, *F2* 20210 G/A, *F13A1* Val34Leu, *SERPINE1* PAI-1 I/D, *GP1BA* (-5) T/C, *GP6* 13254 T/C, *SELP* Ser290Asn, Asn562Asp, Val599Leu i *SELP* Thr715Pro te *APOE* ε2-4. U pojedinim podskupinama IMU-a primijećena je mala razlika u raspodjeli pojedinih alela ili genotipa u odnosu na kontrolnu skupinu, ali njihova povezanost s bolesti nije potvrđena. Moguće je da je primijećena razlika rezultat slučajnosti zbog relativno niske incidencije bolesti ili je privid zbog niske učestalosti alela tj. genotipa.

Ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost *F5* HR2 s IMU u djece i podtipovima bolesti, što je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima AIMU-a u djece u Hrvatskoj (32). Iako je u literaturi opisana povezanost genske promjene *F2* 20210A s IMU-om u pacijenata mlađih od 58 godina, bez obzira na etničku pripadnost (104), ali i s nastankom IMU-a u djece (68) i CSVT-a u neonatalnom razdoblju (105), povezanost genske promjene *F2* 20210 G/A s IMU-om u djece u Hrvatskoj nije utvrđena ovim istraživanjem, što je u skladu i s prethodno objavljenim rezultatima (32, 34). Istraživanja uglavnom nisu utvrdila povezanost *F13A1* Val34Leu s AIMU-om u odraslih, osim jednog makedonskog istraživanja (128, 129), a sličan zaključak su dala istraživanja u djece (129), gdje je samo u manjem istraživanju populacije Hrvatske pokazan umjereno povećan rizik nastanka DAIMU-a u nositelja najmanje jednog alela *F13A1* Leu34 (32), što ipak nije potvrđeno ovim istraživanjem na većem broju ispitanika. Istraživanja povezanosti ovoga polimorfizma s CSVT-om u djece do danas nisu objavljena. Iako je nedavno objavljena meta-analiza utvrdila povezanost *SERPINE1* PAI-1 I/D s povećanim rizikom od IMU-a u općoj azijskoj i miješanoj populaciji (134), povezanost *SERPINE1* PAI-1 s IMU-om u djece nije utvrđena odvojenom meta-analizom (129), niti ranijim istraživanjem u populaciji Hrvatske (32), što je potvrđeno i rezultatima ovoga istraživanja. Do danas je objavljen samo prikaz dva slučaja CSVT-a u djece od kojih je u jednom utvrđen genotip *SERPINE1* PAI-1 4G/5G (135), iako ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost ovoga polimorfizma s CSVT-om u hrvatske djece. Povezanost *GP1AB* (-5) T/C s pojavom IMU-a u djece do danas nije ispitana, a dobiveni rezultati u odraslih sažeti su meta-analizom gdje je pokazano da genotip *GP1BA* (-5) CC povećava rizik nastanka IMU-a u miješanoj populaciji i u Azijata, te da nositelji genotipa TT i alela T imaju manji rizik za razvoj bolesti, što konačno nije potvrđeno nakon testiranja osjetljivosti (77). Uloga *GP6* 13254 T/C kao rizičnog čimbenika za nastanak IMU-a do danas je ispitana samo u jednom radu ograničenom na pacijente s IMU-om kao posljedicom sindroma ljepljivih trombocita, što također može biti rizični čimbenik za razvoj IMU-a u djece, ali povezanost s pojavom bolesti nije utvrđena, iako nije provedena odvojena analiza ispitanika dječje dobi (186). Rezultati ovoga istraživanja po pitanju ova dva polimorfizma glikoproteinskih receptora slažu se s opisanim prethodno objavljenim rezultatima. Ovo istraživanje stoga ima poseban znanstveni doprinos budući da do danas ne postoje izvješća o ulozi polimorfizama *SELP* u IMU-u u djece, iako rezultatima nije dokazana povezanost s pojavom bolesti. Istraživanja u odraslih su malobrojna i uglavnom se slažu s dobivenim rezultatima (191, 200–205), iako je samo u jednom radu pronađena povezanost *SELP* Val599Leu s većim rizikom nastanka IMU-a (202). *APOE* je dobro opisan rizični čimbenik za nastanak IMU-a u odraslih

gdje je meta analizama dokazan značajno veći rizik za IMU za nositelje *APOE* ε4 u općoj, azijskoj i bijeloj populaciji, dok je za nositelje *APOE* ε3 utvrđena zaštitna uloga od nastanka IMU-a u općoj i azijskoj populaciji, ali ne i u bijelaca (211, 216, 217). Međutim, potencijalna povezanost s IMU-om u djece istražena je u samo tri rada: u prethodnom hrvatskom i poljskom istraživanju nije utvrđena povezanost kao kod odraslih (32, 218), što je rezultat dobiven i ovim istraživanjem, dok je američko istraživanje utvrdilo povezanost *APOE* ε4 s nastankom PAIMU-a (219).

Poznato je dodatno povećanje rizika za nastanak trombotičkih događaja u prisutnosti više od jednoga protrombotičkog rizičnog čimbenika (47), ali udruženi utjecaj protrombotičkih polimorfizama unutar istog gena ili unutar više gena smještenih na istom kromosomu na nastanak IMU-a u djece do sada nije istražen. Stoga je ovim istraživanjem obuhvaćeno istodobno ispitivanje većega broja potencijalnih genetičkih rizičnih čimbenika te su osim mogućega pojedinačnog utjecaja ispitane i mogućnosti utjecaja udruženih polimorfizama kroz analizu mogućih haplotipova. Ispitani su potencijalni haplotipovi smješteni na 1., 5., 17. i 19. kromosomu te su dobiveni značajni rezultati za rijetki haplotip *F5* 1601G/HR2 A/ *SELP* 290Ser/562Asp/599Leu/715Thr u skupini djece s CSVT-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeni haplotip uočen je samo u skupini djece s CSVT-om gdje povećava rizik za nastanak CSVT-a gotovo 20 puta u odnosu na referentni haplotip¸ dok njegova prisutnost nije zabilježena u skupini djece s AIMU-om. Osim toga, uočena je različita distribucija drugih haplotipova 1. kromosoma, u skupini djece s AIMU-om i DAIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez dokazane značajnosti ovih rezultata. Također je dobiven značajan rezultat za haplotip *ITGA2* 807C/873G/HPA-5b u skupini s DAIMU-om. Navedeni haplotip uočen je s manjom učestalošću u skupini s DAIMU-om gdje razmjerno smanjuje rizik za nastanak bolesti u odnosu na referentni haplotip. Osim toga, uočena je nešto manja učestalost haplotipa C/G/b u skupini djece s IMU-om i u skupini djece s KIMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, a rijetki haplotipovi *ITGA2* uočeni su samo u nekoliko slučajeva IMU-a u djece, ali ne i u skupini djece s KIMU-om ili PAIMU-om niti u kontrolnoj skupini, ali rezultati nisu bili značajni. Rezultate dobivene ovim istraživanjem koji se odnose na rijetke haplotipove treba oprezno tumačiti zbog mogućega utjecaja na pouzdanost dobivenih rezultata statističkih testova.

Uvidom u literaturne baze podataka, do sada nisu napravljene analize haplotipova u opsegu u kojem je to napravljeno u predloženom istraživanju. Rezultati nisu usporedivi s objavljenim rezultatima istraživanja haplotipova u IMU-u u odraslih jer su uključivala analize različitih haplotipova sačinjenih od polimorfizama *ITGB3* HPA-1, *GP1BA* HPA-2, *ITGA2B*

HPA-3 i *ITGA2* HPA-5 ili različitih polimorfizama u *SELP*, ali i zbog razlika u ispitivanim populacijama (204, 254, 255). S obzirom na opsežnost uključenih genetičkih varijacija u analizu haplotipova i opsežnost napravljene statističke analize uz ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama prije njihovoga uključivanja u analizu haplotipova, rezultati ovoga istraživanja imaju posebnu vrijednost.

Nakon uvođenja Benjamini-Hochbergove korekcije, prethodno dobiveni statistički značajni rezultati uglavnom nisu ostali značajni. Međutim, nakon korekcije samo su pojedini rezultati multivarijatnih modela logističke regresije zadržali značajnost zbog čega ih je potrebno posebno promotriti. Multivarijatnim modelom logističke regresije potvrđen je umjereni smanjeni rizik za nastanak PAIMU-a u djece nositelja genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab, ali je dodatno utvrđen i šest puta veći rizik za nastanak PAIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA. S obzirom na snagu ispitivanja i dobiveni rezultat, kombinacija ovih genotipova ima potencijal u procjeni moguće trombotičke etiologije nastanka PAIMU-a. Multivarijatnom analizom u skupini djece s AIMU-om primjećen je potencijal *F5* 1601 G/A u povećanju rizika nastanka bolesti i *ITGA2B* HPA-3 a/b u smanjenju rizika nastanka bolesti, međutim, dobiveni rezultati nisu dokazani kao statistički značajni jer su nakon korekcije P vrijednosti za oba ispitivana polimorfizma iznosile 0,058. Multivarijatnom analizom također je potvrđena povezanost *F5* 1601 GA s nastankom KIMU-a u djece te je utvrđen 5,3 puta veći rizik za nastanak bolesti za nositelje genotipa *F5* 1601 GA u odnosu na nositelje divljega tipa, što ukazuje na potencijalnu ulogu genski uvjetovane trombofilije u etiologiji KIMU-a. Multivarijatnom analizom utvrđena je i povezanost *ITGA2* 807 C/T, 873 G/A i *GP1BA* HPA-2 prema recesivnom modelu te genotipa *GP1BA* VNTR BB s pojavom SIMU-a u djece što ukazuje na potencijalnu ulogu trombocitnih glikoproteinskih receptora u etiologiji SIMU-a. Međutim, u ovom su slučaju genske varijante uključene u multivarijatnu analizu relativno rijetke (genotipovi *GP1BA* HPA-2 bb, *ITGA2* 807 TT i 873 AA) što značajno utječe na pouzdanost rezultata statističke analize pa rezultati daju zbunjujuće rezultate. Primjerice, u djece sa SIMU-om univarijatnom analizom dobiven je povećan rizik za nositelje genotipa *GP1BA* HPA-2 bb, dok je u multivarijatnoj logističkoj regresiji dobiven smanjen rizik za isti genotip; drugi slučaj je gdje prisutnost genotipa *ITGA1* 873 AA u univarijatnoj logističkoj regresiji ukazuje na potencijalnu zaštitnu ulogu, ali ipak bez statističke značajnosti, dok je multivarijatnom analizom dobiveno povećanje rizika za nastanak SIMU-a u djece za isti genotip. Stoga bi trebalo potvrditi rezultate opsežnijim ispitivanjem prije razmatranja uključivanja ovih polimorfizama u daljnje smjernice.

Rezultati statističke obrade podataka prikupljenih ovim istraživanjem potvrdili su hipotezu da su različiti podtipovi IMU-a u djece okarakterizirani različitim genetičkim rizičnim čimbenicima. Na temelju dobivenih statički značajnih rezultata ovoga istraživanja predložen je algoritam genetičkih rizičnih čimbenika za razlikovanje IMU-a u djece i podtipova bolesti u populaciji Hrvatske koji obuhvaća sve analizirane alele, genotipove i haplotipove (Tablica 42.). Prema predloženom algoritmu, na dva puta povećan rizik od nastanka IMU-a upućuje samo prisutnost genotipa *ACE* ID ili DD, ali je prisutan i dodatan gotovo tri puta veći rizik za nastanak IMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA. Na dva do tri puta veći rizik nastanka AIMU-a u djece ukazat će prisutnost genotipova *F5* 1601 GA, *ACE* ID ili DD, ali će genotip *F5* 1601 GA, tj. alel A upućivati na šest, tj. četiri puta veći rizik nastanka PAIMU-a, dok će genotip *ACE* ID ili DD upućivati na 2,5 puta veći rizik nastanka DAIMU-a. Osim toga, prisutnost alela *GP1BA* VNTR B povećava rizik za nastanak DAIMU-a oko dva puta. S druge strane, prisutnost genotipa *ITGA2B* HPA-3 ab ili bb ima umjereni zaštitni učinak na nastanak AIMU-a, iako je za PAIMU zaštitni učinak predložen prisutnošću heterozigota ab, a za DAIMU prisutnošću samog alela b. Dodatno su za DAIMU kao umjereni zaštitni genetički rizični čimbenici predloženi i alel *ITGA2* HPA-5 b, odnosno genotip ab ili bb, te haplotip *ITGA2* 807C/873G/HPA-5b. Nadalje, na oko 2,5 puta povećani rizik nastanka CSVT-a u djece prije svega će ukazati genotip *ITGB3* HPA-1 ab, dok prisutnost rijetkog haplotipa *F5* 1601 G/HR2 A/ *SELP* 290Ser/562Asp/599Leu/715Thr povećava rizik 20 puta. Međutim, predloženi algoritam za CSVT treba tumačiti s oprezom zbog razmjerno niske incidencije bolesti i prisutnosti rijetkoga haplotipa. Algoritmom su dobiveni i potencijalni rizični čimbenici koji razlikuju KIMU i SIMU. Prisutnost alela *F5* 1601 A, odnosno genotipa *F5* 1601 GA povećava rizik nastanka kortikalno lokaliziranoga IMU-a pet, odnosno četiri puta, dok prisutnost genotipa *GP1BA* HPA-2 bb ili VNTR BB može upućivati na čak 13 puta veći rizik nastanka subkortikalno lokaliziranoga IMU-a u djece. Osim toga, prisutnost genotipa *FGB* -455 AA koji uopće nije nađen u djece sa SIMU-om može imati zaštitni učinak na pojavu subkortikalno lokaliziranoga IMU-a. Međutim, i ove rezultate treba tumačiti s oprezom zbog prisutnosti rijetkih genotipova i samo djelomično prikupljenih podataka za lokalizaciju zbog čega u analize nisu uključena sva ispitivana djeca s IMU-om.

Tablica 42. Predloženi algoritam ispitanih genetičkih rizičnih čimbenika za razlikovanje IMU-a u djece i podtipova bolesti u Hrvatske. Crvenom bojom označeni su rizični čimbenici koji povećavaju rizik nastanka bolesti, a zelenom bojom čimbenici koji umanjuju rizik.

Genska varijacija	**IMU**	**AIMU**	**PAIMU**	**DAIMU**	**CSVT**	**KIMU**	**SIMU**
F5 **1601 G/A**	**GA**	**A alel GA**	**A alel GA**	/	/	**A alel GA**	/
FGB **-455 G/A**	/	/	/	/	/	/	**AA***
ITGB3 **HPA-1 a/b**	/	/	/	/	**ab**	/	/
GP1BA **HPA-2 a/b**	/	/	/	/	/	/	**bb***
ITGA2B **HPA-3 a/b**	/	**ab + bb**	**ab**	**b alel**	/	/	/
ITGA2 **HPA-5 a/b**	/	/	/	**b alel ab + bb**	/	/	/
GP1BA **VNTR**	/	/	/	**B alel BB + BC + BD**	/	/	**BB***
ACE **I/D**	**ID + DD**	**ID + DD**	/	**ID + DD**	/	/	/
haplotip *F5/SELP*	/	/	/	/	**G/A/Ser/Asp/ Leu/Thr***	/	/
haplotip *ITGA2* 807 C/T / 873 G/A /HPA-5 a/b	/	/	/	**C/G/b**	/	/	/

IMU – ishemijski moždani udar, AIMU – arterijski ishemijski moždani udar, PAIMU – perinatalni arterijski ishemijski moždani udar, DAIMU – arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, CSVT – tromboza venskih sinusa mozga, KIMU – kortikalni ishemijski moždani udar, SIMU – subkortikalni arterijski moždani udar, / – nije primjenjivo, * – rezultat je potrebno tumačiti s posebnim oprezom jer je genska varijanta rijetka.

Glavna ograničenja ovoga istraživanja jesu relativno mali broj genskih varijacija u odnosu na uobičajene genomske asocijacijske studije, višestruka rascjepkanost ispitivane skupine (podjela prema tipu, dobi i lokalizaciji IMU-a) i niska incidencija IMU-a u djece uopće. Svaki od ovih čimbenika utječe na pouzdanost rezultata dobivenih statističkom obradom prikupljenih podataka i snagu dokaza pa dobivene rezultate treba oprezno tumačiti. Ispitane genske varijacije zasigurno imaju vrijedan doprinos u razumijevanju genetičkih rizičnih čimbenika za nastanak IMU-a u djece, ali predstavljaju tek mali dio slagalice u odnosu na mogućnosti koje današnja laboratorijska dijagnostika nudi primjenom naprednih metoda molekularne biologije. Tehnika sekvenciranja sljedeće generacije omogućavaju sekvenciranje cijeloga genoma i dobivanje neusporedive količine podataka na razini cijeloga genoma, a ne samo odabranih varijacija ili gena, te postaju sve jeftinije i dostupnije (256). Studije povezanosti cijeloga genoma mogu otkriti nove gene ili kombinacije gena čak i kada

njihova funkcija nije bila prethodno poznata, ali obično zahtijevaju opsežna financijska sredstva i imaju ograničenu snagu zbog velikog broja neovisnih testiranja pa zahtijevaju pažljivo provođenje statističkih testova uz uvođenje prikladnih korekcija. U ovom istraživanju korišten je pristup odabira gena kandidata, a ne cijelogenomski pristup zbog pristupačnosti i značajno niže cijene, ali i svojevrsne statističke snage, jer se radi o rijetkoj bolesti i jer su ciljano odabrane genske varijacije koje prema ranije poznatim istraživanjima mogu imati ulogu u trombofiliji, a prema hipotezi i IMU-u u djece, što je važno za male studije. Ovisno o financijskim mogućnostima, buduće bi studije, kako bi bile optimalno dizajnirane, trebale uključiti primjenu sekvenciranja cijeloga genoma ili cijelih gena u ispitivanju potencijalnih genskih čimbenika IMU-a u djece, a time bi se svakako mogao ispitati i utjecaj genskih varijacija spolnih kromosoma koje nisu obuhvaćene ovim istraživanjem. Interpretacija rezultata ovoga istraživanja je ograničena, prije svega, zbog manjkavosti dostupnih literaturnih podataka. Kako ne postoje konkretne smjernice za dizajn studija koje uključuju djecu s IMU-om, a definicije pojedinih podtipova IMU-a u djece postupno su se oblikovale, velik problem mnogih dostupnih studija predstavljaju upravo različito definirane dobne skupine. Novije studije koriste jednake podjele kao i IPSS pa je isti pristup primijenjen i u ovom radu (6, 16). Nadalje, niti u jednoj objavljenoj genskoj asocijacijskoj studiji IMU-a u djece nije raspravljen problem višestrukoga testiranja koji zasigurno utječe na pouzdanost dobivenih rezultata, niti je navedeno korištenje korekcije. Iz toga razloga prikazani su dobiveni rezultati statističke obrade prije i nakon korekcije te su radi lakše usporedbe s dostupnim podacima u literaturi raspravljani nekorigirani rezultati, uz poseban osvrt na korigirane rezultate. Osim toga, dodatan izazov predstavlja i primjena različitoga nazivlja za istu gensku varijaciju tijekom vremena u dostupnoj literaturi. Naime, za istu varijaciju zabilježeno je nazivlje prema zamjeni nukleotida i AK-a, gdje tijekom vremena može doći do promjene rednoga broja nukleotida tj. AK-a. Za dobro utvrđene genske varijacije često su korišteni arbitrarni nazivi, dok novije otkrivene genske varijacije obično nemaju arbitrarni naziv već se u literaturi mogu naći samo prema referentnom broju iz baze podataka polimorfizma jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*, dbSNP) (94), ali je nedostatak ove baze što ne uključuje druge vrste polimorfizama. Ipak, danas je preporučeno korištenje sveobuhvatnog nazivlja Udruženja za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), odnosno nazivlja HGVS (92). Zbog heterogenosti nazivlja različitih genskih varijanti, pretraživanje literature je posebno zahtjevno te je najbolji pristup postupno i sveobuhvatno pretraživanje svih dostupnih literaturnih baza podataka prema svim poznatim nazivima za pojedinu gensku varijaciju.

