

# Polimorfizmi u genima za koagulacijske čimbenike i enzime metabolizma homocisteina u djece s moždanim udarom

---

Coen Herak, Desiree

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:163:402167>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DESIREE COEN HERAK

**POLIMORFIZMI U GENIMA ZA  
KOAGULACIJSKE ČIMBENIKE I ENZIME  
METABOLIZMA HOMOCISTEINA U  
DJECE S MOŽDANIM UDAROM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

DESIREE COEN HERAK

**POLYMORPHISMS IN COAGULATION  
FACTOR GENES AND ENZYMES OF  
HOMOCYSTEINE METABOLISM IN  
CHILDREN WITH STROKE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DESIREE COEN HERAK

**POLIMORFIZMI U GENIMA ZA  
KOAGULACIJSKE ČIMBENIKE I ENZIME  
METABOLIZMA HOMOCISTEINA U  
DJECE S MOŽDANIM UDAROM**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

DESIREE COEN HERAK

**POLYMORPHISMS IN COAGULATION  
FACTOR GENES AND ENZYMES OF  
HOMOCYSTEINE METABOLISM IN  
CHILDREN WITH STROKE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Renata Zadro, Ph.D., Professor

Zagreb, 2013

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za hematologiju i koagulaciju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr.sc. Renate Zadro, u okviru doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te većim dijelom u okviru projekta ”Protrombotički čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima u djece” Ministarstva znanosti obrazovanja i športa (broj projekta 214212, voditelj prof. dr.sc. Renata Zadro).

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Renati Zadro na nesebičnoj pomoći i savjetima pri izradi i pisanju rada.

Zahvaljujem svim svojim suradnicima koji su mi pomogli pri izradi ovog rada: dr. sc. Jasni Leniček Krleža pri prikupljanju uzoraka i podataka o ispitanicima, dr. sc. Vlasti Đuranović na pomoći pri prikupljanju ispitanika i kliničkih podataka, prof. dr. sc. Slavici Dodig i dr. sc. Renati Zrinski-Topić pri prikupljanju kontrolnih uzoraka, Margareti Radić Antolic, mag. med. biochem., i Ivani Horvat, mag. med. biochem., na savjetima i pomoći za molekularnu dijagnostiku, te zdravstvenoj tehničarki Marijani Jurak na pomoći pri izdvajanju uzoraka DNA.

Posebno zahvaljujem svojim kolegicama dr. sc. Mili Lovrić i dr. sc. Mariji Miloš na nesebičnoj pomoći i potpori tijekom izrade i pisanja rada.

Zahvaljujem svojem prvom učitelju dr. sc. Martinu Tinu Časlu, koji me je prvi uputio u znanstveni rad i usmjerio moj daljnji znanstveni razvoj.

Velika zahvala mojem suprugu koji je od samog početka bio uz mene i sudjelovao pri svakom trenutku izrade i pisanja ovog rada, te mojoj majci i cijeloj obitelji na razumijevanju, strpljenju i nesebičnoj podršci.

Ovaj rad posvećujem svojem nedavno preminulom papi Gastonu koji je cijeli svoj život snažno i s puno ljubavi utjecao na moj stručni i znanstveni rad.

## SAŽETAK

Moždani udar (MU) u djece relativno je rijetki heterogeni poremećaj s višestrukom etiologijom koja je još uvijek nepoznata u približno 30% slučajeva. S obzirom da genetički čimbenici nisu do kraja karakterizirani, a raspodjela gena kandidata za nastanak MU različita je u pojedinim populacijama, ciljevi istraživanja bili su utvrditi postojanje i učestalost dosad istraženih i nedovoljno istraženih pojedinačnih protrombotičkih i intermedijernih genetičkih rizičnih čimbenika u djece s potvrđenim MU, kao i njihovu eventualnu udruženost, te ispitati postoji li razlika u pojavnosti MU u djece s obzirom na spol i dobne skupine.

U istraživanje je bilo uključeno 100 djece (63 dječaka i 37 djevojčica) starosne dobi do 18 godina s potvrđenim MU i 100 zdrave djece podudarne po dobi i spolu djeci s MU, koja su predstavljala kontrolnu skupinu. Napravljena je genotipizacija 14 polimorfizama u 12 gena kandidata koji kodiraju proteine uključene u sustav zgrušavanja i fibrinolize (FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), ljudskih trombocitnih antigena (HPA-1, -2, -3 i -5), metabolizma homocisteina (MTHFR C677T, MTHFR A1298C) i intermedijernih rizičnih čimbenika (ACE I/D i ApoE  $\epsilon$ 2-4). Rezultati genotipizacije analizirani su i zasebno prema spolu u djece s MU i u podskupinama prema tipu MU: arterijski ishemijski MU (AIMU) i hemoragijski MU (HMU), te dobi pojave MU: perinatalni (PMU) i arterijski ishemijski MU u dječjoj dobi (DMU).

Dobiveni rezultati ukazuju na češću pojavu MU u dječaka koja je uočena i u svim ispitivanim podskupinama. Najveći rizik za nastanak MU utvrđen je u djece u prvoj godini života, s tim što su prema tipu MU prevladavali slučajevi AIMU (73%) u odnosu na HMU (27%). Rezultati genotipizacije ukazali su na prisutnost FV Leiden kao jedinog rizičnog čimbenika za nastanak MU u djece. Statistički značajna povezanost s AIMU dobivena je za FV Leiden (povećan rizik) i HPA-3 (smanjeni rizik), a s DMU u nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34. U dječaka s MU dokazana je povezanost s FXIII-A Val34Leu kao i povećani rizik za pojavu AIMU i DMU u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 i u djevojčica nosioca najmanje jednog alela apoE  $\epsilon$ 4. Utvrđena je jaka povezanost FV Leiden i PMU bez obzira na spol, te smanjeni rizik u djevojčica nosioca najmanje jednog alela HPA-3b. Dokazana je i povezanost kombinacije polimorfizama FV Leiden i FV HR2 i to dvostrukog heterozigotnog oblika s AIMU te kombinacije genotipova GA/AA s PMU, kao i kombinacije genotipova CC/AC polimorfizama MTHFR C677T i MTHFR A1298C u dječaka s AIMU. Povećani rizik za nastanak HMU dobiven je za haplotip HA2 (HPA-1a2a3a-ACED).



Ovo istraživanje ukazalo je na povezanost dosad nedovoljno istraženih polimorfizama kao i kombinacija polimorfizama s etiologijom MU u djece u Hrvatskoj, što upotpunjuje i proširuje dosadašnje spoznaje o etiološkim rizičnim čimbenicima.

**Ključne riječi:** moždani udar, djeca, genski polimorfizmi, koagulacijski čimbenici, metabolizam homocistein

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Stroke in children is a relatively rare and heterogeneous disorder with reported incidence ranging from 1.3 to 13.0/100.000 children per year. Despite extensive investigations and the identification of a wide range of inherited and acquired risk factors in recent years, the etiology of stroke is still undetermined in up to 30% of children. Taking into consideration that genetic risk factors are incompletely characterized at present and that the frequency of genetic factors may vary among different populations, the aim of this study was to investigate the possible role of individual inherited prothrombotic and intermediate risk factors in children with a confirmed diagnosis of stroke and to check the possible association of investigated risk factors with the disease.

**Materials and methods:** A genotype analysis of 14 polymorphisms in 12 candidate genes encoding proteins of the coagulation and fibrinolysis systems (FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), human platelet alloantigens (HPA-1, -2, -3 and -5), homocysteine metabolism (MTHFR C677T, MTHFR A1298C) and intermediate risk factors (ACE I/D and apoE  $\epsilon$ 2-4) was performed in 100 children with stroke (63 boys and 37 girls) aged  $\leq 18$  years and compared with 100 age- and sex-matched control subjects. Children with stroke were further classified into 2 subgroups defined according to the type of stroke: arterial ischemic stroke (AIS) comprising 73 children (48 boys and 25 girls) and hemorrhagic stroke (HS) comprising 27 children (15 boys and 12 girls). In children with AIS investigated polymorphisms were also analyzed in subgroups defined according to the time of stroke onset into perinatal (n=35, 20 boys and 15 girls) and childhood AIS (n=38, 28 boys and 10 girls). Moreover, genotype and allele frequencies of investigated polymorphisms obtained in gender-specific stroke group and subgroups were compared with frequencies obtained in control subjects.

**Results:** Stroke was identified more frequently in boys ( $P < 0.001$ ), as well as in all tested stroke subgroups although it was statistically significant only in AIS ( $P < 0.001$ ) and childhood AIS ( $P < 0.001$ ). The greatest risk for the development of stroke was found in the first year of life (younger than 1 year of life) and between 5-10 years. In children with stroke AIS was found 2.7 times more frequently (73/100) than HS (27/100). Among investigated polymorphisms only FV Leiden was identified as the risk factor for stroke (OR=4.00; 95 % CI=1.08-14.79). Even a stronger association was found between the presence of FV Leiden and AIS (OR=4.72; 95% CI=1.22-18.27), and perinatal AIS (OR=8.29; 95% CI=1.95-35.24).

The presence of at least one HPA-3b allele was associated with approximately 2-fold lower risk for the development of AIS (OR=0.51; 95% CI=0.26-0.98) and perinatal AIS (OR=0.40; 95% CI=0.18-0.92), whereas carriers of at least one FXIII-A Leu34 allele had a 2.21-fold increased risk for childhood AIS (95% CI=1.03-4.73). A statistically significant difference between genotype distributions was observed for FXIII-A Val34Leu in boys with stroke compared to boys from control group (P=0.005) resulting in a modest association of the presence of at least one FXIII-A Leu34 allele (OR=2.17; 95% CI=1.06-4.42). This association was confirmed in boys with AIS (OR=2.31; 95% CI=1.05-5.08) and childhood AIS (OR=3.33; 95% CI=1.28-8.70), but not in boys with perinatal AIS. Girls carrying at least one apoE ε4 allele were found to have a 4.32-fold (95% CI=1.04-17.92) increased risk for the development of AIS and a 5.5-fold (95% CI=1.07-28.25) increased risk for childhood AIS. The strongest association with OR>10.0 was found between FV Leiden and perinatal AIS for both genders (OR=10.94; 95% CI= 1.07-112.00 for boys, and OR=13.81; 95% CI=1.72-110.52 for girls), whereas the lowest risk for perinatal AIS was observed in girls who were carriers of at least one HPA-3b allele (OR=0.14; 95% CI=0.03-0.64). Combined heterozygosity for FV Leiden and FV HR2 was found in children with AIS only (P=0.012). Furthermore a 5.51-fold increased risk for perinatal AIS (95% CI=1.22-24.82) was observed in children with the genotype combination GA/AA. The genotype combination CC/AC for polymorphisms MTHFR C677T and MTHFR A1298C was found to cause a 4.71-fold increase in the risk for AIS in boys. Increased risk for HMO was found in carriers of the haplotype HA2 (HPA1a2a3a-ACED; OR=4.06; 95% CI= 1.03-15.98).

**Conclusions:** This case-control study has confirmed the association between FV Leiden and stroke that was also observed in numerous studies so far, but it has also shown that other previously not reported polymorphisms (FXIII-A Val34Leu, HPA-3) can be related to stroke subgroups in Croatian population, as well as the combination of FV Leiden and FV HR2 polymorphisms. Analysis performed in gender-specific stroke subgroups revealed the association of different polymorphisms in boys (FXIII-A Val34Leu, HPA-3 and combination of MTHFR polymorphisms) and girls (apoE ε4 allele). Obtained results has at least partially elucidated the impact of new investigated polymorphisms in the etiology of stroke in children and their impact depending on gender, type of stroke and time of stroke onset.

**Keywords:** pediatric stroke, children, genetic polymorphisms, coagulation factors, homocystein metabolism

## POPIS KRATICA

|       |                                                                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACE   | angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. <i>angiotensin converting enzyme</i> )                                        |
| AIMU  | arterijski ishemijski moždani udar                                                                                    |
| APC   | aktivirani protein C                                                                                                  |
| apo   | apolipoprotein                                                                                                        |
| ATP   | adenozin-trifosfat                                                                                                    |
| AVM   | arterio-venska malformacija                                                                                           |
| BHMT  | betain-homocistein-metiltransferaza                                                                                   |
| CBS   | cistationin $\beta$ -sintaza                                                                                          |
| CI    | interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )                                                              |
| CT    | kompjutorizirana tomografija                                                                                          |
| DMU   | moždani udar u dječjoj dobi                                                                                           |
| FV    | čimbenik zgrušavanja V                                                                                                |
| FII   | čimbenik zgrušavanja II                                                                                               |
| FXa   | aktivirani čimbenik zgrušavanja X                                                                                     |
| FXII  | čimbenik zgrušavanja XII                                                                                              |
| FVIII | čimbenik zgrušavanja VIII                                                                                             |
| GP    | glikoprotein                                                                                                          |
| Hcy   | homocistein                                                                                                           |
| HDL   | lipoprotein velike gustoće (engl. <i>high density lipoprotein</i> )                                                   |
| HMU   | hemoragijski moždani udar                                                                                             |
| HPA   | ljudski trombocitni aloantigeni (engl. <i>Human Platelet Alloantigen</i> )                                            |
| HR2   | haplotip R2                                                                                                           |
| ICH   | intrakranijalno (intracerebralno) krvarenje (engl. <i>intracranial hemorrhage</i> )                                   |
| I/D   | insercijsko delecijski polimorfizam                                                                                   |
| IDL   | lipoprotein intermedijarne gustoće (engl. <i>intermediate density lipoprotein</i> )                                   |
| IMU   | ishemijski moždani udar                                                                                               |
| IPSS  | Međunarodna studija o moždanom udaru u djece (engl. <i>International Pediatric Stroke Study</i> )                     |
| ISBT  | Međunarodno društvo transfuziologa (engl. <i>International Society of Blood Transfusion</i> , ISBT)                   |
| ISTH  | Međunarodno društvo za trombozu i hemostazu (engl. <i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> , ISTH) |