Unatoč izazovima, predstavljeno istraživanje ima i brojne prednosti. Prije svega, uzajamnom dobrom suradnjom s neuropedijatrima iz dva najveća centra za zbrinjavanje djece s IMU-om u Hrvatskoj i iscrpnim pretraživanjem dostupnih bolničkih informacijskih sustava omogućeno je uključivanje u istraživanje većine slučajeva IMU-a u djece koji su se dogodili u periodu od 1999. do kolovoza 2020. godine. Kao rezultat istraživanja uspostavljena je opsežna baza podataka djece s IMU-om s osnovnim epidemiološkim i kliničkim podacima o spolu, dobi dijagnoze, dobi ispitivanja i lokalizaciji moždanoga udara te ispitanim genskim varijacijama. Nadalje, po prvi puta su istraživanjem obuhvaćena djeca s oba tipa IMU-a (AIMU i CSVT) u Hrvatskoj, uz do sada najopsežniji izbor genskih varijacija u genima za čimbenike zgrušavanja, GP-e trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike. Ovim istraživanjem prikupljene su nove informacije o pojedinačnoj i eventualnoj zajedničkoj ulozi ispitivanih genskih čimbenika u etiologiji IMU-a u djece s obzirom na dob pojave bolesti i tip IMU-a. Također, u predloženom istraživanju je napravljena početna analiza povezanosti odabranih genskih varijacija prema lokalizaciji bolesti što do sada u literaturi nije nikada objavljeno i predstavlja jedinstven znanstveni doprinos. Konačno, napravljena je opsežna statistička obrada prikupljenih podataka koja je uključila ispitivanje povezanosti pojedinačnih genskih polimorfizama, njihovih kombinacija i haplotipova s pojavom IMU-a u djece. Pritom je prikazan rezultat statističke obrade bez i s prikladnom korekcijom za višestruko testiranje nezavisnih mjerenja što predstavlja ispravan pristup prilikom interpretacije dobivenih rezultata preuzet iz genomskih asocijacijskih studija (246).

Rezultati ovoga istraživanja potvrdili su različite genetičke čimbenike za karakterizaciju različitih podtipova IMU-a u djece. Na temelju dobivenih rezultata predložen je i algoritam ispitanih genetičkih rizičnih čimbenika za IMU u djece za razlikovanje rizika nastanka podtipova bolesti koji, zajedno s uspostavljenom bazom podataka djece s IMU-om u Hrvatskoj, može predstavljati temelj za usmjeravanje daljnjih istraživanja ove bolesti. Eventualnim uključenjem u međunarodne baze podataka o IMU-u u djece dobit će se jasniji uvid u posebnosti etiologije IMU-a u djece u Hrvatskoj te će pridonijeti razumijevanju etiologije ove bolesti. Temeljem navedenoga i uzimajući u obzir mogućnost prijenosa spoznaja o IMU-u u djece na pojavu IMU-a u odraslih, rezultati ovoga istraživanja predstavljaju značajan znanstveni doprinos u istraživanju potencijalne uloge genskih varijacija u etiologiji IMU-a u djece u Hrvatskoj, ali i u općoj populaciji.

6. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem ispitana je hipoteza da su polimorfizmi u genima za čimbenike zgrušavanja, GP-e trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike povezani s pojavom IMU-a u djece u Hrvatskoj ovisno o dobi, tipu IMU-a i lokalizaciji IMU-a. Ispitanici su obuhvatili 185 djece do 18 godina starosti s dijagnozom AIMU ili CSVT i istog broja zdrave djece podudarne po dobi i spolu. U sve djece genotipiziran je 21 polimorfizam u 13 gena kandidata postojećim ili novim uvedenim molekularno-genetičkim metodama. Ispitan je potencijal pojedinačnih polimorfizama i odabranih udruženih polimorfizama (analiza haplotipova) kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak bolesti. Prikupljene su nove informacije o pojedinačnoj i eventualnoj zajedničkoj ulozi ispitivanih genskih čimbenika u etiologiji IMU-a u djece s obzirom na dob pojave, tip i lokalizaciju bolesti.

1. Ovim je istraživanjem utvrđena podjednaka zastupljenost PAIMU i DAIMU te pet puta veća učestalost AIMU-a u odnosu na CSVT u djece u Hrvatskoj.

2. Utvrđena je veća pojavnost bolesti u dječaka u ukupnoj skupini djece s IMU-om i u svim ispitivanim podskupinama IMU-a prema tipu, dobi i lokalizaciji IMU-a, osim u skupini djece s PAIMU-om i CSVT-om gdje nije uočena statistički značajna razlika u zastupljenosti spolova. Najveći omjer dječaka u odnosu na djevojčice uočen je u djece sa SIMU-om.

3. Rezultati statističke obrade prikupljenih podataka genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s IMU-om pokazali su:
    a. dva puta veći rizik od nastanka IMU-a u djece nositelja genotipa *ACE* ID ili DD prema dominantnom modelu u odnosu na nositelje genotipa II,
    b. moguć dodatan gotovo tri puta veći rizik za nastanak IMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA dobiven multivarijatnim modelom.

4. Rezultati statističke obrade prikupljenih podataka genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s IMU-om prema tipu IMU-a pokazali su:
    a. tri puta veći rizik nastanka AIMU-a u djece nositelja alela *F5* 1601A i dva puta veći rizik u djece nositelja genotipova *ACE* ID ili DD prema dominantnom modelu u odnosu na nositelje genotipa II,

b. umjereno smanjen rizik za nastanak bolesti u nositelji genotipa HPA-3 ab i bb prema dominantnom modelu u odnosu na nositelje genotipa aa,
c. mogući dodatni četiri puta veći rizik za nastanak AIMU-a u djece nositelja genotipa *F5* 1601 GA dobiven multivarijatnim modelom,
d. 2,5 puta veći rizik za nastanak CSVT-a u djece nositelja genotipa HPA-1 bb prema prekodominantnom modelu u odnosu na nositelje homozigotnih genotipa aa ili bb, dok je dobivena statistička značajnost za dominantni model i alel bila blizu statističke značajnosti.

5. Rezultati statističke obrade prikupljenih podataka genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s IMU-om prema dobi pojave IMU-a pokazali su:
   a. četiri puta veći rizik za nastanak PAIMU-a u nositelja alela *F5* 1601A,
   b. umjereno smanjen rizik za nastanak PAIMU-a prema prekodominantnom modelu u nositelja genotipa HPA-3 ab u odnosu na nositelje homozigotnih genotipova,
   c. mogući dodatni šest puta veći rizik za nastanak PAIMU-a u nositelja genotipa *F5* 1601 GA dobiven multivarijatnim modelom,
   d. 2,5 puta veći rizik nastanka DAIMU-a u nositelja genotipova *ACE* ID ili DD prema dominantnom modelu u odnosu na nositelje genotipa II, te 1,87 puta veći rizik za nastanak DAIMU-a u nositelja alela *GP1BA* VNTR B,
   e. umjereno smanjen rizik za nastanak DAIMU-a u nositelja alela HPA-3b ili HPA-5b u odnosu na nositelje referentnih alela,
   f. mogući dodatni 2,43 puta veći rizik za nastanak DAIMU-a u nositelja genotipa *GP1BA* VNTR koji sadrže barem jedan alel B te umjereni zaštitni učinak genotipova HPA-5 ab i bb dobiven multivarijatnim modelom.

6. Rezultati statističke obrade prikupljenih podataka genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s IMU-om prema lokalizaciji IMU-a pokazali su:
   a. četiri, odnosno pet puta veći rizik za nastanak KIMU-a u djece nositelja *F5* 1601 GA, odnosno alela *F5* 1601A u odnosu na nositelje genotipa GG, odnosno alela G, što je dodatno potvrđeno multivarijatnim modelom,
   b. 13 puta veći rizik za nastanak SIMU-a u djece nositelja genotipa HPA-2 bb prema recesivnom modelu u odnosu na genotipove aa ili bb, ili genotipa *GP1BA* VNTR BB prema kodominantnom modelu u odnosu na referentni genotip CC,

c. smanjeni rizik za nastanak SIMU-a u djece nositelja genotipa *FGB* -455 AA prema recesivnom modelu u odnosu na genotip GG i GA, uz vrlo široke intervale pouzdanosti jer je genotip *FGB* -455 AA zabilježen samo u kontrolnoj skupini, ali ne i u djece sa SIMU-om,
d. nepouzdanost rezultata multivarijatnog modela budući da su dobiveni proturječni rezultati jer je utvrđen mogući dodatni zaštitni učinak genotipa *ITGA2* 807 TT, ali sada neočekivano i genotipa HPA-2 bb prema recesivnom modelu u odnosu na genotipove CC i CT, odnosno aa i ab, dok je za genotip 873 AA prema recesivnom modelu u odnosu na genotipove GG i GA utvrđen prilično povećan rizik nastanka SIMU-a u djece, uz napomenu da su u ovom slučaju pojedine genske varijante uključene u multivarijatnu analizu relativno rijetke (genotipovi *GP1BA* HPA-2 bb, *ITGA2* 807 TT i 873 AA) što može značajno utjecati na pouzdanost rezultata statističke analize.

7. U ispitivanoj skupini utvrđena je postojanje tri grupe haplotipa smještenih na 1., 5. i 17. kromosomu. Rezultati statističke analize haplotipova u djece s IMU-om pokazali su:
    a. 20 puta veći rizik za nastanak CSVT-a u djece nositelja rijetkog haplotipa *F5* 1601G/HR2A/ *SELP* 290Ser/562Asp/599Leu/715Thr, dok njegova prisutnost nije zabilježena u skupini djece s AIMU-om, uz oprezno tumačenje rezultata zbog maloga broja uključenih ispitanika i niske učestalosti navedenoga haplotipa,
    b. umjereni zaštitni učinak haplotipa *ITGA2* 807C/873G/HPA-5b na pojavu DAIMU-a,
    c. prisutnost rijetkih haplotipova *ITGA2* C/A/a, T/G/a i T/A/b samo u nekoliko slučajeva DAIMU-a i CSVT-a u djece, ali ne i u skupini djece s KIMU-om ili PAIMU-om niti u kontrolnoj skupini.

8. Ovim istraživanjem dokazana je hipoteza da su podtipovi IMU-a u djece u Hrvatskoj okarakterizirani različitim genetičkim rizičnim čimbenicima. Na temelju prikupljenih podataka uspostavljena je baza podataka o djeci s IMU-om u Hrvatskoj te je predložen algoritam ispitanih genetičkih rizičnih čimbenika za IMU u djece za razlikovanje rizika nastanka različitih podtipova bolesti ovisno o tipu, dobi pojave i lokalizaciji IMU-a.

7. LITERATURA

1. Zadro R, Coen Herak D. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke. Biochem Med 2012;77:298–310.
2. Gabis L, Yangala R, Lenn NJ. Time lag to diagnosis of stroke in children. Pediatrics 2002;110:924–8.
3. Rafay MF, Pontigon AM, Chiang J, Adams M, Jarvis DA, Silver F i ostali. Delay to diagnosis in acute pediatric arterial ischemic stroke. Stroke 2009;40:58–64.
4. Mallick AA, Ganesan V, Kirkham FJ, Fallon P, Hedderly T, McShane T i ostali. Diagnostic delays in paediatric stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015;86:917–21.
5. Kirton A, DeVeber G. Paediatric stroke: pressing issues and promising directions. Lancet Neurol 2015;14:92–102.
6. Ferriero DM, Fullerton HJ, Bernard TJ, Billinghurst L, Daniels SR, Debaun MR i ostali. Management of Stroke in Neonates and Children: A Scientific Statement From the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke 2019;50:E51–96.
7. deVeber G, Kirkham F, Shannon K, Brandão L, Sträter R, Kenet G i ostali. Recurrent stroke: the role of thrombophilia in a large international pediatric stroke population. Haematologica 2019;104:1676–81.
8. Steinlin M, Mackay MT. Emergency management of ischemic stroke in children. Curr Treat Options Neurol 2015;17:349.
9. WHO MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. J Clin Epidemiol 1988;41:105–14.
10. Roach ES, Golomb MR, Adams R, Biller J, Daniels S, deVeber G i ostali. Management of stroke in infants and children: A scientific statement from a special writing group of the american heart association stroke council and the council on cardiovascular disease in the young. Stroke 2008;39:2644–91.
11. Donahue MJ, Dlamini N, Bhatia A, Jordan LC. Neuroimaging advances in pediatric stroke. Stroke 2019;50:240-8.

12. Dlamini N, Kirkham FJ. Stroke and cerebrovascular disorders. Curr Opin Pediatr 2009;21:751–61.
13. Krishnamurthi R, deVeber G, Feigin VL, Barker-Collo S, Fullerton H, Mackay MT i ostali. Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in children and youth aged 0-19 years: data from the global and regional burden of stroke 2013. Neuroepidemiology 2015;45:177–89.
14. Sébire G, Fullerton H, Riou E, DeVeber G. Toward the definition of cerebral arteriopathies of childhood. Curr Opin Pediatr 2004;16:617–22.
15. Amlie-Lefond C, Sébire G, Fullerton HJ. Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. Lancet Neurol 2008;7:425-35.
16. Lynch JK. Cerebrovascular disorders in children. Curr Neurol Neurosci Rep 2004;4:129–38.
17. Raju TNK, Nelson KB, Ferriero D, Lynch JK. Ischemic perinatal stroke: summary of a workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Pediatrics 2007;120:609–16.
18. Kirton A, Metzler MJ, Craig BT, Hilderley A, Dunbar M, Giuffre A i ostali. Perinatal stroke: mapping and modulating developmental plasticity. Nat Rev Neurol 2021;17:415-32.
19. Mallick AA, Ganesan V, Kirkham FJ, Fallon P, Hedderly T, McShane T i ostali. Childhood arterial ischaemic stroke incidence, presenting features, and risk factors: a prospective population-based study. Lancet Neurol 2014;13:35–43.
20. Mallick AA, O'Callaghan FJK. The epidemiology of childhood stroke. Eur J Paediatr Neurol 2010;14:197-205.
21. Dunbar M, Mineyko A, Hill M, Hodge J, Floer A, Kirton A. Population Based Birth Prevalence of Disease-Specific Perinatal Stroke. Pediatrics 2020;146:e2020013201.
22. Oleske DM, Cheng X, Jeong A, Arndt TJ. Pediatric Acute Ischemic Stroke by Age-Group: A Systematic Review and Meta-Analysis of Published Studies and Hospitalization Records. Neuroepidemiology 2021;55:331-41.
23. Agrawal N, Johnston SC, Wu YW, Sidney S, Fullerton HJ. Imaging Data Reveal a Higher Pediatric Stroke Incidence than Prior U.S. Estimates. Stroke 2009;40:3415-21.

24. deVeber GA, Kirton A, Booth FA, Yager JY, Wirrell EC, Wood E i ostali. Epidemiology and Outcomes of Arterial Ischemic Stroke in Children: The Canadian Pediatric Ischemic Stroke Registry. Pediatr Neurol 2017;69:58–70.
25. DeVeber G, Andrew M, Adams C, Bjornson B, Booth F, Buckley DJ i ostali. Cerebral sinovenous thrombosis in children. N Engl J Med 2001;345:417–23.
26. Capecchi M, Abbattista M, Martinelli I. Cerebral venous sinus thrombosis. J Thromb Haemost 2018;16:1918–31.
27. Suppiej A, Gentilomo C, Saracco P, Sartori S, Agostini M, Bagna R i ostali. Paediatric arterial ischaemic stroke and cerebral sinovenous thrombosis. First report from the Italian Registry of Pediatric Thrombosis (R. I. T. I., Registro Italiano Trombosi Infantili). Thromb Haemost 2015;113:1270–7.
28. Krleza JL, Duranovic V, Lujic L, Herak DC, Mejaski-Bosnjak V, Nakic M i ostali. The burden of paediatric stroke and cerebrovascular disorders in Croatia. Int J Stroke 2009;4:390–4.
29. Ichord R. Cerebral Sinovenous Thrombosis. Front Pediatr 2017;5:163.
30. Steinlin M, Pfister I, Pavlovic J, Everts R, Boltshauser E, Mori AC i ostali. The first three years of the Swiss Neuropaediatric Stroke Registry (SNPSR): A population-based study of incidence, symptoms and risk factors. Neuropediatrics 2005;36:90–7.
31. Barnes C, Newall F, Furmedge J, Mackay M, Monagle P. Arterial ischaemic stroke in children. J Paediatr Child Health 2004;40:384–7.
32. Coen Herak D, Lenicek Krleza J, Radic Antolic M, Horvat I, Djuranovic V, Zrinski Topic R i ostali. Association of polymorphisms in coagulation factor genes and enzymes of homocysteine metabolism with arterial ischemic stroke in children. Clin Appl Thromb Hemost 2017;23:1042–51.
33. Golomb MR, Fullerton HJ, Nowak-Gottl U, Deveber G. Male predominance in childhood ischemic stroke: Findings from the international pediatric stroke study. Stroke 2009;40:52–7.
34. Herak DC, Antolic MR, Krleza JL, Pavic M, Dodig S, Duranovic V i ostali. Inherited prothrombotic risk factors in children with stroke, transient ischemic attack, or migraine. Pediatrics 2009;123:e653–60.
35. Fullerton HJ, Wu YW, Zhao S, Johnston SC. Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities. Neurology 2003;61:189–94.

36. Steinlin M. Cerebrovascular disorders in childhood. Handb Clin Neurol 2013;112:1053–64.
37. Westmacott R, Askalan R, Macgregor D, Anderson P, Deveber G. Cognitive outcome following unilateral arterial ischaemic stroke in childhood: effects of age at stroke and lesion location. Dev Med Child Neurol 2010;52:386–93.
38. Anderson V, Spencer-Smith M, Wood A. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. Brain 2011;134:2197–221.
39. Abgottspon S, Thaqi Q, Steiner L, Slavova N, Grunt S, Steinlin M i ostali. Effect of Age at Pediatric Stroke on Long-term Cognitive Outcome. Neurology 2022;98:e721–9.
40. Buerki S, Roellin K, Remonda L, Mercati DG, Jeannet PY, Keller E i ostali. Neuroimaging in childhood arterial ischaemic stroke: evaluation of imaging modalities and aetiologies. Dev Med Child Neurol 2010;52:1033–7.
41. Steinlin M, Pfister I, Pavlovic J, Everts R, Boltshauser E, Mori AC i ostali. The first three years of the Swiss Neuropaediatric Stroke Registry (SNPSR): a population-based study of incidence, symptoms and risk factors. Neuropediatrics 2005;36:90–7.
42. Hajek CA, Yeates KO, Anderson V, Mackay M, Greenham M, Gomes A i ostali. Cognitive outcomes following arterial ischemic stroke in infants and children. J Child Neurol 2014;29:887–94.
43. Ganesan V, Ng V, Chong WK, Kirkham FJ, Connelly A. Lesion volume, lesion location, and outcome after middle cerebral artery territory stroke. Arch Dis Child 1999;81:295–300.
44. Dinomais M, Hertz-Pannier L, Groeschel S, Chabrier S, Delion M, Husson B i ostali. Long term motor function after neonatal stroke: Lesion localization above all. Hum Brain Mapp 2015;36:4793.
45. Fuentes A, Deotto A, Desrocher M, DeVeber G, Westmacott R. Determinants of cognitive outcomes of perinatal and childhood stroke: A review. Child Neuropsychol 2016;22:1–38.
46. Mastrangelo M, Giordo L, Ricciardi G, de Michele M, Toni D, Leuzzi V. Acute ischemic stroke in childhood: a comprehensive review. Eur J Pediatr 2022;181:45–58.