|                |                                                                                                            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| kDa            | kilodalton                                                                                                 |
| kb             | kilobaza                                                                                                   |
| LDL            | lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )                                          |
| Lp (a)         | lipoprotein a                                                                                              |
| LRP1           | protein sličan LDL receptoru (engl. <i>LDL receptor related protein 1</i> )                                |
| MHC            | glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )                         |
| MELAS          | mitohondrijska encefalopatija                                                                              |
| MR             | magnetska rezonancija                                                                                      |
| mRNA           | glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )                               |
| M <sub>r</sub> | molekularna masa                                                                                           |
| MS             | metionin-sintaza                                                                                           |
| MTHF           | metiltetrahidrofolat                                                                                       |
| MTHFR          | metilentetrahidrofolat-reduktaza                                                                           |
| MU             | moždani udar                                                                                               |
| NCBI           | Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i> ) |
| OR             | odjek rizika (engl. <i>odds ratio</i> )                                                                    |
| PAI-1          | inhibitor aktivatora plazminogena (engl. <i>Plasminogene activator inhibitor</i> ) <sup>1</sup>            |
| pb             | par baza                                                                                                   |
| PCR            | lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polimerase chain reaction</i> )                                     |
| M-PCR          | višestruka lančana reakcija polimerazom (engl. <i>multiplex polimerase chain reaction</i> )                |
| PMU            | perinatalni moždani udar                                                                                   |
| PNC            | Odbor za nazivlje trombocita (engl. <i>Platelet Nomenclature Committee</i> )                               |
| PS             | protein S                                                                                                  |
| RVV            | (engl. <i>Russel Viper venom-V</i> )                                                                       |
| SAH            | subarahnoidalno krvarenje (engl. <i>subarachnoid hemorrhage</i> )                                          |
| SAM            | S-adenozilmetionin                                                                                         |
| SD             | standardna devijacija                                                                                      |
| SNP            | polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )                              |
| SVT            | tromboza venskih sinusa (engl. <i>sinovenous thrombosis</i> )                                              |
| SŽS            | središnji živčani sustav                                                                                   |
| TIA            | prolazni ishemijski napadaj (engl. <i>transitory schemic attack</i> )                                      |
| THF            | tetrahidrofolat                                                                                            |

|          |                                                                                   |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| t-PA     | tkivni aktivator plazminogena (engl. <i>tissue type plasminogen activator</i> )   |
| u-PA     | urokinazni aktivator plazminogena (engl. <i>urokinase plasminogen activator</i> ) |
| VLDL     | lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. <i>very low density lipoprotein</i> )       |
| VWF      | von Willebrandov čimbenik                                                         |
| $\chi^2$ | hi-kvadrat                                                                        |

# SADRŽAJ

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD</b>                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>1. 1. MOŽDANI UDAR U DJECE</b>                                              | <b>1</b>  |
| 1. 1. 1. DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA                                            | 1         |
| 1. 1. 2. EPIDEMIOLOGIJA                                                        | 4         |
| 1. 1. 2. 1. Incidencija                                                        | 4         |
| 1. 1. 2. 2. Dob                                                                | 5         |
| 1. 1. 2. 3. Spol                                                               | 5         |
| 1. 1. 2. 4. Etničnost i geografska rasprostranjenost                           | 6         |
| 1. 1. 3. ETIOLOGIJA                                                            | 6         |
| 1. 1. 3. 1. Etiologija IMU                                                     | 6         |
| 1. 1. 3. 2. Etiologija HMU                                                     | 8         |
| 1. 1. 3. 3. Etiologija perinatalnog IMU                                        | 8         |
| 1. 1. 4. PATOGENEZA                                                            | 10        |
| 1. 1. 4. 1. Krvne žile vrata i mozga (moždana cirkulacija)                     | 12        |
| 1. 1. 5. KLINIČKA SLIKA                                                        | 13        |
| <b>1. 2. POLIMORFIZMI U GENIMA ZA KOAGULACIJSKE I FIBRINOLITIČKE ČIMBENIKE</b> | <b>14</b> |
| 1. 2. 1. FIBRINOGEN                                                            | 15        |
| 1. 2. 2. PROTROMBIN                                                            | 16        |
| 1. 2. 3. KOAGULACIJSKI ČIMBENIK V                                              | 18        |
| 1. 2. 3. 1. Struktura i funkcije FV                                            | 18        |
| 1. 2. 3. 2. Nasljedna rezistencija na aktivirani protein C (APC)               | 20        |
| 1. 2. 4. KOAGULACIJSKI ČIMBENIK XIII (FXIII)                                   | 22        |
| 1. 2. 4. 1. Struktura i funkcija FXIII                                         | 22        |
| 1. 2. 4. 2. Polimorfizam FXIII-A Val34Leu                                      | 23        |
| 1. 2. 5. INHIBITOR AKTIVATORA PLAZMINOGENA 1 (PAI-1)                           | 24        |
| <b>1. 3. METABOLIZAM HOMOCISTEINA</b>                                          | <b>26</b> |
| 1. 3. 1. METIONINSKI CIKLUS                                                    | 26        |
| 1. 3. 2. TRANSSULFURACIJSKI CIKLUS                                             | 28        |
| 1. 3. 3. POLIMORFIZMI GENA <i>MTHFR</i>                                        | 28        |
| <b>1. 4. GENI KOJI KONTROLIRAJU INTERMEDIJARNE RIZIČNE ČIMBENIKE</b>           | <b>29</b> |

|                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. 4. 1. ANGIOTENZIN-KONVERTIRAJUĆI ENZIM (ACE)                                                                                                    | 29        |
| 1. 4. 1. 1. Polimorfizam I/D u genu ACE                                                                                                            | 30        |
| 1. 4. 2. APOLIPOPROTEIN E (APOE)                                                                                                                   | 31        |
| <b>1. 5. LJUDSKI TROMBOCITNI ALOANTIGENI</b>                                                                                                       | <b>34</b> |
| 1. 5. 1. GENSKA REGULACIJA. POLIMORFIZMI GLIKOPROTEINSKIH<br>KOMPLEKSA I PROMJENE FUNKCIJSKIH OSOBINA<br>TROMBOCITA                                | 37        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>                                                                                                                        | <b>40</b> |
| <b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>                                                                                                                     | <b>42</b> |
| <b>4. MATERIJALI I METODE</b>                                                                                                                      | <b>43</b> |
| <b>4. 1. ISPITANICI</b>                                                                                                                            | <b>43</b> |
| <b>4. 2. METODE</b>                                                                                                                                | <b>44</b> |
| 4. 2. 1. IZDVAJANJE GENOMSKE DNA                                                                                                                   | 44        |
| 4. 2. 2. DOKAZIVANJE POLIMORFIZAMA METODOM LANČANE<br>REAKCIJE POLIMERAZOM I HIBRIDIZACIJOM POMOĆU<br>SUSTAVA TESTNIH TRAKA <i>CVD STRIP ASSAY</i> | 44        |
| 4. 2. 2. 1. Umnožavanje produkata metodom M-PCR                                                                                                    | 45        |
| 4. 2. 2. 2. Provjera reakcije umnožavanja produkata metodom M-PCR                                                                                  | 46        |
| 4. 2. 2. 3. Hibridizacija umnoženih produkata                                                                                                      | 47        |
| 4. 2. 2. 4. Analiza i tumačenje dobivenih rezultata                                                                                                | 48        |
| 4. 2. 3. GENOTIPIZACIJA HPA METODOM ALEL-SPECIFIČNOG PCR-A                                                                                         | 50        |
| 4. 2. 4. STATISTIČKA ANALIZA                                                                                                                       | 53        |
| <b>5. REZULTATI</b>                                                                                                                                | <b>54</b> |
| <b>5. 1. KARAKTERISTIKE SKUPINA ISPITANIKA</b>                                                                                                     | <b>54</b> |
| <b>5. 2. REZULTATI MORFOLOŠKIH PRETRAGA MOZGA U DJECE S<br/>        MOŽDANIM UDAROM</b>                                                            | <b>57</b> |
| 5. 2. 1. RASPODJELA BOLESNIKA (DJECE) PREMA TIPU MOŽDANOG<br>UDARA                                                                                 | 57        |
| <b>5. 3. KLINIČKI SIMPTOMI I RIZIČNI ČIMBENICI MOŽDANOG UDARA<br/>        U DJECE</b>                                                              | <b>58</b> |
| <b>5. 4. KARAKTERISTIKE SKUPINA DJECE PREMA TIPU MOŽDANOG<br/>        UDARA</b>                                                                    | <b>60</b> |
| <b>5. 5. KARAKTERISTIKE SKUPINE DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM</b>                                                                                |           |