47. Mackay MT, Wiznitzer M, Benedict SL, Lee KJ, DeVeber GA, Ganesan V. Arterial ischemic stroke risk factors: The international pediatric stroke study. Ann Neurol 2011;69:130–40.
48. Roach ES, Golomb MR, Adams R, Biller J, Daniels S, Deveber G i ostali. Management of stroke in infants and children: A scientific statement from a special writing group of the american heart association stroke council and the council on cardiovascular disease in the young. Stroke 2008;39:2644–91.
49. Felling RJ, Sun LR, Maxwell EC, Goldenberg N, Bernard T. Pediatric arterial ischemic stroke: Epidemiology, risk factors, and management. Blood Cells Mol Dis 2017;67:23–33.
50. Dunbar M, Kirton A. Perinatal Stroke. Semin Pediatr Neurol 2019;32:100767.
51. Ramenghi LA, Cardiello V, Rossi A. Neonatal cerebral sinovenous thrombosis. Handb Clin Neurol 2019;162:267–80.
52. Lynch JK, Nelson KB. Epidemiology of perinatal stroke. Curr Opin Pediatr 2001;13:499–505.
53. Dunbar M, Kirton A. Perinatal stroke: mechanisms, management, and outcomes of early cerebrovascular brain injury. Lancet Child Adolesc Health 2018;2:666–76.
54. Rodan L, McCrindle BW, Manlhiot C, MacGregor DL, Askalan R, Moharir M i ostali. Stroke recurrence in children with congenital heart disease. Ann Neurol 2012;72:103–11.
55. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. Thromb Res 2004;114:409–14.
56. Simchen MJ, Goldstein G, Lubetsky A, Strauss T, Schiff E, Kenet G. Factor v Leiden and antiphospholipid antibodies in either mothers or infants increase the risk for perinatal arterial ischemic stroke. Stroke 2009;40:65–70.
57. Curry CJ, Bhullar S, Holmes J, Delozier CD, Roeder ER, Hutchison HT. Risk factors for perinatal arterial stroke: a study of 60 mother-child pairs. Pediatr Neurol 2009;37:99–107.
58. Günther G, Junker R, Sträter R, Schobess R, Kurnik K, Kosch A i ostali. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates : role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. Stroke 2000;31:2437–41.
59. Roy B, Arbuckle S, Walker K, Morgan C, Galea C, Badawi N i ostali. The Role of the Placenta in Perinatal Stroke: A Systematic Review. J Child Neurol 2020;35:773–83.

60. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL i ostali. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993;24:35–41.
61. Adams HP, Biller J. Classification of Subtypes of Ischemic Stroke. Stroke 2015;46:e114–7.
62. Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. Ann Neurol 2005;58:688–97.
63. Wraige E, Pohl KRE, Ganesan V. A proposed classification for subtypes of arterial ischaemic stroke in children. Dev Med Child Neurol 2005;47:252–6.
64. Dlamini N, Billinghurst L, Kirkham FJ. Cerebral Venous Sinus (Sinovenous) Thrombosis in Children. Neurosurg Clin N Am 2010;21:511.
65. Hedlund GL. Cerebral sinovenous thrombosis in pediatric practice. Pediatr Radiol 2013;43:173–88.
66. Oliveira BL, Caravan P. Peptide-based fibrin-targeting probes for thrombus imaging. Dalton Transactions 2017;46:14488–508.
67. Dahlback B. Advances in Understanding Mechanisms of Thrombophilic Disorders. Hamostaseologie 2020;40:12–21.
68. Kenet G, Lütkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L i ostali. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Circulation 2010;121:1838–47.
69. Nowak-Göttl U, Sträter R, Heinecke A, Junker R, Koch H-G, Schuierer G i ostali. Lipoprotein (a) and Genetic Polymorphisms of Clotting Factor V, Prothrombin, and Methylenetetrahydrofolate Reductase Are Risk Factors of Spontaneous Ischemic Stroke in Childhood. Blood 1999;94:3678–82.
70. Ferro JM, Canhão P. Cerebral venous sinus thrombosis: update on diagnosis and management. Curr Cardiol Rep 2014;16:523.
71. Stam J. Thrombosis of the Cerebral Veins and Sinuses. N Engl J Med 2005;352:1791-8.
72. Heller C, Heinecke A, Junker R, Knöfler R, Kosch A, Kurnik K i ostali. Cerebral venous thrombosis in children: a multifactorial origin. Circulation 2003;108:1362–7.

73. Kenet G, Waldman D, Lubetsky A, Kornbrut N, Khalil A, Koren A i ostali. Paediatric cerebral sinus vein thrombosis: A multi-center, case-controlled study. Thromb Haemost 2004;92:713–8.
74. Jackson BF, Porcher FK, Zapton DT, Losek JD. Cerebral sinovenous thrombosis in children: diagnosis and treatment. Pediatr Emerg Care 2011;27:874–80.
75. Leniček Krleža J, Đuranović V, Bronić A, Coen Herak D, Mejaški-Bošnjak V, Zadro R. Multiple presence of prothrombotic risk factors in Croatian children with arterial ischemic stroke and transient ischemic attack. Croat Med J 2013;54:346–54.
76. Stankovic S, Majkic-Singh N. Genetic aspects of ischemic stroke: Coagulation, homocysteine, and lipoprotein metabolism as potential risk factors. Crit Rev Clin Lab Sci 2010;47:72–123.
77. Liu H, Wang Y, Zheng J, Li G, Chen T, Lei J i ostali. Platelet glycoprotein gene Ia C807T, HPA-3, and Ibα VNTR polymorphisms are associated with increased ischemic stroke risk: evidence from a comprehensive meta-analysis. Int J Stroke 2017;12:46–70.
78. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. Blood 2003;101:20–30.
79. Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:1393–9.
80. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. Biochemistry (Mosc) 2002;67:3–12.
81. Cramer TJ, Gale AJ. The anticoagulant function of coagulation factor V. Thromb Haemost 2012;107:15–21.
82. Nicolaes GAF, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Partial glycosylation of Asn2181 in human factor V as a cause of molecular and functional heterogeneity. Modulation of glycosylation efficiency by mutagenesis of the consensus sequence for N-linked glycosylation. Biochemistry 1999;38:13584–91.
83. Dahlbäck B. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. Semin Thromb Hemost 1999;25:273–89.
84. Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GAF. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. Thromb Haemost 2007;98:530–42.

85. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H i ostali. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994;369:64–7.
86. Zöller B, Norlund L, Leksell H, Nilsson JE, von Schenck H, Rosén U i ostali. High prevalence of the FVR506Q mutation causing APC resistance in a region of southern Sweden with a high incidence of venous thrombosis. Thromb Res 1996;83:475–7.
87. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. The Lancet 1995;346:1133–4.
88. Coen D, Zadro R, Honović L, Banfić L, Rukavina AS. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. Croat Med J 2001;42:488–92.
89. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M i ostali. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-15G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case-control study. Biochem Med 2010;20:229–35.
90. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. Thromb Haemost 2015;114:885–9.
91. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). Blood 1995;85:1504–8.
92. Sequence Variant Nomenclature. Preuzeto s: http://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA/ (pristupljeno 16. 2. 2022.).
93. ClinVar. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ (pristupljeno 16. 2. 2022.).
94. Home - SNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ (pristupljeno 16. 2. 2022.).
95. Yamazaki T, Nicolaes GAF, Sørensen KW, Dahlbäck B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. Blood 2002;100:2515–21.
96. Faioni EM, Castaman G, Asti D, Lussana F, Rodeghiero F. Association of factor V deficiency with factor V HR2. Haematologica 2004;89:195–200.
97. Bouaziz-Borgi L, Nguyen P, Hezard N, Musharrafieh U, Almawi WY, Mahjoub T. A case control study of deep venous thrombosis in relation to factor V

G1691A (Leiden) and A4070G (HR2 Haplotype) polymorphisms. Exp Mol Pathol 2007;83:480–3.

98. Otrock ZK, Taher AT, Shamseddeen WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. Ann Hematol 2008;87:1013–6.
99. Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. Haematologica 2003;88:1182–9.
100. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. Blood 1996;88:3698–703.
101. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. Semin Thromb Hemost 2006;32:3–15.
102. AL M-V. Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β-synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. Mini Rev Med Chem 2012;12:997–1006.
103. Coen D, Zadro R, Honović L, Banfić L, Stavljenić Rukavina A. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. Croat Med J 2001;42:488-92.
104. Poudel S, Zeb M, Kondapaneni V, Gutlapalli SD, Choudhari J, Sodiya OT i ostali. Association of G20210A Prothrombin Gene Mutation and Cerebral Ischemic Stroke in Young Patients. Cureus 2020;12:e11984.
105. Garrido-Barbero M, Arnaez J, Loureiro B, Arca G, Agut T, Garcia-Alix A. The Role of Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations in Neonatal Cerebral Sinovenous Thrombosis. Clin Appl Thromb Hemost 2019;25:1076029619834352.
106. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. Subcell Biochem 2017;82:405.
107. Kopyta I, Sarecka-Hujar B, Sordyl J, Sordyl R. The role of genetic risk factors in arterial ischemic stroke in pediatric and adult patients: A critical review. Mol Biol Rep 2014;41:4241–51.

108. Simurda T, Brunclikova M, Asselta R, Caccia S, Zolkova J, Kolkova Z i ostali. Genetic Variants in the FGB and FGG Genes Mapping in the Beta and Gamma Nodules of the Fibrinogen Molecule in Congenital Quantitative Fibrinogen Disorders Associated with a Thrombotic Phenotype. Int J Mol Sci 2020;21:1–19.
109. Asselta R, Duga S, Tenchini ML. The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006;4:2115–29.
110. Wolberg AS. Determinants of fibrin formation, structure, and function. Curr Opin Hematol 2012;19:349–56.
111. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37:e13.
112. Ariëns RAS. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. J Thromb Haemost 2013;11 Suppl 1:294–305.
113. de Moerloose P, Boehlen F, Neerman-Arbez M. Fibrinogen and the risk of thrombosis. Semin Thromb Hemost 2010;36:7–17.
114. Green FR. Fibrinogen polymorphisms and atherothrombotic disease. Ann N Y Acad Sci 2001;936:549–59.
115. Koch W, Hoppmann P, Biele J, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. Fibrinogen Genes and Myocardial Infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:758–63.
116. Gu L, Wu G, Su L, Yan Y, Long J, Tan J i ostali. Genetic polymorphism of β-fibrinogen gene-455G/A can contribute to the risk of ischemic stroke. Neurol Sci 2014;35:151–61.
117. van 'T Hooft FM, von Bahr SJF, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A. Two Common, Functional Polymorphisms in the Promoter Region of the β-Fibrinogen Gene Contribute to Regulation of Plasma Fibrinogen Concentration. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:3063–70.
118. Luo H, Li X, Jiang A, Zhang B, Bi P, Dong Y i ostali. Associations of β-Fibrinogen Polymorphisms with the Risk of Ischemic Stroke: A Meta-analysis. J Stroke Cerebrovasc Dis 2019;28:243–50.
119. Li D, Zhang X, Huang H, Zhang H. Association of β-fibrinogen polymorphisms and venous thromboembolism risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. Medicine 2019;98.
120. Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK i ostali. Prothrombotic polymorphisms, mutations, and their association with pediatric

non-cardioembolic stroke in Asian-Indian patients. Ann Hematol 2009;88:473–8.

121. Gupta S, Biswas A, Akhter MS, Krettler C, Reinhart C, Dodt J i ostali. Revisiting the mechanism of coagulation factor XIII activation and regulation from a structure/functional perspective. Sci Rep 2016;6:30105.
122. Dorgalaleh A, Rashidpanah J. Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency. Blood Rev 2016;30:461–75.
123. Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII: Structure and Function. Semin Thromb Hemost 2016;42:422–8.
124. Rijken DC, Uitte de Willige S. Inhibition of Fibrinolysis by Coagulation Factor XIII. Biomed Res Int 2017;2017:1–6.
125. Dull K, Fazekas F, Törőcsik D. Factor XIII-A in Diseases: Role Beyond Blood Coagulation. Int J Mol Sci 2021;22:1–14.
126. Kohler HP. Role of blood coagulation factor XIII in vascular diseases. Swiss Med Wkly 2001;131:31–4.
127. Byrnes JR, Wolberg AS. Newly-recognized roles of factor XIII in thrombosis. Semin Thromb Hemost 2016;42:445.
128. Kamberi B, Kamberi F, Spiroski M. Vascular Genetic Variants and Ischemic Stroke Susceptibility in Albanians from the Republic of Macedonia. Open Access Maced J Med Sci 2016;4:556-64.
129. Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Skrzypek M. Lack of Associations Between PAI-1 and FXIII Polymorphisms and Arterial Ischemic Stroke in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Appl Thromb Hemost 2019;25:1076029619869500.
130. Gils A, Declerck P. Plasminogen Activator Inhibitor-1. Curr Med Chem 2004;11:2323–34.
131. Tjärnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Thrombotic Cerebrovascular Diseases. Stroke 2012;43:2833-9.
132. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. J Thromb Haemost 2005;3:1879–83.
133. Morange PE, Saut N, Alessi MC, Yudkin JS, Margaglione M, di Minno G i ostali. Association of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with myocardial infarction, plasma PAI-1, and metabolic parameters: The HIFMECH study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:2250–7.

134. Jafari M, Hossein Jarahzadeh M, Dastgheib SA, Seifi-Shalamzari N, Raee-Ezzabadi A, Sadeghizadeh-Yazdi J i ostali. Association of PAI-1 rs1799889 Polymorphism with Susceptibility to Ischemic Stroke: a Huge Meta-Analysis based on 44 Studies. Acta Medica (Hradec Kralove) 2020;63:31–42.
135. Turan Ö, Anuk-İnce D, Olcay L, Sezer T, Gülleroğlu K, Yılmaz-Çelik Z i ostali. Neonatal cerebral sinovenous thrombosis: two cases, two different gene polymorphisms and risk factors. Turk J Pediatr 2017;59:71-5.
136. de Queiroz MR, de Sousa BB, da Cunha Pereira DF, Mamede CCN, Matias MS, de Morais NCG i ostali. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. Toxicon 2017;133:33–47.
137. Deppermann C. Platelets and vascular integrity. Platelets 2018;29:549–55.
138. Stegner D, Klaus V, Nieswandt B. Platelets as Modulators of Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. Front Immunol 2019;10:2505.
139. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. Pathophysiol Haemost Thromb 2003;33:52–8.
140. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: Facts and fancies. Rev Clin Exp Hematol 2001;5:262–87.
141. Bray PF. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. Curr Opin Hematol 2000;7:284–9.
142. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. J Thromb Haemost 2011;9 Suppl 1:92-104.
143. Stoll G, Nieswandt B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke — implications for treatment. Nat Rev Neurol 2019;15:473–81.
144. Kunicki TJ, Williams SA, Nugent DJ. Genetic variants that affect platelet function. Curr Opin Hematol 2012;19:371–9.
145. Madamanchi A, Santoro SA, Zutter MM. α2β1 Integrin. Adv Exp Med Biol 2014;819:41–60.
146. Matarin M, Brown WM, Hardy JA, Rich SS, Singleton AB, Brown RD i ostali. Association of integrin α2 gene variants with ischemic stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2008;28:81.

147. Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Association of human platelet alloantigen 1 through 5 polymorphisms with ischemic stroke. Cerebrovasc Dis 2008;25:81–6.
148. Szelenberger R, Kacprzak M, Bijak M, Saluk-Bijak J, Zielinska M. Blood platelet surface receptor genetic variation and risk of thrombotic episodes. Clin Chim Acta 2019;496:84–92.
149. Rath D, Schaeffeler E, Winter S, Levertov S, Müller K, Droppa M i ostali. GPla Polymorphisms Are Associated with Outcomes in Patients at High Cardiovascular Risk. Front Cardiovasc Med 2017;4:52.
150. Curtis BR, Mcfarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang 2014;106:93–102.
151. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. Blood 1999;93:3583–6.
152. Kunicki TJ, Williams SA, Diaz D, Farndale RW, Nugent DJ. Platelet adhesion to decorin but not collagen I correlates with the integrin α2 dimorphism E534K, the basis of the human platelet alloantigen (HPA)-5 system. Haematologica 2012;97:692.
153. Pavic M, Zadro R, Coen Herak D, Radic Antolic M, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. Transfusion Medicine 2010;20:73–7.
154. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin α2β1 density is associated with two silent polymorphisms in the α2 gene coding sequence. Blood 1997;89:1939–43.
155. Xin XY, Song YY, Ma JF, Fan CN, Ding JQ, Yang GY i ostali. Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. Thromb Res 2009;124:619–24.
156. Nikolopoulos GK, Tsantes AE, Bagos PG, Travlou A, Vaiopoulos G. Integrin, alpha 2 gene C807T polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. Thromb Res 2007;119:501–10.
157. Wu G, Xi Y, Yao L, Su L, Yan Y, Li M i ostali. Genetic polymorphism of ITGA2 C807T can increase the risk of ischemic stroke. Int J Neurosci 2014;124:841–51.

158. Huang XY, Fu WJ, Mei ZZ, Yu YL, Huang YH, Lin H i ostali. Association between platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and ischemic stroke: a meta-analysis in a separate ethnic group. Cell Mol Biol 2017;63:111–5.
159. Luk AOY, Wang Y, Ma RCW, Tam CHT, Ng MCY, Lam V i ostali. Predictive role of polymorphisms in interleukin-5 receptor alpha-subunit, lipoprotein lipase, integrin A2 and nitric oxide synthase genes on ischemic stroke in type 2 diabetes - An 8-year prospective cohort analysis of 1327 Chinese patients. Atherosclerosis 2011;215:130–5.
160. Ou W, Liu X, Shen Y, Li J, He L, Yuan Y i ostali. Association of CVD Candidate Gene Polymorphisms with Ischemic Stroke and Cerebral Hemorrhage in Chinese Individuals. PLoS One 2014;9:e105516.
161. Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HA, Mannhalter C, Berger K i ostali. A Meta-Analysis of Candidate Gene Polymorphisms and Ischemic Stroke in Six Study Populations: Association of Lymphotoxin-alpha in Non-hypertensive Patients. Stroke 2009;40:683-95.
162. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPBIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. Stroke 1997;28:1392–5.
163. Miller SP, Wu YW, Lee J, Lammer EJ, Iovannisci DM, Glidden D v i ostali. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls. Stroke 2006;37:2678–83.
164. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. Int J Biochem Cell Biol 2003;35:1170-4.
165. Gardiner EE, Andrews RK. Structure and function of platelet receptors initiating blood clotting. Adv Exp Med Biol 2014;844:263–75.
166. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. Thromb Haemost 2001;86:178–88.
167. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 1987;196:947–50.
168. Hsieh K, Funk M, Schillinger M, Endler G, Janisiw M, Reisinger M i ostali. Vienna Stroke Registry. Impact of the platelet glycoprotein Ib alpha Kozak

polymorphism on the risk of ischemic cerebrovascular events: a case-control study. Blood Coagul Fibrinolysis 2004;15:469–73.

169. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic Polymorphism of Platelet Glycoprotein Ib. Blood 1984;64:622–9.

170. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa PlA and GP Ib Variable Number Tandem Repeat Polymorphisms and Markers of Platelet Activation in Acute Stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18:1124–31.

171. Jilma-Stohlawetz P, Homoncik M, Jilma B, Knechtelsdorfer M, Unger P, Mannhalter C i ostali. Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation under high shear rates. Br J Haematol 2003;120:652–5.

172. Ulrichts H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, Vauterin S, Kroll H, Santoso S i ostali. Von Willebrand factor but not α-thrombin binding to platelet glycoprotein Ibα is influenced by the HPA-2 polymorphism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1302–7.

173. Kimelfeld EI, Koltsova EA, Petrova EA, Gudkova V v., Stahovskaya L v., Tupitsyna T v. i ostali. The association of hemostasis system genes with the development of ischemic stroke in patients under the age of 50 years. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 2018;118:14-21.