|                                                                                                                                        |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>MOŽDANIM UDAROM</b>                                                                                                                 | <b>64</b>  |
| <b>5. 6. REZULTATI SLIKOVNIH MORFOLOŠKIH PRETRAGA MOZGA U DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM</b>                          | <b>67</b>  |
| <b>5. 7. KLINIČKI SIMPTOMI I RIZIČNI ČIMBENICI ARTERIJSKOG ISHEMIJSKOGA MOŽDANOG UDARA</b>                                             | <b>70</b>  |
| <b>5. 8. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM I U KONTROLNOJ SKUPINI</b>                                    | <b>72</b>  |
| 5. 8. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA S MOŽDANIM UDAROM U DJECE                                                               | 75         |
| <b>5. 9. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM PREMA SPOLU</b>                                               | <b>77</b>  |
| 5. 9. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA S MOŽDANIM UDAROM U DJECE PREMA SPOLU                                                   | 83         |
| <b>5. 10. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA</b>                                | <b>85</b>  |
| 5. 10. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA U DJECE                                                      | 88         |
| <b>5. 11. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM PREMA DOBI POJAVE MOŽDANOG UDARA</b> | <b>92</b>  |
| <b>5. 12. UČESTALOSTI KOMBINACIJE GENOTIPOVA FV I MTHFR U DJECE S MOŽDANIM UDAROM</b>                                                  | <b>99</b>  |
| <b>5. 13. UČESTALOSTI HAPLOTIPOVA POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM</b>                                                          | <b>102</b> |
| <b>6. RASPRAVA</b>                                                                                                                     | <b>105</b> |
| <b>7. ZAKLJUČCI</b>                                                                                                                    | <b>118</b> |
| <b>POPIS LITERATURE</b>                                                                                                                | <b>120</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS</b>                                                                                                                       | <b>144</b> |
| <b>POPIS OBJAVLJENIH DJELA</b>                                                                                                         | <b>145</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>                                                                                                | <b>148</b> |
| <b>BASIC DOCUMENTATION CARD</b>                                                                                                        | <b>149</b> |

# 1. UVOD

## 1. 1. MOŽDANI UDAR U DJECE

Moždani udar (MU) u djece je relativno rijetka bolest s višestrukom etiologijom koja istovremeno predstavlja značajan uzrok smrtnosti i kroničnog pobola. Iako je incidencija bolesti mnogo manja u odnosu na odrasle, MU u djece je češći i od tumora mozga te se ubraja u 10 najčešćih uzroka smrtnosti u djece, s najvišom stopom smrtnosti u prvoj godini života (1, 2).

Smatra se kako je neurološki ishod nakon preboljenog MU u djece najčešće povoljan te da djeca s oštećenjima iste težine i lokalizacije imaju bolju prognozu od odraslih zbog plastičnosti mozga. Unatoč tome, istraživanja su pokazala kako se ponovljeni MU javlja u približno 20%, dok su epileptični napadaji ili neki drugi neurološki poremećaji kao npr. trajna kognitivna i motorna disfunkcija zastupljeni čak u 70% djece (3-7).

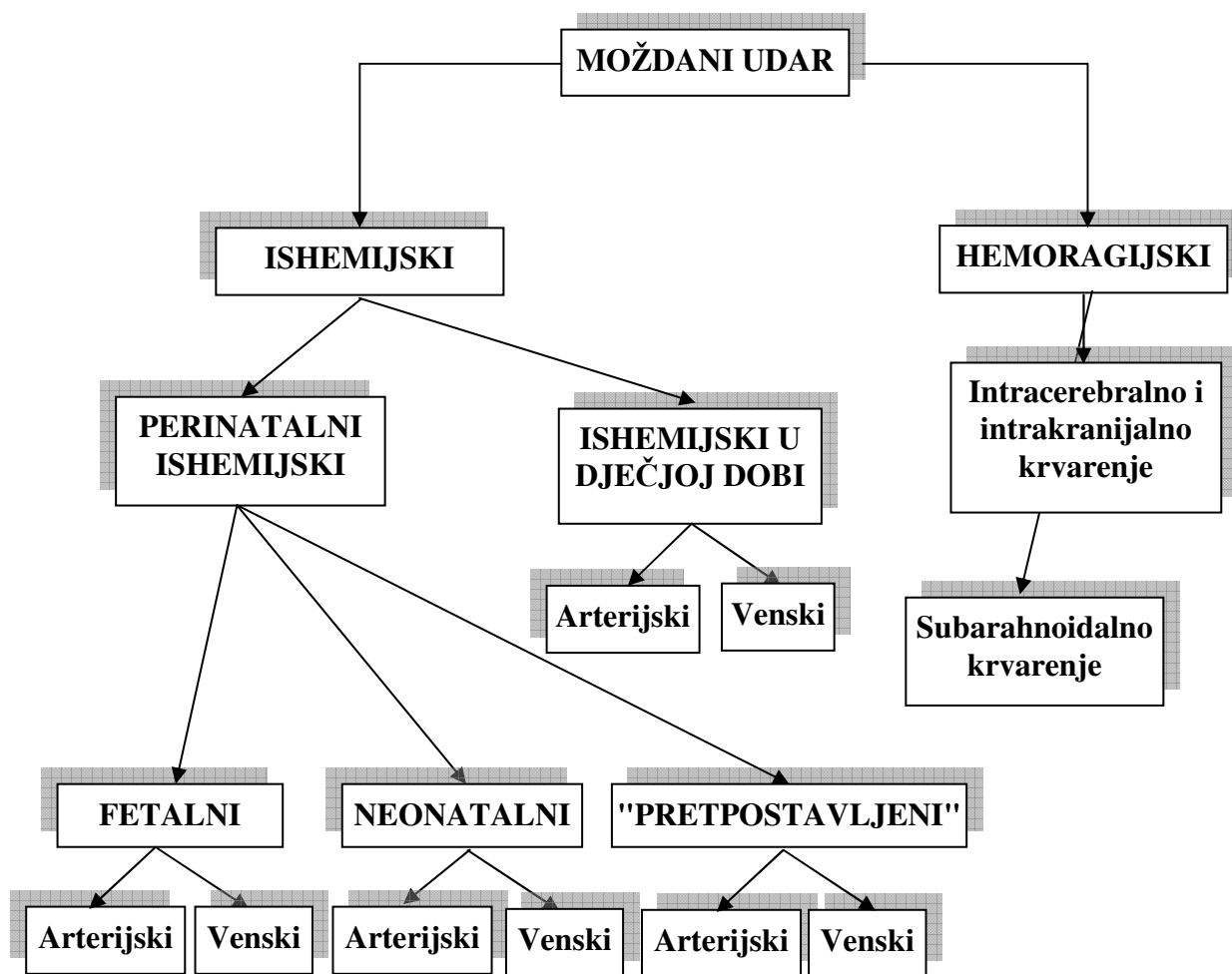
### 1. 1. 1. DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA

Klasična definicija MU Svjetske zdravstvene organizacije prema kojoj je MU "naglo razvijanje kliničkih znakova žarišnog ili globalnog poremećaja moždanih funkcija, sa simptomima koji traju 24 sata ili duže, ili vode k smrti, bez drugog jasnog uzroka, osim znakova oštećenja krvnih žila" (8), ne može se u potpunosti primijeniti u djece. Za razliku od odraslih, u djece sa simptomima karakterističnima za prolazni ishemijski napadaj (engl. *transitory ischemic attack*, TIA), moguće je dokazati postojanje MU slikovnim prikazima mozga unatoč prolaznim simptomima (9).

Nadalje, klasična definicija MU je isključivo klinička, što predstavlja ograničenje u djece s obzirom da neki od kliničkih simptoma, kao npr. napadaji i akutna hemipareza nisu strogo specifični za MU, već mogu biti posljedica epizoda sličnih MU bez vaskularnog uzroka, migrene ili metaboličkog MU (9, 10). Stoga dijagnozu MU nije moguće potvrditi bez dokaza o postojanju MU slikovnim prikazima mozga koji ujedno omogućuju i razlikovanje MU od drugih paroksizmalnih neuroloških poremećaja (11).

Iako ne postoji univerzalna definicija, MU u djece nastaje zbog naglog prekida opskrbe krvlju u dijelu središnjega živčanog sustava (SŽS) kao posljedica nagle okluzije ili ruptуре moždane cirkulacije koja dovodi do žarišnog oštećenja s neurološkim poremećajima (12, 13).

Šira definicija MU u djece obuhvaća, kao i kod odraslih, dva osnovna tipa, ishemijski (IMU) i hemoragijski moždani udar (HMU) koji se u potpunosti razlikuju prema patofiziološkom uzroku nastanka (14). IMU nastaje zbog prekida dotoka krvi, odnosno nedostatne cirkulacije i neodgovarajuće opskrbe kisikom u području krvnih žila mozga i vrata (15), dok HMU nastaje kao posljedica krvarenja iz moždanih krvnih žila u ekstravaskularne intrakranijalne ili intraspinalne prostore (12). Oba tipa MU mogu se podijeliti u podtipove koji imaju različite uzroke, kliničku sliku i klinički tijek, ishod i terapijske strategije (Slika 1.).



**Slika 1.** Podjela moždanog udara u djece (modificirano prema 16, 17).

U literaturi najčešće susrećemo dvije definicije za IMU koje se minimalno razlikuju iako obje uključuju kliničke i objektivne neuroradiološke slikovne dokaze. Prema prvoj se IMU definira kao žarišni neurološki poremećaj najvjerojatnije vaskularne prirode, koji traje

najmanje 1 sat i kod kojeg postoje slikovni dokazi moždanog infarkta magnetskom rezonancijom (MR) mozga (15, 18). Prema drugoj definiciji IMU je bilo kakav neurološki događaj, uključujući i napadaj, koji je povezan s akutnim infarktom potvrđenim MR-om. (17, 19).

S obzirom da se IMU u djece može javiti tijekom cijelog djetinjstva u različitim dobnim razdobljima za koje su karakteristični različiti rizični čimbenici, klinički simptomi i ishod (17), definirane su dvije zasebne podskupine: perinatalni IMU i IMU u dječjoj dobi.

Prema novoj definiciji, perinatalni IMU je skupina heterogenih poremećaja u kojima postoji žarišni prekid protoka krvnih žila mozga kao posljedica arterijske tromboze, tromboze venskih sinusa (engl. *sinovenous thrombosis*, SVT) mozga ili embolije, u razdoblju između 20. gestacijskog tjedna i 28. dana postnatalno koji je potvrđen slikovnim prikazima mozga ili neuropatološkim obdukcijским nalazima. Kako nije moguće sa sigurnošću utvrditi točno vrijeme nastanka IMU, predložena je klasifikacija i podjela perinatalnog IMU prema gestacijskoj ili postnatalnoj dobi dijagnoze MU na:

1. **fetalni** - dijagnosticiran prije rođenja djeteta uporabom fetalnih slikovnih metoda ili u mrtvorodene djece na temelju neuropatološkog obdukcijskog nalaza
2. **neonatalni** – dijagnosticiran nakon rođenja djeteta do 28. dana postnatalno, uključujući i u nedonoščadi
3. **"pretpostavljeni" perinatalni** – dijagnosticiran nakon 28. dana postnatalno uključujući i u nedonoščadi kod kojih se samo može pretpostaviti, ali bez potpune sigurnosti da je ishemijski događaj nastao u razdoblju između 20. gestacijskog tjedna i 28. dana postnatalno (16)

IMU koji nastaje između 28. dana postnatalno i 18. godine života definira se kao IMU u dječjoj dobi. Nadalje, i unutar perinatalnog i IMU u dječjoj dobi razlikujemo podjelu prema lokalizaciji IMU na arterijski IMU (AIMU) kao posljedicu okluzije unutar arterijske opskrbe mozga i SVT kao posljedicu okluzije u venskom drenažnom sustavu mozga (Slika 1.) (20).

HMU obuhvaća spontano intrakranijalno i intracerebralno krvarenje u moždani parenhim koje je udruženo sa žarišnim neurološkim poremećajima i netraumatsko subarahnoidalno krvarenje (engl. *subarachnoid hemorrhage*, SAH) koje često nije udruženo s neurološkim poremećajima (15, 21).

## **1. 1. 2. EPIDEMIOLOGIJA**

Epidemiologija MU u djece se značajno razlikuje u odnosu na odrasle (22). Iako je do danas objavljeno više različitih populacijskih epidemioloških studija, njima je uglavnom obuhvaćen relativno mali broj djece i to pretežno iz zapadnoeuropskih i sjevernoameričkih država, dok je vrlo mali broj studija iz ostalih dijelova svijeta (23).

### **1. 1. 2. 1. Incidencija**

Prvi podatci o incidenciji MU potječu iz 1970. godine kad je objavljena prva populacijska studija, prema kojoj je godišnja incidencija za oba tipa MU iznosila 2,52 na 100.000 djece (24). U posljednjih 25 godina bilježi se stalan porast incidencije MU kao rezultat tehnološkog napretka i veće dostupnosti različitih tehnika slikovnih prikaza mozga koji su omogućili lakšu dijagnostiku i klasifikaciju bolesti.

Na temelju epidemioloških istraživanja provedenih u različitim populacijama u posljednjih 30 godina, godišnja incidencija MU u djece mlađe od 18 godina iznosi 1,3-13,0 na 100.000 djece (23, 25-27). Iako se objavljene godišnje incidencije razlikuju prema geografskoj rasprostranjenosti ovisno o definiciji MU i kriterijima za uključivanje djece u studiju, najveći broj autora navodi incidenciju od približno 3,0 na 100.000 djece (22). Pri tome se neka istraživanja odnose samo na IMU, dok se samo u manjem broju istraživanja incidencija odnosi na oba tipa MU (IMU i HMU) (23). Učestalost pojedinog tipa MU značajno se razlikuje ovisno o dobi (9). Za razliku od odraslih gdje je IMU mnogo češće zastupljen (80-85%) od HMU, u dječjoj se populaciji opisuje vrlo mala razlika između zastupljenosti pojedinih tipova MU, približno 55% ishemijskih i 45% hemoragijskih (9, 22). Godišnja incidencija IMU iznosi između 0,2 u japanskoj populaciji (28) i 7,9 u francuskom registru iz Dijona (26), a za HMU između 1,5 i 5,1 na 100.000 djece (24, 29).

Za razliku od AIMU, SVT mozga se rijetko pojavljuje u dječjoj dobi, s godišnjom incidencijom od 0,3 do 0,67 na 100.000 djece (11, 15, 30). Prema dostupnim literaturnim podacima, perinatalni AIMU je najčešći tip moždanog infarkta u djece i to čak 17 puta češći od AIMU u dječjoj dobi (11, 31). Iako za ovo dobno razdoblje postoji relativno mali broj epidemioloških istraživanja, godišnja incidencija perinatalnog AIMU iznosi između 1/1600 (32) i 1/5000 žive novorođene djece, odnosno od 17 do 63 slučaja na 100.000 žive novorođene djece (32, 33).

Godišnja incidencija spontanog intrakranijalnog (intracerebralnog) krvarenja (engl. *intracranial hemorrhage*, ICH) iznosi 0,8, a SAH-a 0,3 na 100.000 djece (34).

### **1. 1. 2. 2. Dob**

Istraživanja o utjecaju dobi kao čimbenika rizika za nastanak MU pokazala su značajne razlike. Unatoč tome, u svim je istraživanjima utvrđeno kako djeca mlađa od godine dana imaju najveći rizik za nastanak MU jer se javlja čak u 50% od svih slučajeva MU u dječjoj dobi (34-37). Nadalje, prema studijama u kojima su analizirana zasebno djeca mlađa od mjesec dana i starija djeca, visokorizično dobno razdoblje za nastanak MU je u djece mlađe od mjesec dana kada se događa 8-35% svih slučajeva MU (23).

Za ostale dobne skupine dobiveni su proturječni rezultati. Neki su autori utvrdili kako se rizik za nastanak oba tipa MU smanjuje nakon prve godine života, dostiže nadir između 5. i 9. godine, s novim porastom rizika za pojavu IMU i HMU u adolescenata (34, 35). Suprotno tome, neki autori nisu ustanovili porast rizika za IMU u adolescenata (36, 38), nego postupni pad rizika sa starosnom dobi, s najmanjim rizikom u djece od 12 do 18 godina (37).

Što se tiče HMU u djece mlađe od 10 godina, ICH je češći oblik, dok se SAH češće pojavljuje u adolescenata (39).

### **1. 1. 2. 3. Spol**

Dobro je poznato kako su u odrasloj populaciji muškarci skloniji nastanku MU u generativnoj životnoj dobi (40). Gotovo sve su objavljene populacijske studije pokazale kako dječaci imaju veći rizik za nastanak MU od djevojčica. Samo u jednoj studiji nije utvrđena veća zastupljenost dječaka u odnosu na djevojčice (omjer 0,8:1) (41), a u dvije studije nije postojala razlika između spolova (28, 42). U svim ostalim studijama izračunati omjeri dječaka u odnosu na djevojčice iznosili su od 1,15:1 do čak 4,0:1 (23). Pojedinačni su rezultati potvrđeni i u velikoj međunarodnoj multicentričnoj studiji o MU u 1187 djece iz različitih svjetskih centara (engl. *International Pediatric Stroke Study*, IPSS) u kojoj je utvrđen omjer dječaka u odnosu na djevojčice od 1,49:1 (43).

#### **1. 1. 2. 4. Etničnost i geografska rasprostranjenost**

Epidemiološka istraživanja o MU u djece su gotovo isključivo provedena u ekonomski razvijenim državama, s uglavnom prevladavajućom bjelačkom populacijom. Iznimku čine dva istraživanja s >98%-tnom zastupljenošću Japanaca i Kineza (28, 44). Od populacijskih studija samo je studija Fullerton i sur. bila etnički heterogena s dovoljnim brojem djece u svakoj etničkoj podskupini za međusobnu usporedbu. U ovoj studiji dokazan je 2 puta veći rizik za nastanak MU u crne afroameričke djece u odnosu na bijelce, čak i nakon što su iz obrade isključena djeca sa srpastom anemijom. Isti rizik opažen je za Azijate i za bijelce, dok je relativni rizik za nastanak MU bio manji u Latinoamerikanaca (34).

#### **1. 1. 3. ETIOLOGIJA**

Etiologija MU u djece je vrlo složena i značajno se razlikuje u odnosu na odraslu populaciju, gdje ateroskleroza i hipertenzija predstavljaju glavne rizične čimbenike za nastanak MU (15, 22). Danas je poznato više od 100 različitih nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika od kojih su najčešće srčane, hematološke i sistemske bolesti, infekcije, protrombotički, metabolički i vaskularni poremećaji (Tablica 1.), dok su neki rizični čimbenici izrazito rijetki (15, 27, 45).

Etiologija i ishod MU značajno se razlikuje s obzirom na tip MU i dob djeteta. Iako su neki rizični čimbenici istovjetni i za nastanak IMU i za HMU, kao npr. anemija srpastih stanica i Fabryjeva bolest koje uzrokuju i trombozu i krvarenje, neki se međusobno razlikuju i karakteristični su za pojedini tip MU (18).

##### **1. 1. 3. 1. Etiologija IMU**

Iako je dosad utvrđen veći broj nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika za nastanak IMU u djece, etiologija je još uvijek nepoznata u približno 30% slučajeva (9, 14).