174. Maguire JM, Thakkinstian A, Sturm J, Levi C, Lincz L, Parsons M i ostali. Polymorphisms in Platelet Glycoprotein 1bα and Factor VII and Risk of Ischemic Stroke. Stroke 2008;39:1710–6.

175. Floyd CN, Ferro A. The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary. JRSM Cardiovasc Dis 2012;1:1–13.

176. Pagani G, Pereira JPV, Stoldt VR, Beck A, Scharf RE, Gohlke H. The human platelet antigen-1b (Pro33) variant of αIIbβ3 allosterically shifts the dynamic conformational equilibrium of this integrin toward the active state. J Biol Chem 2018;293:4830.

177. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L i ostali. Platelet GP IIIa PlA Polymorphisms Display Different Sensitivities to Agonists. Circulation 2000;101:1013–8.

178. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D. The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. Br J Haematol 2001;114:387–93.

179. Floyd CN, Ellis BH, Ferro A. The PlA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for stroke: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014;9:e100239.
180. Komitopoulou A, Platokouki H, Kapsimali Z, Pergantou H, Adamtziki E, Aronis S. Mutations and polymorphisms in genes affecting hemostasis proteins and homocysteine metabolism in children with arterial ischemic stroke. Cerebrovasc Dis 2006;22:13–20.
181. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. Thromb Res 2004;114:221–33.
182. Nurden AT. Clinical significance of altered collagen-receptor functioning in platelets with emphasis on glycoprotein VI. Blood Rev 2019;38:100592.
183. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. Br J Haematol 2007;139:363–72.
184. Joutsi-Korhonen L, Smethurst PA, Rankin A, Gray E, IJsseldijk M, Onley CM i ostali. The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression. Blood 2003;101:4372–9.
185. Watkins NA, O'Connor MN, Rankin A, Jennings N, Wilson E, Harmer IJ i ostali. Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms. J Thromb Haemost 2006;4:1197-205.
186. Kubisz P, Ivanková J, Škereňová M, Staško J, Hollý P. The prevalence of the platelet glycoprotein vi polymorphisms in patients with sticky platelet syndrome and ischemic stroke. Hematology 2012;17:355–62.
187. Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. Thromb Haemost 2004;92:459–66.
188. Andre P. P-selectin in haemostasis. Br J Haematol 2004;126:298–306.
189. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. Cardiovasc Res 2015;107:331–9.
190. Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K i ostali. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. Stroke 2006;37:2283–7.

191. Schmalbach B, Stepanow O, Jochens A, Riedel C, Deuschl G, Kuhlenbäumer G. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. Cerebrovasc Dis 2015;39:176–80.

192. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB i ostali. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. Hum Mol Genet 1998;7:1277–84.

193. Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Klüter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. Clin Chem Lab Med 2004;42:997–1004.

194. Kaur R, Singh J, Kapoor R, Kaur M. Putative functional non-coding polymorphisms in SELP significantly modulate sP-selectin levels, arterial stiffness and type 2 diabetes mellitus susceptibility. BMC Endocr Disord 2020;20:1–14.

195. Kappelmayer J, Nagy B. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. Biomed Res Int 2017;2017:1–18.

196. Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J i ostali. Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and women in the ECTIM extension study. Heart 2000;84:548–52.

197. Reiner AP, Carlson CS, Thyagarajan B, Rieder MJ, Polak JF, Siscovick DS i ostali. Soluble P-selectin, SELP polymorphisms, and atherosclerotic risk in European-American and African-African young adults the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:1549–55.

198. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. J Thromb Haemost 2003;1:1718-23.

199. Wu Z, Lou Y, Lu L, Liu Y, Chen Q, Chen X, Jin W. Heterogeneous effect of two selectin gene polymorphisms on coronary artery disease risk: a meta-analysis. PLoS One. 2014;9:e88152.

200. Wei Y-S, Lan Y, Huang R-Y, Liu Y-G, Tang R-G, Xu Q-Q i ostali. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the P-selectin gene with ischemic stroke. J Thromb Thrombolysis 2009;27:75–81.

201. Ferrari J, Rieger S, Endler G, Greisenegger S, Funk M, Scholze T i ostali. The Thr715Pro polymorphism of the P-selectin gene is not associated with ischemic stroke risk. Stroke 2007;38:395–7.

202. Zee RYL, Cook NR, Cheng S, Reynolds R, Erlich HA, Lindpaintner K i ostali. Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. Hum Mol Genet 2003;13:389–96.

203. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Wu KK, Boerwinkle E. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Atherosclerosis 2006;186:74–9.

204. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Atherosclerosis 2007;195:e76–82.

205. Tao L, Changfu W, Linyun L, Bing M, Xiaohui H. Correlations of platelet-leukocyte aggregates with P-selectin S290N and P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I genetic polymorphisms in patients with acute ischemic stroke. J Neurol Sci 2016;367:95–100.

206. Kirkham FJ. Is there a genetic basis for pediatric stroke? Curr Opin Pediatr 2003;15:547–58.

207. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JCM. ACE polymorphisms. Circ Res 2006;98:1123–33.

208. Vasudeva K, Balyan R, Munshi A. ACE-Triggered Hypertension Incites Stroke: Genetic, Molecular, and Therapeutic Aspects. Neuromolecular Med 2020;22:194–209.

209. Castellon R, Hamdi H. Demystifying the ACE Polymorphism: From Genetics to Biology. Curr Pharm Des 2007;13:1191–8.

210. Zhao J, Qin X, Li S, Zeng Z. Association between the ACE I/D polymorphism and risk of ischemic stroke: an updated meta-analysis of 47,026 subjects from 105 case-control studies. J Neurol Sci 2014;345:37–47.
211. Wei LK, Au A, Menon S, Griffiths LR, Kooi CW, Irene L i ostali. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and Ischemic Stroke: Meta-Analysis. J Stroke Cerebrovasc Dis 2017;26:2482–93.
212. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. J Mol Med 2016;94:739–46.
213. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. Neurobiol Dis 2014;72:3–12.
214. Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, Cascavilla L, Masullo C, Pilotto A. The genetics of the human APOE polymorphism. Rejuvenation Res 2011;14:491–500.
215. Pearson-Fuhrhop KM, Kleim JA, Cramer SC. Brain Plasticity and Genetic Factors. Top Stroke Rehabil 2009;16:282-99.
216. Kumar A, Kumar P, Prasad M, Misra S, Pandit AK, Chakravarty K. Association between Apolipoprotein ε4 Gene Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. Ann Neurosci 2016;23:113–21.
217. Khan TA, Shah T, Prieto D, Zhang W, Price J, Fowkes GR i ostali. Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: Systematic review and meta-analysis of 14 015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60 883 individuals. Int J Epidemiol 2013;42:475-92.
218. Balcerzyk A, Żak I, Niemiec P, Kopyta I, Emich-Widera E, Iwanicki T. APOE gene ε polymorphism does not determine predisposition to ischemic stroke in children. Pediatr Neurol 2010;43:25–8.
219. Gelfand AA, Croen LA, Torres AR, Wu YW. Genetic risk factors for perinatal arterial ischemic stroke. Pediatr Neurol 2013;48:36–41.
220. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.
221. Ficko T, Galvani V, Rupreht R, Dovc T, Rozman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. Transfus Med 2004;14:425–32.

222. Bein G, Hackstein H, Klüter H. DNA typing of human platelet antigen systems 1, 2, 3 and 5 in B-lymphoblastoid cell lines of the International Histocompatibility Workshop. Tissue Antigens 1997;49:443–7.

223. Morita H, Kurihara H, Yazaki Y, Nagai R. An application of melting curve analysis to large-scale genetic analysis in atherosclerotic disease: two linked polymorphisms of glycoprotein Ia gene and myocardial infarction in Japanese. U: Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications. Berlin: Spinger-Verlag; 2001:293–9.

224. Ulehlova J, Slavik L, Kucerova J, Krcova V, Vaclavik J, Indrak K. Genetic Polymorphisms of Platelet Receptors in Patients with Acute Myocardial Infarction and Resistance to Antiplatelet Therapy. Genet Test Mol Biomarkers 2014;18:599-604.

225. Homo sapiens integrin subunit alpha 2 (ITGA2), RefSeqGene (LRG_1001) o - Nucleotide - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008330.2?from=5027&to=110454&report=genbank (pristupljeno 1. 11. 2021.).

226. Homo sapiens glycoprotein Ib platelet subunit alpha (GP1BA), RefSeqGen - Nucleotide - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008767.2?from=4983&to=7729&report=genbank (pristupljeno 24. 10. 2021.).

227. rs1126643 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1126643?vertical_tab=true (pristupljeno 1. 11. 2021.).

228. rs1062535 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1062535?vertical_tab=true (pristupljeno 1. 11. 2021.).

229. rs2243093 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2243093?vertical_tab=true (pristupljeno 1. 11. 2021.).

230. Ceri A, Pavic M, Horvat I, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. J Clin Lab Anal 2019;33:e22698.

231. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCgreen. Clin Chem 2003;49:853–60.
232. Zeng T, Ye Y, Niu Q, Lu X, An Y, Li X i ostali. Frequency distribution of single nucleotide polymorphisms in P-selectin gene in Chinese Tibetan and Han populations. Gene 2012;499:352–6.
233. Homo sapiens selectin P (SELP), RefSeqGene on chromosome 1 - Nucleotide - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012125.2?from=5016&to=46291&report=genbank (pristupljeno 28. 10. 2021.).
234. Homo sapiens glycoprotein VI platelet (GP6), RefSeqGene (LRG_560) on c - Nucleotide - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_031963.2?from=5001&to=29560&report=genbank (pristupljeno 28. 10. 2021.).
235. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 2012;13:134.
236. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. Clin Chem 2003;49:396–406.
237. rs6131 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6131?vertical_tab=true (pristupljeno 31. 10. 2021.).
238. rs6133 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6133?vertical_tab=true (pristupljeno 31. 10. 2021.).
239. rs6136 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6136?vertical_tab=true (pristupljeno 31. 10. 2021.).
240. rs1613662 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1613662?vertical_tab=true (pristupljeno 31. 10. 2021.).
241. American College of Medical Genetics. Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2008:1–41. Preuzeto s:

https://www.acmg.net/PDFLibrary/Standards-Guidelines-Clinical-Molecular-Genetics.pdf (pristupljeno 31. 10. 2021.).

242. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics 2006;22:1928–9.
243. SNPStats: your web tool for SNP analysis. Preuzeto s: https://www.snpstats.net/start.htm (pristupljeno 28. 6. 2022.).
244. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann Statist 2001;29:1165–88.
245. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 1995;57:289–300.
246. Jafari M, Ansari-Pour N. Why, When and How to Adjust Your P Values? Cell J 2019;20(4):604-7.
247. Easy Binomial Test Calculator. Preuzeto s: https://www.socscistatistics.com/tests/binomial/default2.aspx (pristupljeno 25. 6. 2022.).
248. Normann S, de Veber G, Fobker M, Langer C, Kenet G, Bernard TJ i ostali. Role of endogenous testosterone concentration in pediatric stroke. Ann Neurol 2009;66:754–8.
249. Haywood S. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke: a systematic review. Arch Dis Child 2005;90:402–5.
250. Renaud C, Tardy-Poncet B, Presles E, Chabrier S. Low prevalence of coagulation F2 and F5 polymorphisms in mothers and children in a large cohort of patients with neonatal arterial ischemic stroke. Br J Haematol 2010;150:709–12.
251. Laugesaar R, Kahre T, Kolk A, Uustalu Ü, Kool P, Talvik T. Factor V Leiden and prothrombin 21210G>A mutation and paediatric ischaemic stroke: a case-control study and two meta-analyses. Acta Paediatr 2010;99:1168–74.
252. Kopyta I, Sarecka-Hujar B, Sordyl J, Sordyl R. The role of genetic risk factors in arterial ischemic stroke in pediatric and adult patients: A critical review. Mol Biol Rep 2014;41:4241–51.
253. Kopyta I, Niemiec P, Balcerzyk A, Emich-Widera E, Pilarska E, Pienczk-Ręcławowicz K i ostali. Fibrinogen alpha and beta gene polymorphisms in

pediatric stroke--case-control and family based study. Eur J Paediatr Neurol 2015;19:176–80.

254. Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Polymorphisms of the human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-4 in ischemic stroke. Am J Hematol 2008;83:570–3.

255. Abboud N, Ghazouani L, Ben-Hadj-Khalifa S, Anabi F, Added F, Khalfallah A i ostali. Human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, and HPA-3 polymorphisms associated with extent of severe coronary artery disease. J Thromb Thrombolysis 2010;29:409–15.

256. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. Cell 2019;177:70–84.

8. PRILOZI

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada objavljena u časopisima koji su zastupljeni u bazi *Web of Science Core Collection,* koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

Ceri A, Pavic M, Horvat I, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. J Clin Lab Anal. 2019;33:e22698.

Čeri A, Leniček Krleža J, Coen Herak D, Miloš M, Pavić M, Barišić N, Đuranović V, Zadro R. Role of platelet gene polymorphisms in ischemic pediatric stroke subtypes: a case-control study. Croat Med J. 2020;61(1):18-27.

Received: 16 August 2018 | Revised: 21 September 2018 | Accepted: 25 September 2018

DOI: 10.1002/jcla.22698

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis

Andrea Ceri[1] | Marina Pavic[2] | Ivana Horvat[3] | Margareta Radic Antolic[3] | Renata Zadro[1,3]

[1]Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Medical Biochemistry and Haematology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

[2]Clinical Institute of Chemistry, Department of Laboratory Diagnostics in Traumatology and Orthopaedics, Sestre milosrdnice University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

[3]Department of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Correspondence
Renata Zadro, Department of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia.
Email: rzadro@mef.hr

Funding information
Croatian Science Foundation, Grant/Award Number: HRZZ IP-2014-09-2047

Background: High resolution melting (HRM) analysis is one of the newer, reliable, and sensitive genotyping techniques, which offers considerable time and cost savings. P-selectin is an adhesion molecule that has a role in the initial phases of leukocyte adhesion to stimulated platelets and endothelial cells in inflammation. Multiple polymorphisms in P-selectin gene (*SELP*) that affect the protein sequence have been described. The aim of this study was to design, optimize, and validate a simple and rapid in-house HRM-based method for genotyping the NM_003005.3:c.992G>A (c.992G>A), NM_003005.3:c.1918G>T (c.1918G>T), and NM_003005.3:c.2266A>C (c.2266A>C) *SELP* polymorphisms.

Methods: Initial genotyping of three *SELP* polymorphisms was performed by applying polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific primers (SSP), which was used as a reference method for determination of analytical sensitivity. PCR-HRM was performed with primers for c.2266A>C reported in the literature. Primers for the remaining two polymorphisms were designed using Primer-BLAST. Precision testing was performed using three samples with different genotypes. For accuracy, analytical sensitivity and specificity testing, 20 wild type, 10 heterozygous, and 10 homozygous samples were chosen *per* polymorphism. Results were expressed as percentage of concordance with the acceptability criterion ≥95%.

Results: Agreement of results was 100% for all validation parameters except for analytical sensitivity for c.1918G>T and c.2266A>C, with agreement of 90%. Repeated analysis using both methods revealed an error in initial genotyping and correct genotyping by PCR-HRM, which was confirmed by Sanger sequencing.

Conclusion: The validation confirmed PCR-HRM as a precise, accurate, and specific method for genotyping the c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C *SELP* polymorphisms.

KEYWORDS

genotyping, high resolution melting analysis, method validation, P-selectin, single nucleotide polymorphism

Abbreviations: c.1918G>T, NM_003005.3:c.1918G>T; c.2266A>C, NM_003005.3:c.2266A>C; c.992G>A, NM_003005.3:c.992G>A; HRM, high resolution melting; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SELP, P-selectin; *SELP*, P-selectin gene; SNP, single nucleotide polymorphism; SSP, sequence-specific primers.

 © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

1 | INTRODUCTION

High resolution melting (HRM) analysis is one of the mutation scanning techniques with great sensitivity that offers considerable time and cost savings compared to other closed-tube screening methods.[1,2] The first use of HRM analysis was published in 2003, and it required expensive fluorescently labeled oligonucleotides.[3] The use of saturating dyes in HRM analysis performed in a closed-tube system for genotyping and mutation screening was described later that year.[4] It was based on the presence of a double-strand DNA intercalating fluorescent dye, with its dissociation from DNA during melting when exposed to increasing temperatures resulting in fluorescent signal modification. The melting profile obtained yields a specific sequence-related pattern, which enables discrimination between different genotypes. Many applications of HRM analysis have been described, including gene scanning, small amplicon genotyping, unlabeled probe genotyping, sequence matching, and methylation analysis.[5]

P-selectin (SELP), a cellular adhesion molecule, is an integral membrane glycoprotein located in the alpha granules of platelets and Weibel-Palade bodies of endothelial cells.[6,7] SELP is responsible for leukocyte rolling and initial phases of their adhesion to stimulated platelets and endothelial cells in the inflammation process.[6-9] Both the membrane form and the soluble form of SELP have roles in coagulation and thrombosis, inflammation, and atherosclerosis.[10] Multiple P-selectin gene (*SELP*) single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described that affect protein sequence.[11] Amino acid substitution may have a substantial effect on SELP function and may be associated with the occurrence of cerebrovascular and cardiovascular disorders. SELP levels and *SELP* polymorphisms are in the focus of a number of studies as they may provide a new marker to predict future cardiovascular or cerebrovascular events, complications in other inflammatory or oncologic diseases, or even in vitro fertilization failure.[6,10,12-22]

A limited number of methods for genotyping the NM_003005.3:c.992G>A (c.992G>A), NM_003005.3:c.1918G>T (c.1918G>T), and NM_003005.3:c.2266A>C (c.2266A>C) *SELP* polymorphisms (historically named S290N, V599L, and T715P, respectively) are available in the literature and include PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP),[12] polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific primers (SSP),[14,23] mutagenically separated PCR,[6,24] TaqMan technology-based real-time PCR,[18-20] HRM analysis,[25] and sequencing methods.[21,22]

The PCR-SSP method was previously used in our laboratory, but there was a need for a fast and easy to perform method. The aim of this study was to design, optimize, and validate a simpler and rapid in-house HRM-based method for genotyping the c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C *SELP* polymorphisms. Evaluation of its performance in terms of simplicity to use, duration, and total cost is also discussed.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample selection and validation plan

Samples from 65 subjects (50 patients with ischemic stroke and 15 controls) that were collected for the Genetic Polymorphisms and Ischemic Stroke in Children project, funded by the Croatian Science Foundation (HRZZ IP-2014-09-2047) were used in this study. Subjects were recruited at the Zagreb University Hospital Centre and Zagreb Children's Hospital, Zagreb, Croatia. Samples were selected according to the results of initial genotyping of the c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C *SELP* polymorphisms by the PCR-SSP method originally used in our laboratory.[14] Parents of all participants gave their written consent to include their children in the research, and additional consent was obtained from all children older than 12 years. The study was approved by ethics committees of the participating institutions and was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Validation plan was created according to the internal laboratory method validation protocol taken over and adapted from the American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories.[26] For each polymorphism, three samples of different genotype were selected for precision testing; repeatability was tested in a series of 20 measurements, and day-to-day precision was tested by 20-day measurements. Twenty wild type, 10 heterozygous, and 10 homozygous samples, making a total of 40 samples for each polymorphism, were selected for accuracy, analytical sensitivity, and analytical specificity testing. The PCR-SSP method was used as a reference method for determination of analytical sensitivity. Results were expressed as percentage of concordance with 95% confidence interval. Acceptability criterion was ≥95%.

2.2 | DNA extraction

Peripheral whole blood samples from all subjects were collected into vacuum tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid as anticoagulant. Genomic DNA was extracted from the remaining peripheral blood leukocytes using the salting out method[27] and stored at +4°C until analysis. The quality and amount of isolated DNA were measured by spectrophotometric measurement on a NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Termo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI, USA).

2.3 | PCR-SSP genotyping

Initial genotyping of the SNPs c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C in *SELP* was performed using the previously described PCR-SSP[14] on the Applied Biosystems GeneAmp 2720 Thermal Cycler (Foster City, CA, USA), using 150-250 ng DNA per 10 μL PCR mixture. Part of the β-globulin locus was simultaneously amplified using separate primer pair as an internal control PCR fragment (536 bp). Negative

TABLE 1 Primer sequences used for high resolution melting analysis of P-selectin gene polymorphisms

Reference SNP ID	Amino acid change	Primer sequence	Product size (bp)
NM_003005.3:c.992G>A (rs6131)	NP_002996.2:p.Ser331Asn	F: 5′-CCTTGGTTATTCTCTCCAGCTGTGC-3′ R: 5′-AGCCGGGCTGGCACTCAAAT-3′	130
NM_003005.3:c.1918G>T (rs6133)	NP_002996.2:Val640Leu	F: 5′-TTGCAGGAGCCTCCCTTGTTATGAA-3′ R: 5′-GGTTCCCTGCCCAGGAGTGGT-3′	184
NM_003005.3:c.2266A>C (rs6136)	NP_002996.2:p.Thr756Pro	F: 5′-ATGAACTGCTCCAACCTCTG-3′ R: 5′-CCCACATGAAAATTGTACCTT-3′	167

SNP, single nucleotide polymorphism.

control (PCR-grade water) was included in each run. Amplification products were separated on 2% agarose gel prestained with 0.5 ng/mL ethidium bromide in a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for 30 minutes at 120 V. Each electrophoresis run included one lane of 100 bp molecular weight marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to assess the PCR product size. Results were obtained by visual inspection of the gels and documented by the G:BOX Chemi HR16 Bioimaging System (Syngene, Cambridge, United Kingdom) using GeneSnap software (version 7.12, Syngene, Cambridge, UK) on the basis of presence or absence of the allele-specific PCR products, as described before.[14]

2.4 | PCR-HRM genotyping

Initially, the primers and the protocol necessary for genotyping of selected SNPs were found in the literature.[25] Since primers for *SELP* c.992G>A and c.1918G>T did not yield distinguishable high resolution melting results despite attempts at different normalization and temperature shifts of melting curves, separate specific primers were designed using reference sequence available at The National Center for Biotechnology Information public Nucleotide: Reference Sequence database[28] and Primer-BLAST tool,[29] and synthesized by Metabion International AG (Planegg, Germany). The primers were designed to amplify small fragments (about 100-200 bp) covering SNP loci because differences among genotypes are easier to distinguish if amplicons are short.[3] Primer sequences are shown in Table 1. PCR amplifications and HRM procedures for variants of the examined SNPs were carried out in 96-well plates on the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and analyzed using LightCycler® 480 Software (version 1.5; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Control samples of each genotype that had previously been confirmed by sequencing were obtained[14] and used as positive controls for optimization of PCR-HRM. Negative control (PCR-grade water) was included in each run. Since obtaining highly specific amplification is crucial for successful HRM analysis as part of method optimization, the absence of unspecific amplification products was checked by control electrophoresis of three samples for each polymorphism on 2% agarose gel.

The PCR-HRM was performed using LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics) that contains FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix, and high resolution melting dye, following the manufacturer's instructions. PCR mixture contained 10 μL of 2x concentrated master mix, 2 μL of 25 mmol/L $MgCl_2$, 1 μL each of a 4 μmol/L forward and reverse primer, 1 μL of genomic DNA previously adjusted to 10 ng/μL in 1 × TE buffer, and 5 μL of PCR-grade water to adjust the final reaction volume of 20 μL. The PCR microtiter plates were centrifuged at 107 *g* for 1 minute in swing rotor centrifuge to remove small air bubbles in the wells.

Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 60°C for 15 seconds, and extension at 72°C for 25 seconds with single fluorescence measurement. After amplification, PCR products were denaturated at 95°C for 1 minute and cooled to 40°C for 1 minute to form double-strand DNA. HRM analysis was performed by gradually increasing temperature from 70°C to 95°C at a rate of 0.02°C/s with continuous fluorescence measuring. After the melting procedure, the instrument was cooled down to 40°C. Analysis of the results obtained included normalization and temperature shift of melting curves to get deduced difference plot where samples are autogrouped depending on curve shape relating to DNA sequence with default sensitivity of 0.3 for the c.1918G>T and c.2266A>C polymorphisms and lower sensitivity for c.992G>A when needed (Figure 1).

2.5 | Sanger sequencing

In case of discrepant results between the PCR-HRM and PCR-SSP methods, both forward and reverse sequencing were performed as a reference method to establish the correct genotype. After control electrophoresis, 15 μL of each PCR product was purified by mixing with 6 μL of illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and incubation of the prepared samples on the Applied Biosystems GeneAmp 2720 Thermal Cycler (Foster City, CA, USA) at 37°C for 15 minutes and at 80°C for 15 minutes. PCR with labeled dNTPs was performed on the Applied Biosystems GeneAmp 2720 Thermal Cycler using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies Corporation, Austin, TX, USA). Reaction mixture was prepared by mixing 0.4 μL of BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 1.75 μL of 5X Sequencing

Buffer, 1 μL of 3.3 μmol/L forward or reverse primer that was also used for PCR-HRM, and 6.75 μL of purified PCR product. Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 96°C for 1 minute, followed by 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 seconds, annealing at 50°C for 5 seconds, and extension at 40°C for 4 minutes. Labeled PCR products were purified using the

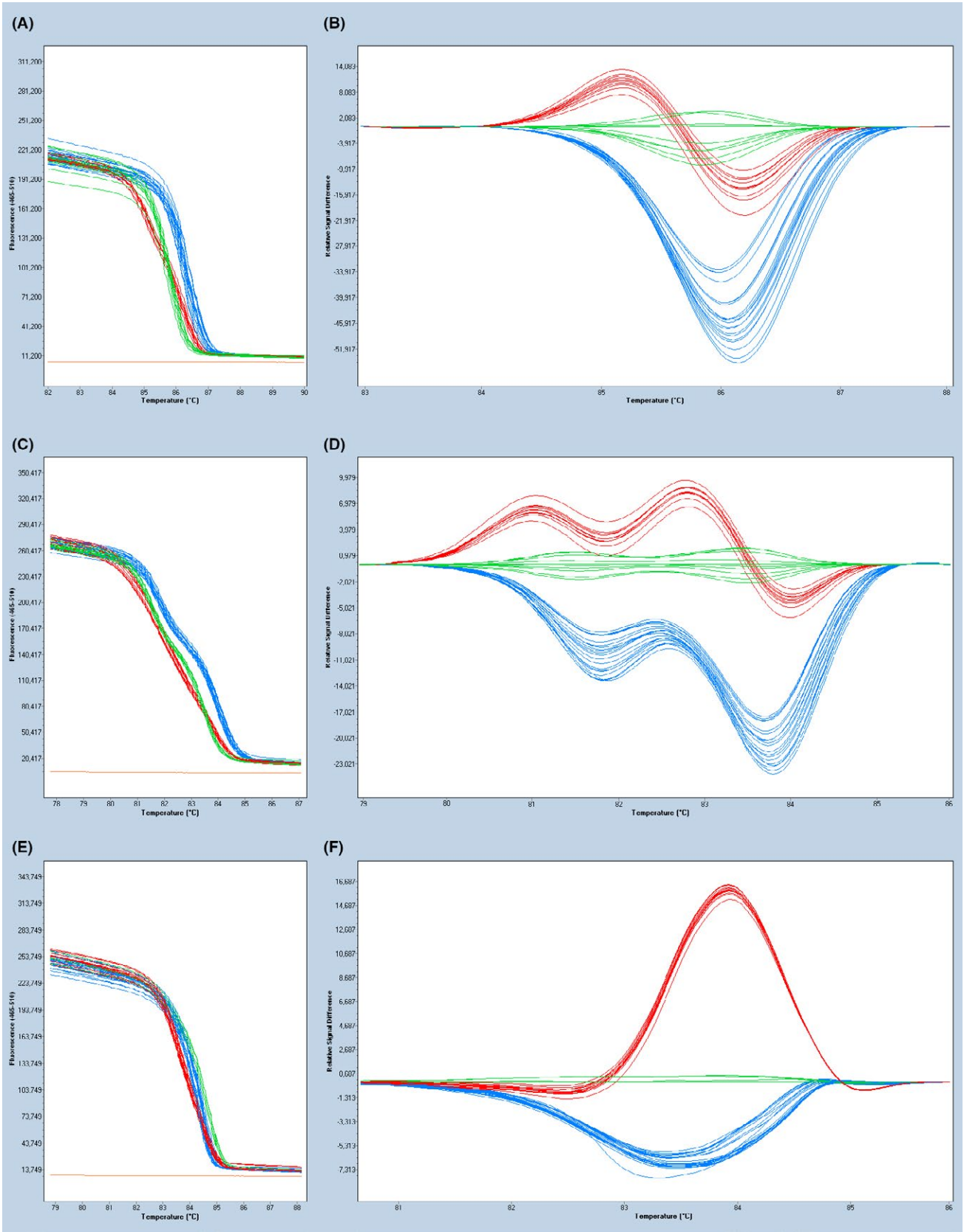


FIGURE 1 Results of genotyping three P-selectin gene polymorphisms in 40 samples using PCR-HRM. A, Melting curves obtained before normalization and temperature shifting for c.992G>A polymorphism. Possible mild differences according to different genotype are visible, but exact genotype cannot be obtained. B, Deduced difference plot obtained after normalization and temperature shifting of melting curves for c.992G>A polymorphism. GG genotypes are colored in blue, GA in red, and AA in green. C, Melting curves obtained before normalization and temperature shifting for c.1918G>T polymorphism. Possible mild differences according to different genotype are visible, but exact genotype cannot be obtained. D, Deduced difference plot obtained after normalization and temperature shifting of melting curves for c.1918G>T polymorphism. GG genotypes are colored in blue, GT in red, and TT in green. E, Melting curves obtained before normalization and temperature shifting for c.2266A>C polymorphism. There are no obvious differences according to different genotype. F, Deduced difference plot obtained after normalization and temperature shifting of melting curves for c.2266A>C polymorphism. AA genotypes are colored in blue, AC in red, and CC in green

NucleoSEQ® kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions, separated on the Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser (Foster City, CA, USA) and analyzed using Sequencing Analysis software (version 5.2; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3 | RESULTS

Results of control 2% agarose gel electrophoresis of three samples for each polymorphism for the absence of unspecific amplification are shown in Figure 2.

Precision testing and accuracy testing yielded 100% agreement of results (95% confidence interval of 92.1%-100%) obtained with PCR-HRM for all three polymorphisms examined. Correspondence of analytical sensitivity testing results for the c.992G>A polymorphism was 100% (95% confidence interval of 92.1%-100%). Analytical sensitivity testing for the c.1918G>T polymorphism revealed four out of 40 analyzed samples with incongruous genotyping results; all four samples were genotyped by PCR-SSP yielding TT genotype, whereas PCR-HRM resulted in GG genotype. Similar results were obtained in analytical sensitivity testing for the c.2266A>C polymorphism, where also four samples with incongruous genotyping results were observed. Genotyping using the PCR-SSP method for those samples yielded CC as a result, whereas the PCR-HRM method resulted in three AA and one AC genotype. Correspondence of these analytical sensitivity testing results for each polymorphism was 90% (95% confidence interval of 76.3%-97.2%). In order to double-check confusing results, questionable samples were submitted to repeated analysis using both methods. Genotyping using PCR-HRM method for both polymorphisms revealed the same results as previously. However, PCR-SSP used for c.1918G>T genotyping resulted in all GG genotypes, and for c.2266A>C genotyping resulted in one AC and three AA genotypes, which indicated erroneous initial genotyping when the PCR-SSP method was used. To establish the correct genotype, additional Sanger sequencing was performed using the same primers. Sequencing results were consistent with the results obtained by the PCR-HRM method (Figure 3). Therefore, actual analytical sensitivity for c.1918G>T and c.2266A>C was 100% (95% confidence interval of 92.1%-100%). Analytical specificity for all three examined polymorphisms was 100% (95% confidence interval of 92.1%-100%).

4 | DISCUSSION

In this study, successful design, optimization, and validation of a fast and simple method for genotyping three *SELP* polymorphisms were demonstrated. Optimization of the method was slightly challenging;

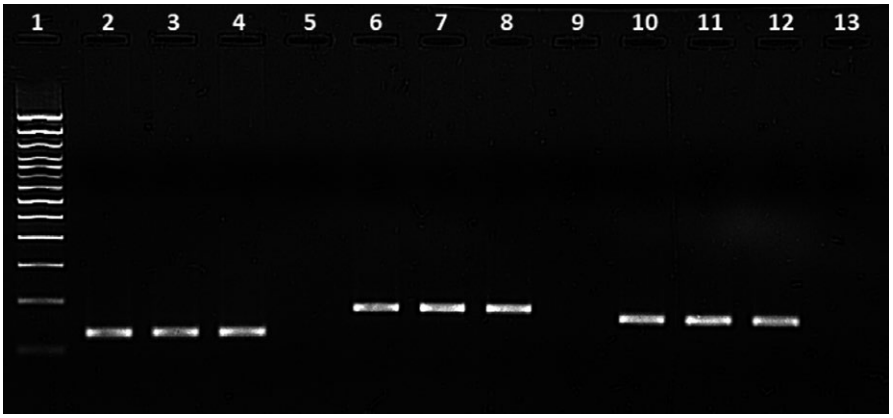


FIGURE 2 Results of control 2% agarose gel electrophoresis of amplified PCR products for each P-selectin polymorphism examined. Lane 1—100 bp DNA ladder; lanes 2-4—PCR products (130 bp) of control samples for genotyping c.992G>A; lane 5—negative control for genotyping c.992G>A; lanes 6-8—PCR products (184 bp) of control samples for genotyping c.1918G>T; lane 9—negative control for genotyping c.1918G>T; lanes 10-12—PCR products (167 bp) of control samples for genotyping c.2266A>C; and lane 13—negative control for genotyping NM_003005.3:c.2266A>C

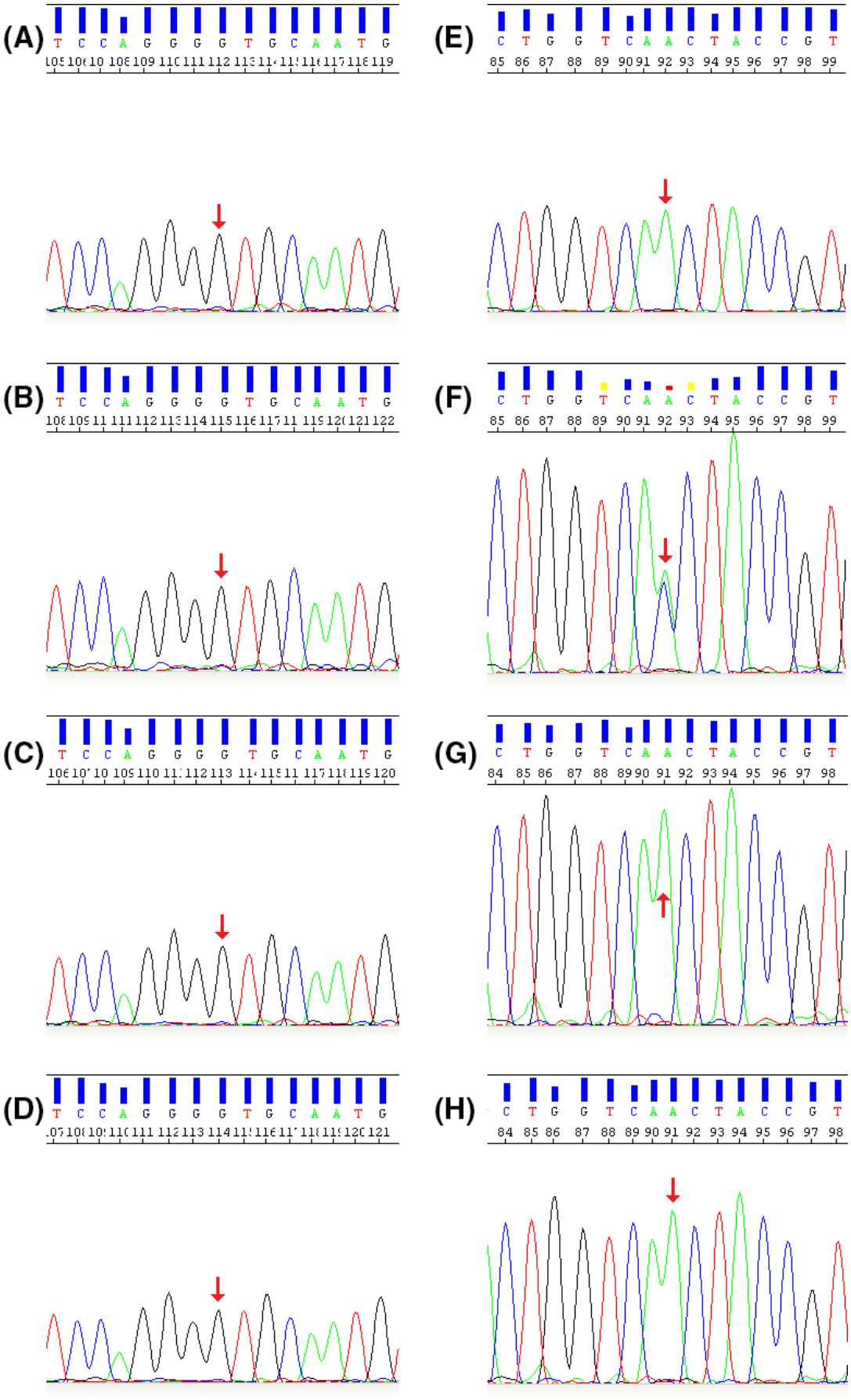

(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)

FIGURE 3 Chromatograms from sequence analysis of samples with incongruous genotyping results using the same primers for PCR-HRM analysis. Since SNPs are close to 3' end of PCR products for both polymorphisms, reverse primer did not yield readable sequence; only sequencing results with forward primers are shown. A-D, Chromatograms from sequence analysis of four samples with incongruous genotyping results for c.1918G>T polymorphism. Visual inspection of chromatograms reveals GG genotype of all four samples. Polymorphic site is marked with red arrow. E-H, Chromatograms from sequence analysis of four samples with incongruous genotyping results for c.2266A>C polymorphism. Visual inspection of chromatograms shows AA genotype in three samples (E, G, and H) and AC genotype in one sample (F). Polymorphic site is marked with red arrow

previously published primers[25] resulted in high resolution melting patterns for the c.992G>A and c.1918G>T polymorphisms that were impossible to interpret. To successfully optimize the method, the only solution was to create new specific primers which, along with modifying PCR-HRM assay conditions, resulted in better high resolution melting patterns that were easy to interpret. Specificity of amplification for all three polymorphisms examined was successfully confirmed by control 2% agarose gel electrophoresis.

In terms of validation of the PCR-HRM method described, precision, accuracy, and analytical specificity for all three polymorphisms examined and analytical sensitivity for the c.992G>A polymorphism were perfectly acceptable. However, analytical sensitivity testing for the c.1918G>T and c.2266A>C polymorphisms revealed four incongruous results for each genotype. Repeated genotyping using both methods, along with Sanger sequencing results, pointed to erroneous initial genotyping by PCR-SSP due to possible sample contamination while preparing PCR reactions, possible switching of the samples during gel loading for electrophoresis, or possible error in visual interpretation of the gels after electrophoresis.