Dobro poznati rizični čimbenici uključuju nasljedne i stečene srčane bolesti, strukturne anomalije krvnih žila, protrombotičke, metaboličke i vaskularne poremećaje, hematološke bolesti, infekcije, te traume glave i vrata (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Rizični čimbenici za nastanak moždanog udara u djece (modificirano prema 15, 47, 48).

| MOŽDANI UDAR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISHEMIJSKI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | HEMORAGIJSKI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b><i>Srčane bolesti</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nasljedne srčane bolesti (stenoz aorte i mitralne valvule, otvoreni foramen ovale, atrijski i ventrikularni septalni defekt)</li> <li>Reumatska srčana bolest</li> <li>Kardiomiopatija</li> <li>Endokarditis/Miozitis</li> <li>Poremećaji srčanog ritma</li> </ul>                                                                                             | <b><i>Strukturne abnormalnosti krvnih žila</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Arterio-venske malformacije</li> <li>Intrakranijalne aneurizme</li> <li>Kavernozni angiomi</li> <li>Arterijska fibromuskularna displazija</li> <li>Nasljedna hemoragijska teleangiektazija</li> <li>Sturge-Weberov sindrom</li> </ul> |
| <b><i>Hematološke bolesti</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anemija srpastih stanica</li> <li>Sideropenična anemija</li> <li>Mijeloproliferativne bolesti (policitemija, trombocitemija)</li> <li>Leukemija, limfomi</li> <li>Nasljedna trombofilija (manjak antitrombina, proteina C ili S, FV Leiden)</li> <li>Stečena trombofilija (diseminirana intravaskularna koagulacija, antifosfolipidni sindrom)</li> </ul> | <b><i>Hematološke bolesti</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hemoglobinopatija</li> <li>Trombocitopenija</li> <li>Hemofilija i ostale koagulopatije (hipofibrinogenemija)</li> </ul>                                                                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b><i>Traume glave</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Subduralno krvarenje</li> <li>Epiduralno krvarenje</li> </ul>                                                                                                                                                                                                 |
| <b><i>Metaboličke bolesti</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mitohondrijski poremećaji</li> <li>Homocistinurija/hiperhomocisteinemija</li> <li>Fabryjeva bolest</li> <li>Dislipidemija</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                      | <b><i>Metaboličke bolesti</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Glutarična acidurija tip I i II</li> <li>Homocistinurija</li> <li>Fabryjeva bolest</li> </ul>                                                                                                                                                          |
| <b><i>Infektivne bolesti i uzročnici</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Bakterijski meningitis</li> <li>Virus <i>Varicella zoster</i>, HIV, Parvovirus B19, neuroborreliosa</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                 | <b><i>Hipertenzija</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Prirođena adrenalna hiperplazija</li> <li>Uporaba stimulacijskih lijekova</li> <li>Koarktacija aorte</li> </ul>                                                                                                                                               |
| <b><i>Vaskulopatije</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sindrom <i>moya-moya</i> (primarni ili sekundarni)</li> <li>Fibromuskularna displazija</li> <li>Neurofibromatoza tip 1</li> <li>Tuberozna skleroza</li> <li>Disekcija krvne žile</li> <li>Prolazna moždana arteriopatija</li> </ul>                                                                                                                             | <b><i>Nasljedne vaskulopatije</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ehlers-Danlosov sindrom</li> <li>Neurofibromatoza</li> <li>Tuberozna skleroza</li> <li>Sindrom <i>moya-moya</i></li> <li>Osler-Weber-Rendeova bolest</li> <li>Von Hippel-Lindauov sindrom</li> </ul>                                               |
| <b><i>Vaskulitis</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Postinfektivni vaskulitis</li> <li>Sistemijski eritemski lupus</li> <li><i>Poliarteritis nodosa</i></li> <li>Takayasuov sindrom</li> <li>Henoch-Schönleinova purpura</li> <li>Kawasakijev sindrom</li> </ul>                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |



Često je moguće utvrditi više rizičnih čimbenika i to u čak 60% djece s IMU (9). Dosadašnja istraživanja, kao i nedavno objavljeni rezultati multicentrične studije IPSS o rizičnim čimbenicima, pokazali su različite učestalosti pojedinih rizičnih čimbenika u različitim populacijama i geografskim područjima (46). Unatoč tome, neaterosklerotske arteriopatrije i srčane bolesti utvrđene su kao univerzalni rizični čimbenici, bez obzira na geografsko područje (17, 46).

Osim dobro utvrđenih monogenetskih poremećaja povezanih s nastankom IMU u djece kao što su anemija srpastih stanica, Fabryjeva bolest, mitohondrijska encefalopatija-MELAS, sindrom *moya-moya*, homocistinurija i nasljedni poremećaji metabolizma lipida, sve je više podataka koji upućuju na važnost protrombotičkih poremećaja zbog promjena na razini gena koji reguliraju čimbenike zgrušavanja i fibrinolize (10, 49). U multicentričnoj studiji IPSS dobivena je statistički značajna razlika između učestalosti protrombotičkih poremećaja i drugih rizičnih čimbenika za nastanak MU u različitim dijelovima svijeta, a najveća učestalost protrombotičkih poremećaja od čak 38% zabilježena je u Europi (46).

### **1. 1. 3. 2. Etiologija HMU**

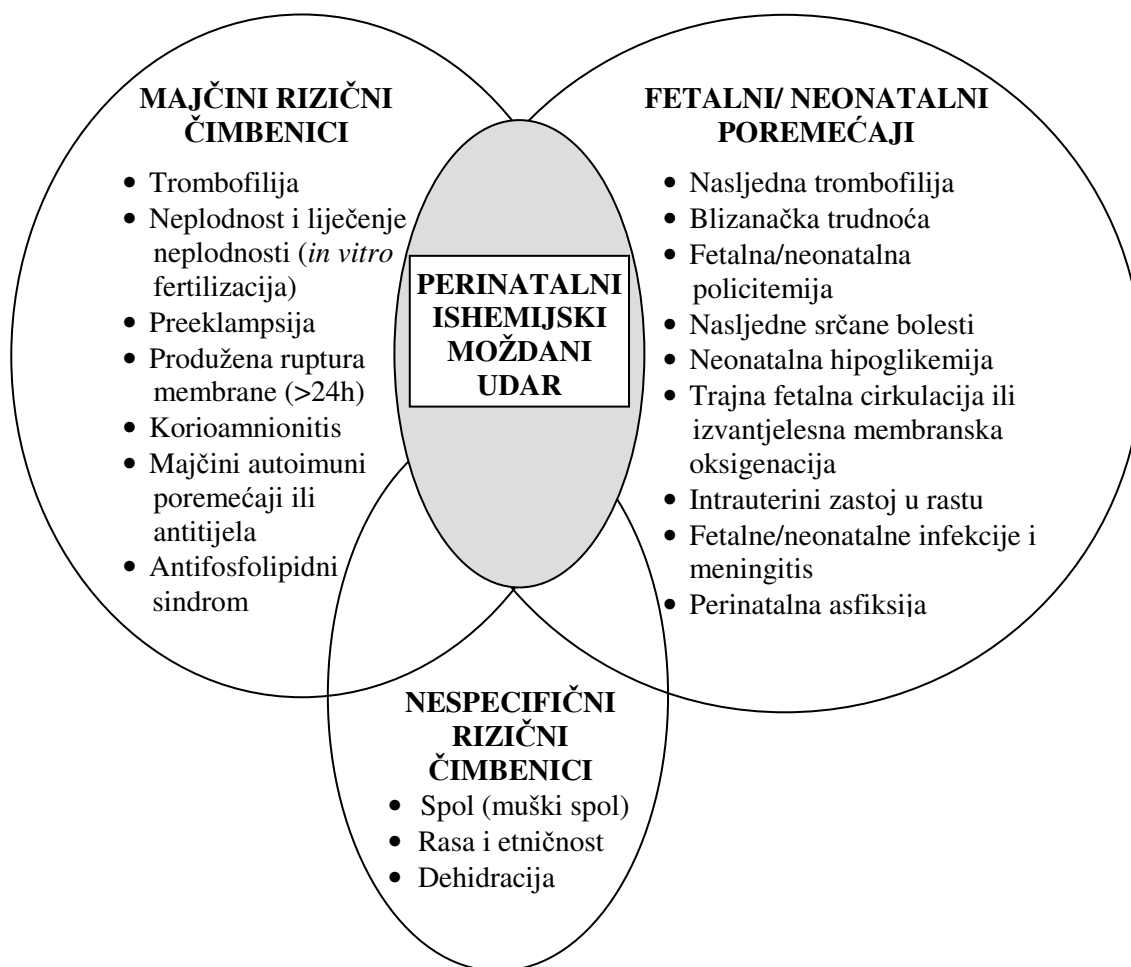
Krvarenje u mozgu najčešće nastaje kao posljedica traume (slučajnih ozljeda) ili neurokirurških zahvata na mozgu. Spontani ICH najčešće nastaje zbog strukturnih abnormalnosti krvnih žila s posljedičnom rupturom, intrakranijalnih tumora mozga, najčešće meduloblastoma i primitivnih neuroektodermalnih tumora mozga ili hematoloških bolesti (15, 21, 50).