Factors that have to be taken in consideration when choosing optimal method for genotyping are simplicity of assay design and ease of use, availability of instruments and technology, turnaround time, and cost of analysis per sample.[30] In comparison with usual PCR methods based on melting curve analysis, PCR-HRM does not require a pair of expensive fluorescently labeled probes, real-time fluorescence measurement, or further processing or separation of amplified products by electrophoresis. A set of two low-cost unmodified but easily created specific primers, saturating DNA-binding fluorescent dye provided in several commercially available master mixes, simple PCR, and instrument that supports HRM analysis are required only.[31,32] The use of closed-tube PCR methodology, such as PCR-HRM, to genotype SNPs allows for simultaneous amplification and analysis of a large number of samples without any further manual separation steps and the need for hands-on post-PCR analysis. It is beneficial to omit the separation step in the genotyping method, to avoid potential sample tracking errors when applying samples on the gel, and to shorten time of analysis, which is especially important in the clinical setting where genotyping results may influence medical decision. The requirement of only 10 ng of input DNA compared to 150-200 ng for PCR-SSP is also important for clinical settings where patient material may be limited.

The PCR-HRM method also has several disadvantages. When unexpected polymorphisms are present, they might interfere with genotyping by altering the expected melting curve patterns from which the correct genotype could not be determined.[1,31] This has to be kept in mind when creating specific primers and optimizing the method and should be revised if an unexpected melting curve pattern appears. When analyzing SNPs, heterozygotes are easily identifiable because of the apparent change in curve shape, but not all homozygotes can be distinguished—the base pair can be inverted or neutral resulting in a smaller melting temperature difference.[32] Luckily, it was not the case for the c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C *SELP* polymorphisms. Furthermore, if the concentration or quality of DNA is not consistent among all samples in each run, it can also cause the deviation of HRM results.[1,31] This effect can be easily avoided by diluting original DNA samples to similar concentration. Open-well plate for PCR-HRM genotyping also entails a risk of contamination, but the potential errors can be minimized with careful handling. Additional disadvantage of PCR-HRM may be higher instrumentation cost since it requires expensive LightCycler® 480 Real-Time PCR System or similar, whereas PCR-SSP requires much less expensive instrumentation.

Taking into account the characteristics of all the methods available, the PCR-HRM method was optimal choice for our laboratory. PCR-RFLP,[12] PCR-SSP,[14,23] and mutagenically separated PCR[6,24] are relatively simple and low-cost methods that do not require special and expensive equipment but are time-consuming. These methods might be appropriate for laboratories that have fewer samples to be tested, with limited reliability for assessing correct genotypes due to greater error potential. Although being a reference method, the sequencing methods described[21,22] are significantly more expensive and time-consuming, which is why sequencing is generally avoided in routine use for detecting SNPs. The TaqMan technology-based real-time PCR methods[18-20] are more specific but also more expensive than PCR-HRM due to the use of fluorescently labeled allele-specific probes.

The PCR-HRM method presented can be used for efficient and accurate genotyping of the c.992G>A, c.1918G>T, and c.2266A>C *SELP* polymorphisms. Optimized protocol for PCR-HRM has been proven as a fast and user-friendly PCR-based method that can be beneficial in future clinical routine testing of the polymorphisms examined, especially in laboratories with high sample volume.

CONFLICT OF INTEREST

This study was supported by the Croatian Science Foundation (grant ID HRZZ IP-2014-09-2047). R. Zadro received lecture honoraria from Novartis and Roche. The funding source had no involvement in study design, in collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

ORCID

Andrea Ceri http://orcid.org/0000-0003-3709-6328

REFERENCES

1. Er TK, Chang JG. High-resolution melting: applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta*. 2012;414:197-201.
2. Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*. 2010;50:250-261.
3. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. 2003;49:396-406.
4. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49:853-860.
5. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10:219-240.
6. Ay C, Jungbauer LV, Sailer T, et al. High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin Chem*. 2007;53:1235-1243.
7. McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells*. 1990;16:73-80.
8. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678-689.
9. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:581-586.
10. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol*. 2004;126:298-306.
11. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet*. 1998;7:1277-1284.
12. Wei YS, Lan Y, Huang RY, et al. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the P-selectin gene with ischemic stroke. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;27:75-81.
13. Ferrari J, Rieger S, Endler G, et al. The Thr715Pro polymorphism of the P-selectin gene is not associated with ischemic stroke risk. *Stroke*. 2007;38:395-397.
14. Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Klüter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:997-1004.
15. Reiner AP, Carlson CS, Thyagarajan B, et al. Soluble P-selectin, SELP polymorphisms, and atherosclerotic risk in European-American and African-African young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1549-1555.
16. Mathew JP, Podgoreanu MV, Grocott HP, et al. Genetic variants in P-selectin and C-reactive protein influence susceptibility to cognitive decline after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1934-1942.
17. Kee F, Morrison C, Evans AE, et al. Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and women in the ECTIM extension study. *Heart*. 2000;84:548-552.
18. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis*. 2007;195:76-82.
19. Avan A, Avan A, Le Large T, et al. AKT1 and SELP polymorphisms predict the risk of developing cachexia in pancreatic cancer patients. *PLoS One*. 2014;9:e108057.
20. Burkhardt J, Blume M, Petit-Teixeira E, et al. Cellular adhesion gene SELP is associated with rheumatoid arthritis and displays differential allelic expression. *PLoS One*. 2014;9:e103872.
21. Gari MA, AlKaff M, Alsehli HS, et al. Identification of novel genetic variations affecting osteoarthritis patients. *BMC Med Genet*. 2016;17:68.
22. Vlachadis N, Tsamadias V, Vrachnis N, et al. Associations of combined polymorphisms of the platelet membrane glycoproteins Ia and IIIa and the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and P-selectin genes with IVF implantation failures. *J Obstet Gynaecol*. 2017;37:363-369.
23. Alpay N, Hançer VS, Erer B, İnanç M, Diz KR. The relationship between P-selectin polymorphisms and thrombosis in antiphospholipid syndrome: A Pilot Case-Control Study. *Turkish J Hematol*. 2014;31:357-362.
24. Jilma-Stohlawetz P, Mannhalter C, Kaider A, Waidacher T, Jilma B, Panzer S. The association of the Thr715Pro P-selectin genotype with levels of P-selectin in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2014;107:368-374.
25. Zeng T, Ye Y, Niu Q, et al. Frequency distribution of single nucleotide polymorphisms in P-selectin gene in Chinese Tibetan and Han populations. *Gene*. 2012;499:352-356.
26. American College of Medical Genetics. Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories [Internet]. 2008 [cited 2018 Aug 15]. https://www.acmg.net/PDFLibrary/Standards-Guidelines-Clinical-Molecular-Genetics.pdf
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
28. Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Accession No. NG_012125.1, Homo sapiens selectin P (SELP), RefSeqGene on chromosome 1. 1988 [cited 2018 Aug 15]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012125.1?from=5001&to=46291&report=genbank
29. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
30. Baudhuin LM, Highsmith WE, Skierka J, Holtegaard L, Moore BE, O'Kane DJ. Comparison of three methods for genotyping the UGT1A1 (TA)n repeat polymorphism. *Clin Biochem*. 2007;40:710-717.
31. Lu HC, Chang YS, Chang CC, Lin CH, Chang JG. Developing and evaluating the HRM technique for identifying cytochrome P450 2D6 polymorphisms. *J Clin Lab Anal*. 2015;29:220-225.
32. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007;8:597-608.

How to cite this article: Ceri A, Pavic M, Horvat I, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. *J Clin Lab Anal*. 2018;e22698. https://doi.org/10.1002/jcla.22698

Croat Med J. 2020;61:18-27
https://doi.org/10.3325/cmj.2020.61.18

Role of platelet gene polymorphisms in ischemic pediatric stroke subtypes: a case-control study

Andrea Čeri[1], Jasna Leniček Krleža[2], Désirée Coen Herak[3], Marija Miloš[3], Marina Pavić[4], Nina Barišić[5], Vlasta Đuranović[6], Renata Zadro[1,3]

[1]Department of Medical Biochemistry and Hematology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

[2]Department of Laboratory Diagnostics, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

[3]Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

[4]Department of Laboratory Diagnostics in Traumatology and Orthopedics, Clinical Institute of Chemistry, University Hospital Centre Sestre Milosrdnice, Zagreb, Croatia

[5]Division of Neuropediatrics, Department of Pediatrics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

[6]Department of Neuropediatrics, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

Aim To assess the role of human platelet antigens (HPA), P-selectin gene (SE*LP*) polymorphisms, and HPA and *SELP* haplotypes with factor V (*FV*) R506Q in ischemic pediatric stroke (IPS) subtypes: cerebral sinovenous thrombosis (CSVT), perinatal (PAIS), and childhood (CAIS) arterial ischemic stroke.

Methods This case-control study enrolled 150 children with confirmed IPS and 150 age- and sex-matched controls. *FV* R506Q and HPA-1 were genotyped with CVD StripAssay®, HPA-2 and HPA-3 with real-time polymerase chain reaction, *SELP* S290N, V599L, and T715P with high resolution melting analysis, and *SELP* N562D with sequence-specific polymerase chain reaction.

Results HPA-1b allele (odds ratio [OR] 2.75, 95% confidence interval [CI] 1.02-7.42, $P=0.048$) and HPA-1a2a3b (OR 5.46, 95% CI 1.51-19.76, $P=0.011$), HPA-1b2a3a (OR 7.00, 95% CI 1.25-39.13, $P=0.028$), and HPA-1b2b3a (OR 11.39, 95% CI 1.39-92.95, $P=0.024$) haplotypes increased the risk for CSVT. HPA-3b allele was significantly associated with 2-fold lower risk for PAIS (OR 0.49, 95% CI 0.26-0.89, $P=0.020$) and CAIS (OR 0.47, 95% CI 0.26-0.86, $P=0.014$) and non-significantly associated with increased risk for CSVT (OR 6.43, 95% CI 0.83-50.00, $P=0.022$). HPA-1a2b3a haplotype was significantly associated with CAIS (OR 6.76, 95% CI 2.13-21.44, $P=0.001$). The inclusion of *FV* R506Q in *SELP* haplotype analysis increased the risk for PAIS 4-fold in QNDVT carriers (OR 8.14, 95% CI 0.93-71.33, $P=0.060$) compared with NDVT haplotype (OR 2.45, 95% CI 0.98-6.18, $P=0.058$), but the result was not significant.

Conclusion Individual HPAs, and particularly HPA haplotypes, are involved in IPS subtypes pathogenesis. A possible risk-inducing synergistic effect of *SELP* haplotypes with *FV* R506Q is restricted to PAIS only.

Received: August 28, 2019

Accepted: January 10, 2020

Correspondence to:
Renata Zadro
University Hospital Centre Zagreb
Department of Laboratory Diagnostics
Kišpatićeva 12
10000 Zagreb, Croatia
renata.zadro@mef.hr

Ischemic pediatric stroke (IPS) is a relatively rare heterogeneous multifactorial disorder caused by arterial (ie, arterial ischemic stroke, AIS) or venous occlusion (ie, cerebral sinovenous thrombosis, CSVT). According to the time of stroke onset, AIS is classified as perinatal (PAIS) and childhood AIS (CAIS) (1,2). IPS subtypes differ in incidence rates, etiology, presentation symptoms, and treatment strategies (2,3), and their predisposing disorders are still incompletely understood and characterized (4-6). Risk factors for IPS include various inherited and acquired prothrombotic disorders (2,4,5). However, the role of different genetic risk factors in the etiology of IPS subtypes has been studied in a limited number of publications, and studies including multiple genetic factors and haplotype analysis are extremely rare.

The most frequently investigated genetic risk factor is the polymorphism in factor V gene (*FV*) that causes amino acid change R506Q (FV Leiden, NM_000130.4:c.1601G>A, rs6025) and consequently activated protein C resistance and susceptibility to thrombosis (7). *FV* R506Q has been regularly associated with IPS, although in CSVT the association is weaker in children than in adults (4,8-10).

Platelets have a significant role in maintaining normal hemostasis. Changes in the structure of platelet membrane proteins can change platelet function and predisposition to thrombophilia. The effect of variations in platelet glycoprotein receptor genes and the P-selectin adhesion molecule on their role in IPS has not been established yet (11).

Human platelet antigens (HPA) are genetically defined polymorphisms expressed on platelet membrane glycoproteins. In three out of six biallelic systems, ie, HPA-1 (NM_000212.2:c.176T>C, rs5918) on glycoprotein IIIa, HPA-2 (NM_000173.5:c.482C>T, rs6065) on glycoprotein Ibα, and HPA-3 (NM_000419.3:c.2621T>G, rs5911) on glycoprotein IIb, a base-pair substitution leads to amino acid change in a platelet surface membrane glycoprotein. These biallelic systems modulate platelet receptor density, altering platelet function and thrombus formation (12-14). The role of HPAs in ischemic stroke has been recognized, but poorly investigated in adults (15-18) and particularly in children (9,19-21).

P-selectin mediates the interaction of activated endothelial cells or platelets with leukocytes (22,23). Multiple polymorphisms in P-selectin gene (*SELP*) have been described, but only five of them cause amino acid substitution that may influence its function: V168M (NM_003005.3:c.625G>A, rs6125), S290N (NM_003005.3:c.992G>A, rs6131), N562D (NM_003005.3:c.1807G>A, rs6127), V599L (NM_003005.3:c.1918G>T, rs6133), and T715P (NM_003005.3:c.2266A>C, rs6136) (24). *SELP* polymorphisms appear to be associated with several stages of thrombosis and associated diseases, including venous thromboembolism and atherothrombotic disease (25-27), cardiovascular disease, and myocardial infarction in adults (24,28-31). Although the relationship of different *SELP* polymorphisms to ischemic stroke in adults has been described (32-37), there are no reports regarding their role in IPS.

Since IPS subtypes have different pathophysiologic backgrounds, it is justified to investigate the relative relationship between thrombophilia polymorphisms and stroke subtypes. Therefore, the aim of this study was to assess the role of eight individual polymorphisms (*FV* R506Q, HPA-1, HPA-2, HPA-3, S*ELP* S290N, N562D, V599L, and T715P) and their haplotypes (HPA-1/-2/-3, S*ELP* S290N/N562D/V599L/T715P, and *FV* R506Q /S*ELP* S290N/N562D/V599L/T715P) in IPS subtypes: PAIS, CAIS, and CSVT.

PARTICIPANTS AND METHODS

Participants

This case-control study enrolled 150 children aged up to 18 years with a confirmed diagnosis of PAIS, CAIS, or CSVT and 150 age- and sex-matched controls from the same geographical region with no history of thromboembolic or neurological events and with normal C reactive protein levels. Controls were recruited among children undergoing minor surgery such as tonsillectomy and children with respiratory diseases at routine follow-up visits. All children were admitted to the University Hospital Centre Zagreb or Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia, from 1999 to 2018. The recruitment dynamics was five patients per year until 2004, with increasing tendency of seven to nine patients per year afterwards for AIS; one case of CSVT per year was recruited from 2008 to 2010 and three cases per year from 2013 to 2017.

The diagnosis was established after an extensive analysis of patients' medical history and physical and neurological examination; it was based on the presence of clinical symptoms and signs and confirmed by at least one brain imaging technique. Isolated computed tomography scans were used in selected cases only (N=9) during the first recruitment years. Magnetic resonance imaging was performed in 141 patients; in 72 to confirm computed tomography scan findings and in 69 patients, in the

later phase of research, as the only technique used. AIS was diagnosed based on the presence of neurological deficit of acute onset, seizures, or other signs of neonatal encephalopathy, and confirmed by neuroradiographic findings of parenchymal infarcts in cerebral arteries accordant with clinical manifestations. PAIS and CAIS were differentiated according to the definitions by Lynch (2).

CSVT was diagnosed after the neuroradiographic confirmation of a thrombus or flow interruption within cerebral veins or dural sinuses, together with clinical presentations of headache, seizure, lethargy, and focal or generalized neurologic deficit (38). Patients were included after a definite CSVT diagnosis by a neuroradiologist based on computed tomography as the first imaging exam for excluding a tumor, subdural hematoma, or abscess followed by magnetic resonance imaging combined with magnetic resonance angiography and venography as currently the best method for the confirmation of CSVT.

Written informed consent was obtained from all participants' parents and additionally from all children older than 12 years. The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee for Experimentation of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (251-62-03-14-95), Ethics Committee of the University Hospital Centre Zagreb (02/21/JG), and Ethics Committee of the Children's Hospital Zagreb (01-26/18-14).

Molecular analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes and used for molecular analysis (Table 1). *FV* R506Q and HPA-1 were genotyped with CVD StripAssay® T and CVD StripAssay® A (ViennaLab Diagnostics, Vienna, Austria), respectively. Both tests were performed according to manufacturer's instructions: each DNA sample was amplified in two parallel multiplex polymerase chain reactions (PCR) using biotin-labeled primers. Amplification products were selectively hybridized to a test strip containing allele-specific oligonucleotide probes immobilized as an array of parallel lines. Bound PCR fragments were detected using streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and color substrates. HPA-2 and HPA-3 were genotyped using previously described real-time PCR method based on TaqMan® technology on 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (39). Three positive controls representing different genotypes for each polymorphism were included in each run as a quality control step (40). Polymorphisms *SELP* S290N, V599L, and T715P were genotyped using PCR with specific primers followed by high res-

TABLE 1. Genotyping methods for eight individual polymorphisms*

Polymorphism	Method	Primer and minor groove binding probe sequences	Reference
FV R506Q	multiplex PCR using biotin labeled primers, hybridization to ASO probes	n.a.	–
HPA-1	multiplex PCR using biotin labeled primers, hybridization to ASO probes	n.a.	–
HPA-2	real-time PCR method based on TaqMan® technology	F: 5′-GAGCTCTACCTGAAAGGCAATGA-3′ R: 5′-TGTTGTTAGCCAGACTGAGCTTCT-3′ Pa: 5′-VIC-CTCCTGACGCCCACAC-NFQ-3′ Pb: 5′-FAM-CTCCTGATGCCCACAC-NFQ-3′	(39)
HPA-3	real-time PCR method based on TaqMan® technology	F: 5′-GCCTGACCACTCCTTTGCC-3′ R: 5′-TGCGATCCCGCTTGTGA-3′ Pa: 5′-VIC-CTGCCCATCCCCA-NFQ-3′ Pb: 5′-FAM-CTGCCCAGCCCCA-NFQ-3′	(39)
SELP S290N	PCR with specific primers followed by high resolution melting analysis	F: 5′-CCTTGGTTATTCTCTCCAGCTGTGC-3′ R: 5′-AGCCGGGCTGGCACTCAAAT-3′	(41)
SELP N562D	PCR with sequence specific primers	FN: 5′-CTCCACCTGYCATTTCTCTTGTA-3′ FD: 5′-CTCCACCTGYCATTTCTCTTGTG-3′ R: 5′-AAGTAGAACTGTCTTAGCAAGTAC-3′	(24)
SELP V599L	PCR with specific primers followed by high resolution melting analysis	F: 5′-TTGCAGGAGCCTCCCTTGTTATGAA-3′ R: 5′-GGTTCCCTGCCCAGGAGTGGT-3′	(41)
SELP T715P	PCR with specific primers followed by high resolution melting analysis	F: 5′-ATGAACTGCTCCAACCTCTG-3′ R: 5′-CCCACATGAAAATTGTACCTT-3′	(41)

*ASO – allele-specific oligonucleotide; n.a. – not applicable; FV – factor V gene; HPA – human platelet antigens; SELP- P – selectin gene; PCR – polymerase chain reaction; NFQ – nonfluorescent quencher.

olution melting analysis on the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and results were analyzed using LightCycler® 480 Software (version 1.5; Roche Diagnostics) (41). Control samples of each genotype previously confirmed by sequencing were used as positive controls (24). *SELP* N562D was genotyped using the previously described PCR with sequence specific primers on the Applied Biosystems GeneAmp 2720 Thermal Cycler (24).

Statistical analysis

Normality of distribution was tested with the Shapiro-Wilk test (MedCalc software package version 9.3.2.0, Frank Schoonjans, the Netherlands). Continuous variables are expressed as medians and ranges. Descriptive analysis, Hardy-Weinberg equilibrium testing, and association analysis were performed with SNPStats (Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain) (42,43), a web-based tool for the analysis of association studies that analyzes single SNPs by multiple inheritance models and multiple SNPs (haplotype analysis) based on logistic regression. The obtained genotyping results of *FV* R506Q, *SELP* polymorphisms, and HPAs, *SELP* S290N/N562D/V599L/T715P, *FV* R506Q/*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P, and HPA-1/-2/-3 haplotypes are expressed as frequencies. Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each individual polymorphism in patients and controls. The most common combined genotypes were used as reference haplotypes in the analysis of haplotype association with disease. Associations of each individual polymorphism and haplotype with the disease risk were expressed as odds ratios (OR) with corresponding 95%

TABLE 2. Characteristics of patients with ischemic stroke and the control group*

Group	Number of participants	Male to female ratio	Age at diagnosis in years, median (range)	Age at testing in years, median (range)
IPS	150	1.54	1.9 (0.0-18.0)	4.6 (0.0-18.0)
AIS	132	1.59	1.9 (0.0-18.0)	5.9 (0.0-18.0)
PAIS	66	1.36	0.3 (0.0-12.0)	2.7 (0.0-18.0)
CAIS	66	1.87	6.8 (0.4-18.0)	7.9 (0.4-18.0)
CSVT	18	1.25	1.4 (0.0-12.8)	2.0 (0.0-15.4)
Control group	150	1.54	–	7.0 (0.0-18.0)

*Dash – not applicable; IPS – ischemic pediatric stroke; AIS – arterial ischemic stroke; PAIS – perinatal arterial ischemic stroke; CAIS – childhood arterial ischemic stroke; CSVT – cerebral sinovenous thrombosis.

TABLE 3. Individual polymorphisms in patients with ischemic pediatric stroke and its subtypes, and in the control group*

Polymorphism name	Patient group	Genotype	Genotype distribution in patient group, frequency	Genotype distribution in control group, frequency	OR (95% CI)	*P*
FV R506Q	PAIS	GG	0.879	0.967	4.00 (1.26-12.74)	0.017
		GA	0.121	0.033		
HPA-1	CSVT	aa	0.500	0.733	2.75 (1.02-7.42)	0.048
		ab	0.500	0.247		
		bb	0.000	0.020		
HPA-3	IPS	aa	0.411	0.287	0.58 (0.36-0.93)	0.025
		ab	0.411	0.507		
		bb	0.178	0.207		
	AIS	aa	0.457	0.287	0.48 (0.29-0.78)	0.003
		ab	0.388	0.507		
		bb	0.155	0.207		
	PAIS	aa	0.453	0.287	0.49 (0.26-0.89)	0.020
		ab	0.344	0.507		
		bb	0.203	0.207		
	CAIS	aa	0.461	0.287	0.47 (0.26-0.86)	0.014
		ab	0.431	0.507		
		bb	0.108	0.207		

*OR – odds ratio; CI – confidence intervals; IPS – ischemic pediatric stroke; *FV* – factor V gene; AIS – arterial ischemic stroke; PAIS – perinatal arterial ischemic stroke; HPA – human platelet antigen; CSVT – cerebral sinovenous thrombosis; CAIS – childhood arterial ischemic stroke.

confidence intervals (CI) by using a dominant model (a homozygous or heterozygous variant in comparison with the homozygous wild-type). A P value of <0.050 was considered significant.

RESULTS

All IPS subtypes were more prevalent in boys (Table 2). Genotype distributions of all investigated individual polymorphisms, both in cases and controls, were in Hardy-Weinberg equilibrium (results not shown), except HPA-3 polymorphism in children with PAIS ($P=0.035$).

Among the examined individual polymorphisms, IPS was associated with only three polymorphisms: *FV* R506Q, HPA-1, and HPA-3 (Table 3). PAIS was significantly associated with *FV R506Q*; *FV R506Q* carriers had 4-fold increased risk for PAIS. Carriers of at least one HPA-1b allele

TABLE 4. Human platelet antigen HPA-1/-2/-3 haplotype frequencies in patients with ischemic pediatric stroke and its subtypes, and the control group

Group	HPA-1/-2/-3 haplotype	Haplotype frequency	OR (95% CI)	*P*
IPS	HPA-1a2a3a	0.429	1.00 (Ref.)	Ref.
AIS		0.446	1.00 (Ref.)	Ref.
PAIS		0.485	1.00 (Ref.)	Ref.
CAIS		0.429	1.00 (Ref.)	Ref.
CSVT		0.138	1.00 (Ref.)	Ref.
Control group		0.433	–	–
IPS	HPA-1a2a3b	0.301	0.89 (0.59-1.34)	0.570
AIS		0.285	0.79 (0.51-1.21)	0.270
PAIS		0.323	0.86 (0.52-1.41)	0.540
CAIS		0.250	0.70 (0.39-1.24)	0.220
CSVT		0.542	5.46 (1.51-19.76)	0.011
Control group		0.351	–	–
IPS	HPA-1b2a3a	0.078	1.45 (0.64-3.27)	0.370
AIS		0.079	1.32 (0.59-2.94)	0.500
PAIS		0.071	1.10 (0.43-2.79)	0.850
CAIS		0.086	1.54 (0.60-3.94)	0.370
CSVT		0.137	7.00 (1.25-39.13)	0.028
Control group		0.056	–	–
IPS	HPA-1b2a3b	0.073	1.06 (0.52-2.18)	0.870
AIS		0.064	0.91 (0.43-1.92)	0.810
PAIS		0.052	0.74 (0.28-1.95)	0.550
CAIS		0.074	1.10 (0.44-2.75)	0.840
CSVT		0.044	3.17 (0.39-25.93)	0.280
Control group		0.060	–	–
IPS	HPA-1a2b3a	0.094	3.97 (1.29-12.17)	0.016
AIS		0.104	4.46 (1.49-13.37)	0.008
PAIS		0.056	2.15 (0.58-8.02)	0.250
CAIS		0.147	6.76 (2.13-21.44)	0.001
CSVT		0.016	4.19 (0.11-154.50)	0.440
Control group		0.023	–	–
IPS	HPA-1b2b3a	0.016	0.57 (0.11-2.99)	0.510
AIS		0.013	0.37 (0.05-2.58)	0.320
PAIS		0.014	0.45 (0.05-3.73)	0.460
CAIS		0.015	0.42 (0.04-3.99)	0.450
CSVT		0.068	11.39 (1.39-92.95)	0.024
Control group		0.027	–	–

*Dash – not applicable; Ref. – reference haplotype; HPA – human platelet antigen; OR – odds ratio; CI – confidence intervals; IPS – ischemic pediatric stroke; AIS – arterial ischemic stroke; PAIS – perinatal arterial ischemic stroke; CAIS – childhood arterial ischemic stroke; CSVT – cerebral sinovenous thrombosis.

TABLE 5. *SELP* S290N/N562D/V599L/T715P and *FV* R506Q/*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotype frequencies in patients with ischemic pediatric stroke and its subtypes, and the control group*

Group	*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotype	Haplotype frequency	OR (95% CI)	*P*	*FV* R506Q/*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotype	Haplotype frequency	OR (95% CI)	*P*
IPS	SDVT	0.396	1.00 (Ref.)	Ref.	RSDVT	0.405	1.00 (Ref.)	Ref.
AIS		0.387	1.00 (Ref.)	Ref.		0.397	1.00 (Ref.)	Ref.
PAIS		0.413	1.00 (Ref.)	Ref.		0.419	1.00 (Ref.)	Ref.
CAIS		0.381	1.00 (Ref.)	Ref.		0.386	1.00 (Ref.)	Ref.
CSVT		0.445	1.00 (Ref.)	Ref.		0.448	1.00 (Ref.)	Ref.
Control group		0.405	–	–		0.393	–	–
IPS	SNVT	0.267	1.18 (0.74-1.87)	0.490	RSNVT	0.259	1.18 (0.73-1.89)	0.500
AIS		0.271	1.19 (0.74-1.93)	0.460		0.267	1.20 (0.74-1.95)	0.450
PAIS		0.266	1.18 (0.65-2.12)	0.590		0.259	1.19 (0.66-2.16)	0.570
CAIS		0.271	1.19 (0.66-2.14)	0.560		0.270	1.16 (0.64-2.09)	0.620
CSVT		0.249	0.96 (0.36-2.53)	0.930		0.219	0.82 (0.30-2.28)	0.700
Control group		0.240	–	–		0.240	–	–
IPS	NDVT	0.100	1.86 (0.83-4.17)	0.130	RNDVT	0.065	1.47 (0.61-3.52)	0.390
AIS		0.115	2.10 (0.93-4.75)	0.076		0.074	1.64 (0.67-4.01)	0.280
PAIS		0.108	2.45 (0.98-6.18)	0.058		0.061	1.89 (0.67-5.38)	0.230
CAIS		0.102	1.84 (0.68-5.00)	0.230		0.079	1.48 (0.51-4.30)	0.470
CSVT		0.041	0.48 (0.05-4.22)	0.510		0.040	0.47 (0.05-4.16)	0.500
Control group		0.070	–	–		0.067	–	–
IPS	NNVT	0.073	0.57 (0.28-1.17)	0.130	RNNVT	0.068	0.53 (0.25-1.13)	0.100
AIS		0.058	0.48 (0.22-1.05)	0.068		0.051	0.44 (0.19-1.00)	0.051
PAIS		0.063	0.48 (0.18-1.26)	0.140		0.049	0.40 (0.14-1.18)	0.098
CAIS		0.057	0.45 (0.15-1.36)	0.160		0.057	0.47 (0.16-1.39)	0.170
CSVT		0.154	1.45 (0.44-4.77)	0.540		0.155	1.44 (0.43-4.78)	0.550
Control group		0.108	–	–		0.109	–	–
IPS	SNVP	0.077	1.07 (0.57-2.01)	0.840	RSNVP	0.069	1.08 (0.58-2.04)	0.800
AIS		0.086	1.17 (0.61-2.24)	0.630		0.076	1.20 (0.63-2.29)	0.580
PAIS		0.032	0.70 (0.28-1.76)	0.450		0.028	0.76 (0.30-1.90)	0.550
CAIS		0.121	1.66 (0.80-3.48)	0.180		0.121	1.62 (0.77-3.40)	0.200
CSVT		0.008	0.37 (0.05-2.88)	0.340		0.007	0.37 (0.05-2.85)	0.340
Control group		0.077	–	–		0.077	–	–
IPS	SNLT	0.074	1.13 (0.52-2.44)	0.750	RSNLT	0.075	1.04 (0.48-2.21)	0.930
AIS		0.077	1.22 (0.56-2.68)	0.620		0.078	1.12 (0.52-2.45)	0.770
PAIS		0.087	1.44 (0.57-3.69)	0.440		0.088	1.32 (0.52-3.37)	0.560
CAIS		0.068	1.05 (0.40-2.74)	0.930		0.064	0.89 (0.33-2.42)	0.820
CSVT		0.056	0.81 (0.14-4.55)	0.810		0.056	0.79 (0.14-4.44)	0.790
Control group		0.066	–	–		0.066	–	–

*Dash – not applicable; Ref. – reference haplotype; *FV* – factor V gene; *SELP* – P-selectin gene; OR – odds ratio; CI – confidence intervals; IPS – ischemic pediatric stroke; AIS – arterial ischemic stroke; PAIS – perinatal arterial ischemic stroke; CAIS – childhood arterial ischemic stroke; CSVT – cerebral sinovenous thrombosis.

had a 2.75-fold increased risk for CSVT, while carriers of at least one HPA-3b allele had an approximately 2-fold lower risk for IPS and AIS, including both PAIS and CAIS. Carriers of HPA-3b allele (OR 6.43, 95% CI 0.83-50.00, $P=0.022$; data not shown) had an increased risk for CSVT, but the result was not significant. However, additive model revealed a 2.23-fold increased risk for CSVT (95% CI 1.04-4.80, $P=0.034$).

Carriers of HPA-1a2b3a had a 4-fold increased risk for IPS and AIS, and 7-fold for CAIS. Interestingly, three different HPA-1/-2/-3 haplotypes showed a significant association with CSVT, resulting in five- to 11-fold increased risk: HPA-1a2a3b, HPA-1-b2a3a, and HPA-1b2b3a. Haplotype HPA-1a2b3b was found in children with CSVT (0.054) and control group (0.050) only, but the result was not significant (OR 2.70, 95% CI 0.32-22.46, $P=0.360$; data not shown) (Table 4).

Six *SELP* S290N/N562D/V599L/T715P and of *FV* R506Q /*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotypes were identified in all study groups. Although haplotype NDVT was more frequent in children with AIS and PAIS and least frequent in CAIS and AIS compared with control group, the result was not significant. Three rare haplotypes, NNLT, RNNLT, and QNDVT, were identified in AIS and controls only (results not shown). Haplotype QNDVT was more common in patients with PAIS than in control group (0.040 vs 0.002), but the result was not significant (OR 8.14, 95% CI 0.93-71.33, $P = 0.060$) (Table 5).

DISCUSSION

This study demonstrated that various HPA genotypes and haplotypes were associated with IPS subtypes in a sample from Croatian child population and corroborated the hypothesis that different IPS subtypes did not share the same genetic risk factors.

The present study revealed an almost 3-fold increased risk for pediatric CSVT in carriers of at least one HPA-1b allele. This makes it the first study to our knowledge that found a positive association of HPA-1 and pediatric CSVT. The only study that investigated HPA-1 in pediatric CSVT to date reported more frequent HPA-1b allele-containing genotypes in CSVT than in both AIS and control group, but the results were not significant (20).

Consistent with previous findings on a moderate protective effect of HPA-3b allele for AIS and PAIS in Croatian population (9), the present study reported a 2-fold lower risk for IPS and CAIS, with the *post-hoc* calculated power of 0.51 for PAIS, 0.54 for CAIS, 0.59 for IPS, and 0.82 for AIS with a significance level of 0.050. On the contrary to this, we identified an unexpectedly high harmful effect of HPA-3b allele in CSVT, as opposed to its protective effect in AIS, but these findings did not reach significance. Although the sample size for CSVT is small, the polymorphism frequency is high. *Post-hoc* power analysis revealed the power of 0.44, meaning that additional 25 participants are needed to obtain the optimal power of 0.80.

HPA-1 and HPA-3 are both present on the most abundant glycoprotein IIb/IIIa complex, which, by binding fibrinogen, is essential for platelet aggregation and thrombus formation. Recently, Ichord has reported that major risk factors for CSVT are acute head and neck infections as well as acute systemic illness (44), a conclusion similar to that reached in our study. As acute illness is linked to higher fibrinogen level, enhanced platelet-fibrinogen interactions are possible, leading to the formation of clots that are more stable and resistant to lysis.

A further analysis of HPA-1/-2/-3 haplotypes demonstrated for the first time that particular haplotypes were positively associated with both AIS and CSVT. Haplotype HPA-1a2b3a conferred an almost 7-fold increased risk for CAIS, but not for PAIS or CSVT, with a consequent increased risk for AIS and IPS. Moreover, compared with the effect of HPA-1 alone, two HPA-1b allele containing haplotypes, HPA-1b2a3a and HPA-1b2b3a, conferred a three- to 4-fold increased risk for CSVT, respectively, whereas HPA-1a2a3b haplotype conferred a slightly lower risk.

Studies on HPAs in IPS are rare, provide contradictory results, and include only HPA-1 in differently defined pediatric populations (19-21). Literature search revealed an association of four specific HPA-1/-2/-3/-4 haplotypes with adult ischemic stroke and HPA-1b/2b/3a haplotype with coronary arterial disease, but the results are not comparable to our study due to differences in studied populations and HPAs included in haplotype analysis (17,45).

Concordant with the majority of studies performed in adults (32-37), the present study found no association between individual *SELP* polymorphisms and any IPS subtype. The *post-hoc* power analysis revealed very low power for all individual *SELP* polymorphisms in IPS. Although no significant association between *SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotypes and adult ischemic stroke was identified in Caucasian population (34), the present study revealed an increased presence of the NDVT haplotype in children with AIS and PAIS, but not in children with CAIS and CSVT, pointing to its possible role in the etiology of PAIS only. The effect of NDVT haplotype may be explained by a previously reported association of *SELP* S290N/N562D/T715P haplotype NDT with increased soluble P-selectin plasma concentrations and the fact that *SELP* polymorphisms S290N and N562D are located within the *SELP* region important for the binding of P-selectins on leukocytes (26,46). As NNVT haplotype tends to decrease the risk for AIS, while NDVT haplotype tends to increase the risk for PAIS and AIS, it seems that N562D polymorphism is crucial for conferring the susceptibility to AIS.

The present study confirmed the association of *FV* R506Q with PAIS, which was previously established in a smaller study (8,46). Since the presence of multiple risk factors can have a synergistic effect (47), additional *SELP* haplotype

analysis also included *FV* R506Q, an established risk factor for IPS, which is located in the close proximity. Although the statistical significance was still not achieved, the inclusion of *FV* R506Q increased the risk for PAIS 4-fold in QNDVT carriers, as compared with NDVT haplotype alone, indicating a possible synergistic effect of *SELP* haplotype and *FV* R506Q.

The strength of this study is the inclusion of all IPS subtypes, including CSVT, enabling differentiation of their specific etiologies based on simultaneous identification of both harmful and protective genotype combinations. Moreover, the inclusion of haplotype analysis proved to be superior to the testing of single polymorphisms. To our knowledge, this is the only study to date investigating a possible association of *SELP* polymorphisms and HPA-1/-2/-3, *SELP* S290N/N562D/V599L/T715P and *FV* R506Q/*SELP* S290N/N562D/V599L/T715P haplotypes with IPS.

The study limitations include the relatively small sample of children with IPS, as association studies usually require large cohorts to minimize possible statistical biases in conclusions and to strengthen the study power. Certainly, the results obtained for only 18 CSVT cases should be taken with caution, but nevertheless, they present the preliminary evidence of the enhanced risk-inducing effect of the HPA-1/-2/-3 haplotypes for CSVT. Considering the aforementioned and the variable geographical and ethnical distribution of HPA genotypes (48), we cannot claim that the associations presented in this study can be applied to different populations or that the effect is limited to the Croatian population only, warranting further research of platelet gene polymorphisms in IPS subtypes.

To evaluate genotype-phenotype associations, the present study used the candidate gene approach rather than genome-wide approach because of the lower cost and higher statistical power, especially if genes likely to play a role in the examined disease are formerly known, which is important for small-scale studies. Genome-wide association studies can reveal new genes or gene combinations even when their function was not previously known, but they usually require extensive funding and have low power due to the number of independent tests performed (49).

Our findings indicate that different IPS subtypes are characterized by specific sets of inherited thrombophilia risk factors and that there is a variable role of polymorphisms in the etiology of IPS subtypes. In the era of personalized medicine, it is crucial to better understand the clinical value and physiological implications of different genetic entities if we want to treat patients properly and reduce morbidity and mortality. We believe that future trials with sample sizes increased through international collaborations and extensive haplotype analysis would achieve a greater power to confirm the role of all the examined haplotypes in the etiology of IPS subtypes.

Funding part of the project "Genetic Polymorphisms and Ischemic Stroke in Children," funded by the Croatian Science Foundation (HRZZ IP-2014-09-2047)

Ethical approval given by the Ethics Committee for Experimentation of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (251-62-03-14-95), Ethics Committee of the University Hospital Centre Zagreb (02/21/JG), and Ethics Committee of the Children's Hospital Zagreb (01-26/18-14).

Declaration of authorship AČ, JLK, DCH, and RZ conceived and designed the study; AČ, JLK, MP, and NB acquired the data; AČ, DCH, MM, VĐ, and RZ analyzed and interpreted the data; AČ and RZ drafted the manuscript; all authors critically revised the manuscript for important intellectual content; all authors gave approval of the version to be submitted; all authors agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

References

1 Raju TNK, Nelson KB, Ferriero D, Lynch JK. Ischemic perinatal stroke: summary of a workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Pediatrics. 2007;120:609-16. Medline:17766535 doi:10.1542/peds.2007-0336

2 Lynch JK. Cerebrovascular disorders in children. Curr Neurol Neurosci Rep. 2004;4:129-38. Medline:14984685 doi:10.1007/s11910-004-0027-3

3 Tsze DS, Valente JH. Pediatric stroke: a review. Emerg Med Int. 2011;2011:1-10. Medline:22254140 doi:10.1155/2011/734506

4 Kenet G, Lütkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Circulation. 2010;121:1838-47. Medline:20385928 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.913673

5 Zadro R, Coen Herak D. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke. Biochem Med (Zagreb). 2012;22:298-310. Medline:23092062 doi:10.11613/BM.2012.033

6 Kirton A, DeVeber G. Paediatric stroke: pressing issues and promising directions. Lancet Neurol. 2015;14:92-102. Medline:25496900 doi:10.1016/S1474-4422(14)70227-3

7 Zöller B, Holm J, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C due to a factor V gene mutation. Trends Cardiovasc Med. 1996;6:45-53. Medline:21232274 doi:10.1016/1050-1738(95)00130-1

8 Capecchi M, Abbattista M, Martinelli I. Cerebral venous sinus thrombosis. J Thromb Haemost. 2018;16:1918-31. Medline:29923367 doi:10.1111/jth.14210

9 Coen Herak D, Lenicek Krleza J, Radic Antolic M, Horvat I, Djuranovic V, Zrinski Topic R, et al. Association of polymorphisms in coagulation factor genes and enzymes of homocysteine metabolism with arterial ischemic stroke in children. Clin Appl Thromb Hemost. 2017;23:1042-51. Medline:28301901 doi:10.1177/1076029616672584

10 Kirton A, Armstrong-Wells J, Chang T, DeVeber G, Rivkin MJ, Hernandez M, et al. Symptomatic neonatal arterial ischemic stroke: the International Pediatric Stroke Study. Pediatrics. 2011;128:e1402-10. Medline:22123886 doi:10.1542/peds.2011-1148

11 Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33:52-8. Medline:12853713 doi:10.1159/000071642

12 Wen Y, Chen D-P. Human platelet antigens in disease. Clin Chim Acta. 2018;484:87-90. Medline:29802830 doi:10.1016/j.cca.2018.05.009

13 Santoso S. Human platelet alloantigens. Transfus Apher Sci. 2003;28:227-36. Medline:12725948 doi:10.1016/S1473-0502(03)00040-5

14 Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106:93-102. Medline:24102564 doi:10.1111/vox.12085

15 Liu H, Wang Y, Zheng J, Li G, Chen T, Lei J, et al. Platelet glycoprotein gene Ia C807T, HPA-3, and Ibα VNTR polymorphisms are associated with increased ischemic stroke risk: evidence from a comprehensive meta-analysis. Int J Stroke. 2017;12:46-70. Medline:28004990 doi:10.1177/1747493016672085

16 Maguire JM, Thakkinstian A, Sturm J, Levi C, Lincz L, Parsons M, et al. Polymorphisms in platelet glycoprotein 1bα and factor VII and risk of ischemic stroke. Stroke. 2008;39:1710-6. Medline:18403734 doi:10.1161/STROKEAHA.107.507228

17 Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Polymorphisms of the human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-4 in ischemic stroke. Am J Hematol. 2008;83:570-3. Medline:18383324 doi:10.1002/ajh.21171

18 Duan H, Cai Y, Sun X. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism HPA-3 b/b is associated with increased risk of ischemic stroke in patients under 60 years of age. Med Sci Monit. 2012;18:19-24. Medline:22207115 doi:10.12659/MSM.882195

19 Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, et al. Prothrombotic polymorphisms, mutations, and their association with pediatric non-cardioembolic stroke in Asian-Indian patients. Ann Hematol. 2009;88:473-8. Medline:18836720 doi:10.1007/s00277-008-0613-6

20 Miller SP, Wu YW, Lee J, Lammer EJ, Iovannisci DM, Glidden DV, et al. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls. Stroke. 2006;37:2678-83. Medline:17008620 doi:10.1161/01.STR.0000244810.91105.c9

21 Komitopoulou A, Platokouki H, Kapsimali Z, Pergantou H, Adamtziki E, Aronis S. Mutations and polymorphisms in genes affecting hemostasis proteins and homocysteine metabolism in children with arterial ischemic stroke. Cerebrovasc Dis. 2006;22:13-20. Medline:16567932 doi:10.1159/000092332

22 Andre P. P-selectin in haemostasis. Br J Haematol. 2004;126:298-306. Medline:15257701 doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05032.x

23 McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. Cardiovasc Res. 2015;107:331-9. Medline:25994174 doi:10.1093/cvr/cvv154

24 Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Klüter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. Clin Chem Lab Med. 2004;42:997-1004. Medline:15497463 doi:10.1515/CCLM.2004.202

25 Kappelmayer J, Nagy B. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. BioMed Res Int. 2017;2017:1-18. Medline:28680883 doi:10.1155/2017/6138145

26 Ay C, Jungbauer LV, Kaider A, Koder S, Panzer S, Pabinger I, et al. P-selectin gene haplotypes modulate soluble P-selectin concentrations and contribute to the risk of venous thromboembolism. Thromb Haemost. 2008;99:899-904. Medline:18449419 doi:10.1160/TH07-11-0672

27 Alpay N, Hançer VS, Erer B, İnanç M, Diz Küçükkaya R. The relationship between P-selectin polymorphisms and thrombosis in antiphospholipid syndrome: a pilot case-control study. Turk J Haematol. 2014;31:357-62. Medline:25541651 doi:10.4274/tjh.2013.0091

28 Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J, et al. Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and women in the ECTIM extension study. Heart. 2000;84:548-52. Medline:11040019 doi:10.1136/heart.84.5.548

29 Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. Hum Mol Genet. 1998;7:1277-84. Medline:9668170 doi:10.1093/hmg/7.8.1277

30 Reiner AP, Carlson CS, Thyagarajan B, Rieder MJ, Polak JF, Siscovick DS, et al. Soluble P-selectin, SELP polymorphisms, and atherosclerotic risk in European-American and African-African young adults the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:1549-55. Medline:18535285 doi:10.1161/ATVBAHA.108.169532

31 Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. J Thromb Haemost. 2003;1:1718-23. Medline:12911583

doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00312.x

32 Zee RYL, Cook NR, Cheng S, Reynolds R, Erlich HA, Lindpaintner K, et al. Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. Hum Mol Genet. 2003;13:389-96. Medline:14681304 doi:10.1093/hmg/ddh039

33 Wei Y-S, Lan Y, Huang R-Y, Liu Y-G, Tang R-G, Xu Q-Q, et al. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the P-selectin gene with ischemic stroke. J Thromb Thrombolysis. 2009;27:75-81. Medline:18034324 doi:10.1007/s11239-007-0168-8

34 Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Atherosclerosis. 2007;195:e76-82. Medline:17420019 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.007

35 Ferrari J, Rieger S, Endler G, Greisenegger S, Funk M, Scholze T, et al. The Thr715Pro polymorphism of the P-selectin gene is not associated with ischemic stroke risk. Stroke. 2007;38:395-7. Medline:17204688 doi:10.1161/01.STR.0000254475.43533.dd

36 Tao L, Changfu W, Linyun L, Bing M, Xiaohui H. Correlations of platelet-leukocyte aggregates with P-selectin S290N and P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I genetic polymorphisms in patients with acute ischemic stroke. J Neurol Sci. 2016;367:95-100. Medline:27423570 doi:10.1016/j.jns.2016.05.046

37 Schmalbach B, Stepanow O, Jochens A, Riedel C, Deuschl G, Kuhlenbäumer G. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. Cerebrovasc Dis. 2015;39:176-80. Medline:25720421 doi:10.1159/000375396

38 Sébire G, Fullerton H, Riou E, DeVeber G. Toward the definition of cerebral arteriopathies of childhood. Curr Opin Pediatr. 2004;16:617-22. Medline:15548922 doi:10.1097/01.mop.0000144441.29899.20

39 Ficko T, Galvani V, Rupreht R, Dovc T, Rozman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. Transfus Med. 2004;14:425-32. Medline:15569237 doi:10.1111/j.1365-3148.2004.00538.x

40 Bein G, Hackstein H, Klüter H. DNA typing of human platelet antigen systems 1, 2, 3 and 5 in B-lymphoblastoid cell lines of the International Histocompatibility Workshop. Tissue Antigens. 1997;49:443-7. Medline:9174135 doi:10.1111/j.1399-0039.1997.tb02777.x

41 Ceri A, Pavic M, Horvat I, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. J Clin Lab Anal. 2019;33:e22698. Medline:30350887 doi:10.1002/jcla.22698

42 Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006;22:1928-9. Medline:16720584 doi:10.1093/bioinformatics/btl268

43 Institut Catalŕ D'Oncologia. SNPStats: your web tool for SNP analysis. 2006. Available from: https://www.snpstats.net/start.htm. Accessed: January 21, 2020.

44 Ichord R. Cerebral sinovenous thrombosis. Front Pediatr. 2017;5:163. Medline:28798906 doi:10.3389/fped.2017.00163

45 Abboud N, Ghazouani L, Ben-Hadj-Khalifa S, Anabi F, Added F, Khalfallah A, et al. Human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, and HPA-3 polymorphisms associated with extent of severe coronary artery disease. J Thromb Thrombolysis. 2010;29:409-15. Medline:19562259 doi:10.1007/s11239-009-0368-5

46 Ruchaud-Sparagano M-H, Malaud E, Gayet O, Chignier E, Buckland R, McGregor JL. Mapping the epitope of a functional P-selectin monoclonal antibody (LYP20) to a short complement-like repeat (SCR 4) domain: use of human-mouse chimaera and homologue-replacement mutagenesis. Biochem J. 1998;332:309-14. Medline:9601057 doi:10.1042/bj3320309

47 Mackay MT, Wiznitzer M, Benedict SL, Lee KJ, DeVeber GA, Ganesan V. Arterial ischemic stroke risk factors: The international pediatric stroke study. Ann Neurol. 2011;69:130-40. Medline:21280083 doi:10.1002/ana.22224

48 Pavic M, Zadro R, Coen Herak D, Radic Antolic M, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. Transfus Med. 2010;20:73-7. Medline:19778317 doi:10.1111/j.1365-3148.2009.00971.x

49 Amos W, Driscoll E, Hoffman JI. Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to infectious disease? Proc Biol Sci. 2011;278:1183-8. Medline:20926441 doi:10.1098/rspb.2010.1920

9. ŽIVOTOPIS

Andrea Čeri je rođena 1989. godine u Mostaru, Bosna i Hercegovina. Završetkom XV. gimnazije u Zagrebu, upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (FBF SuZ) kojeg završava 2013. godine. Pripravnički staž obavlja 2014. – 2015. godine u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te polaže stručni ispit za magistre medicinske biokemije. Poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ upisuje 2015. godine. Od 2016. godine je zaposlena na suradničkom radnom mjestu asistentice na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju FBF SuZ. Suradnica je u izvođenju nastave vježbi iz predmeta „Biokemija“, „Klinička biokemija s hematologijom“, „Farmakogenetika“, „Opća klinička biokemija“, „Molekularna dijagnostika“ i „Klinička biokemija organa i organskih sustava 2“ na integriranim preddiplomskim i diplomskim studijima farmacije i medicinske biokemije. Od 2018. godine sudjeluje u izvođenju vježbi iz predmeta „Načela i metode molekularne dijagnostike“ u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija „Medicinska biokemija i laboratorijska medicina“.

Suradnica je na projektima Hrvatske zaklade za znanost „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ (IP-2014-09-2047, voditeljica prof. dr. sc. Renata Zadro) i „Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije“ (IP-2019-04-4624, voditeljica prof. dr. sc. Karmela Barišić), a tijekom 2016. i 2017. godine je sudjelovala i na projektu „Uloga stresnog proteina Hsp70 u imunosno-upalnom odgovoru kod kronične opstrukcijske plućne bolesti“ (IP-2014-09-1247, voditeljica prof. dr. sc. Lada Rumora). Sudjeluje i u Erasmus+ projektu „PROMISE – Personalized Medicine Inquiry-Based Education“ (2019-1-HR01-KA203-061010).

Kao autor ili koautor objavila je sedam znanstvenih radova i 23 kongresnih priopćenja.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Popis radova:

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents:

1. Hulina-Tomašković A, Rajković MG, Somborac-Bačura A, **Čeri A**, Dabelić S, Rumora L. Extracellular Hsp70 modulates the inflammatory response of cigarette smoke extract in NCI-H292 cells. Exp Physiol. 2018;103(12):1704-1716.
2. **Ceri A**, Pavic M, Horvat I, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. J Clin Lab Anal. 2019;33:e22698.
3. **Čeri A**, Leniček Krleža J, Coen Herak D, Miloš M, Pavić M, Barišić N, Đuranović V, Zadro R. Role of platelet gene polymorphisms in ischemic pediatric stroke subtypes: a case-control study. Croat Med J. 2020;61(1):18-27.
4. Verbanac D, **Čeri A**, Hlapčić I, Shakibaei M, Brockmueller A, Krušlin B, Ljubičić N, Baršić N, Detel D, Batičić L, Rumora L, Somborac-Bačura A, Štefanović M, Ćelap I, Demirović A, Petlevski R, Petrik J, Grdić Rajković M, Hulina-Tomašković A, Rako I, Saso L, Barišić K. Profiling colorectal cancer in the landscape personalized testing – advantages of liquid biopsy. Int J Mol Sci. 2021;22(9):4327.
5. Hlapčić I, Grdić Rajković M, **Čeri A**, Dabelić S, Popović-Grle S, Radić Antolic M, Knežević J, Försti A, Rumora L. Increased *HSP70* and *TLR2* gene expression and association of *HSP70* rs6457452 single nucleotide polymorphism with the risk of chronic obstructive pulmonary disease in the Croatian population. Diagnostics. 2021;11(8):1412.
6. Markelić I, Hlapčić I, **Čeri A**, Radić Antolic M, Samaržija M, Popović-Grle S, Vukić Dugac A, Rumora L. Activation of NLRP3 inflammasome in stable chronic obstructive pulmonary disease. Sci Rep. 2022;12(1):7544.

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u bazi Scopus:

1. Pavic M, Herak DC, Antolic MR, **Ceri A**, Krleza JL, Topic RZ, et al. Allele and haplotype frequencies of P-selectin gene in Croatian population and review of literature. Human Gene 2022;33:201056.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

POLIMORFIZMI U GENIMA ZA ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE, GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE I INTERMEDIJARNE RIZIČNE ČIMBENIKE U DJECE S ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM

Andrea Čeri

SAŽETAK

Ishemijski moždani udar (IMU) u djece je relativno rijedak poremećaj miješane etiologije koja je nerazjašnjena u približno 30 % slučajeva. Protrombotički poremećaji prepoznati su kao rizični čimbenik za nastanak IMU-a u djece, ali su potencijalne pozadinske genske varijacije analizirane u oskudnom broju studija u specifičnim populacijama ili u odraslih, dok u djece rijetko ili uopće nisu analizirane. Kako se povezanost protrombotičkih polimorfizama s IMU-om može razlikovati ovisno o geografskoj i etničkoj pripadnosti ispitivane populacije, a poznato je dodatno povećanje rizika u prisutnosti više od jednoga protrombotičkog rizičnog čimbenika, cilj ovoga istraživanja jest ispitati povezanost pojedinačnih polimorfizama u genima za čimbenike zgrušavanja, glikoproteinima trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike te potencijal zajedničke povezanosti s pojavom IMU-a u djece u Hrvatskoj ovisno o tipu, dobi nastanka i lokalizaciji IMU-a. Genotipizacija 21 polimorfizma u 13 gena kandidata provedena je iz uzorka DNA leukocita dobivenih nakon prikupljanja uzoraka ostatne periferne krvi od 185 djece starosne dobi do 18 godina s potvrđenom dijagnozom arterijskog IMU-a ili tromboze venskih sinusa mozga (CSVT) i 185 zdrave djece podudarne po dobi i spolu djeci s IMU-om. Dobiveni rezultati potvrdili su veću zastupljenost dječaka u svim podtipovima bolesti, osim perinatalnog arterijskog IMU-a i CSVT-a te različite genetičke čimbenike za karakterizaciju različitih podtipova IMU-a u djece. Na temelju dobivenih rezultata predložen je i algoritam ispitanih genetičkih čimbenika za IMU u djece za razlikovanje rizika nastanka podtipova bolesti te je uspostavljena baza podataka djece s IMU-om u Hrvatskoj. Rezultati predloženog istraživanja proširili su dosadašnja saznanja o potencijalnoj ulozi ispitanih genskih varijacija u etiologiji IMU-a u djece u Hrvatskoj, ali i u općoj populaciji.

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

Rad sadrži:	203 stranice, 18 slika, 42 tablice i 256 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	djeca, ishemijski moždani udar, tromboza venskih sinusa mozga, trombofilija, genske varijacije, polimorfizmi, čimbenici zgrušavanja, čimbenici fibrinolize, glikoproteini trombocitne membrane, intermedijarni rizični čimbenici
Mentor:	dr. sc. Renata Zadro, red. prof. u trajnom zvanju
Ocjenjivači:	dr. sc. Karmela Barišić, red. prof. u trajnom zvanju dr. sc. Vida Demarin, akademkinja Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti dr. sc. Ivana Ćelap, nasl. doc.

Rad je prihvaćen: 28. 11. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

POLYMORPHISMS OF GENES FOR COAGULATION AND FIBRINOLYSIS FACTORS, PLATELET MEMBRANE GLYCOPROTEINS AND INTERMEDIATE RISK FACTORS IN CHILDREN WITH ISCHEMIC STROKE

Andrea Čeri

SUMMARY

Ischemic paediattric stroke (IPS) is a relatively rare disorder of mixed aetiology that is unexplained in approximately 30% of cases. Prothrombotic disorders are recognized as a risk factor for the development of IPS, but potential genetic variations in prothrombotic risk factors have been analysed in a limited number of studies in specific populations or in adults, while in children they have been scarcely analysed or they have not been analysed at all. As the association of prothrombotic polymorphisms with IPS can differ depending on the geographic and ethnic categorisation of the population studied, and an additional increased risk is known in the presence of more than one prothrombotic risk factor, the aim of this study is to examine the association of individual polymorphisms in the genes coding clotting factors, platelet membrane glycoproteins and intermediate risk factors, and the potential of their joint association with the occurrence of IPS in children in Croatia depending on the type of IPS, age of onset and localization of the lesion. Genotyping of 21 polymorphisms in 13 candidate genes was performed in a DNA samples obtained from leukocytes after collecting residual peripheral blood samples from 185 children aged up to 18 years with confirmed diagnosis of arterial IPS (AIS) or cerebral venous sinus thrombosis (CSVT) and 185 healthy children matched by age and gender to children with IPS. Obtained results confirmed a higher frequency of AIS in boys and other subtypes, but not in perinatal AIS and CSVT. Also, it has been proven that different subtypes of IPS are caracterised by different genetic factors. Based on the obtained results, an algorithm of tested genetic risk factors for IPS was proposed to distinguish the risk of subtypes of the disease, which established a database of children with IPS in Croatia. The results of the proposed research expanded the previous knowledge about the potential role of the examined genetic variations in the aetiology of IPS in Croatia, with translational potential to the adult population.

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

Thesis includes:	203 pages, 18 figures, 42 tables and 256 references. Original is in Croatian language.
Keywords:	children, paediatric ischemic stroke, cerebral sinovenous thrombosis, thrombophilia, genetic polymorphisms, coagulation factors, fibrinolysis factors, platelet membrane glycoproteins, intermediate risk factors
Mentor:	Renata Zadro, PhD, Full Professor with Tenure
Reviewers:	Karmela Barišić, PhD, Full Professor with Tenure Vida Demarin, PhD, Fellow of the Croatian Academy of Sciences and Arts Ivana Ćelap, PhD, Titular Assistant Professor

The thesis was accepted: November 28th, 2022