Od ostalih poznatih rizičnih čimbenika navode se kavernozne malformacije (kavernozni angiomi), vaskulopatije, vaskulitis, moždane i sistemske infekcije, hipertenzija, a ponekad, iako rijetko, i uporaba sredstava ovisnosti. Unatoč dosad utvrđenim rizičnim čimbenicima, idiopatska intraparenhimska krvarenja u djece su relativno česta (23%) (50). Najčešći uzrok krvarenja su arterio-venske malformacije (AVM), dok mnogo rjeđe (u približno 10% slučajeva) krvarenje nastaje kao posljedica rupture intrakranijalnih aneurizmi. Za razliku od toga, intrakranijalne aneurizme su najčešći uzrok netraumatskog SAH-a.

### **1. 1. 3. 3. Etiologija perinatalnog IMU**

Etiologija perinatalnog IMU značajno se razlikuje od IMU u dječjoj dobi jer osim fetalnih/neonatalnih rizičnih čimbenika uključuje još i majčine i perinatalne rizične čimbenike

(Slika 2.) i to posebice kod teškog i dugotrajnog poroda (2, 10, 51).



**Slika 2.** Rizični čimbenici za nastanak perinatalnog IMU koji uključuju majčine rizične čimbenike, fetalne/neonatalne poremećaje, te nespecifične rizične čimbenike (prema 16).

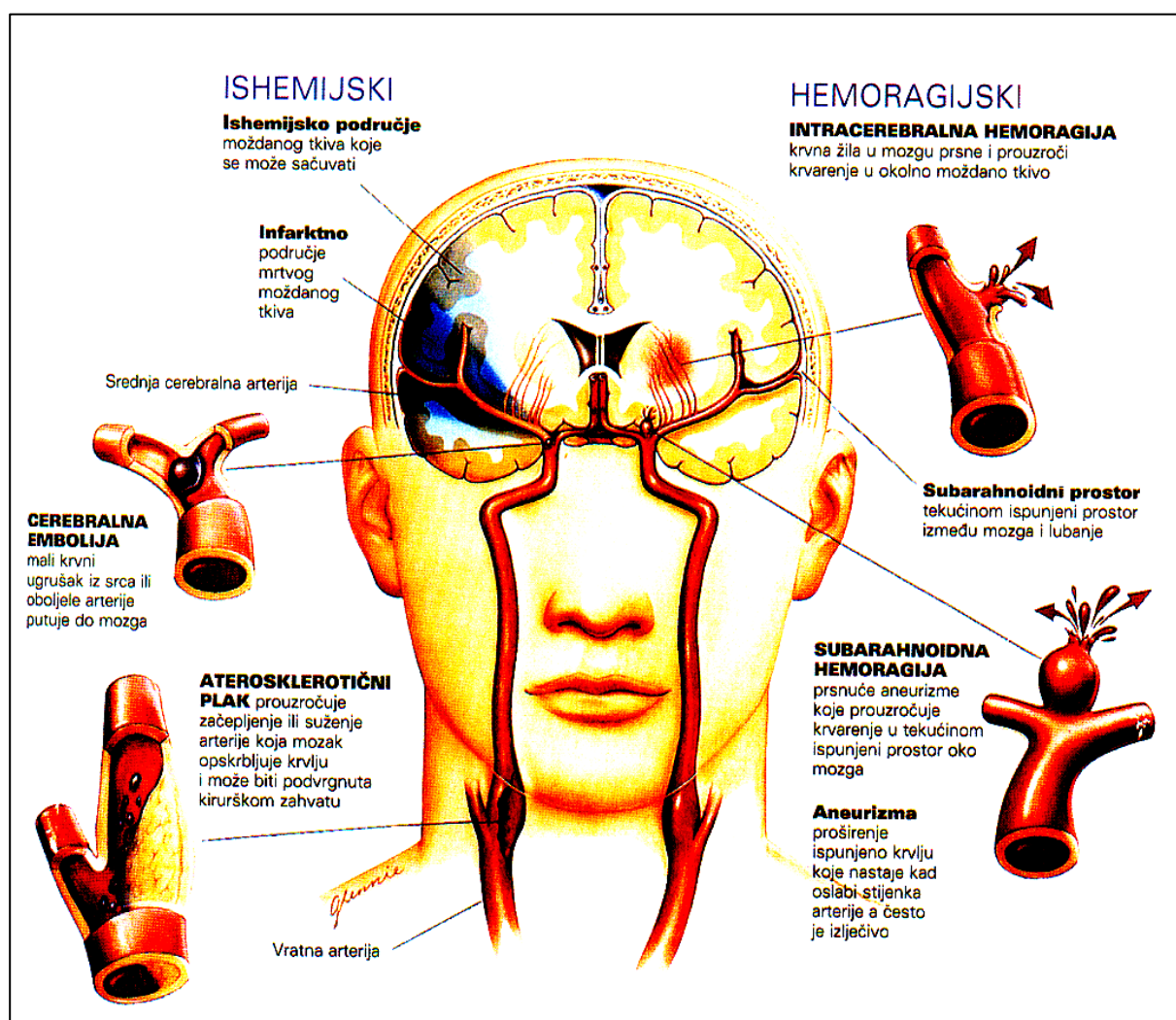
U usporedbi s IMU u drugim dobnim razdobljima, perinatalni IMU ima jedinstvene osobine. Normalna trudnoća sama po sebi predstavlja fiziološko protrombotičko i proupalno stanje, pa je tako i rizik za nastanak MU u majke 34 puta veći u prvih 3 dana nakon poroda (52, 53). Majke i djeca su posebno podložna trombozi i tromboembolijskim komplikacijama tijekom trudnoće i poroda. Osim visokih vrijednosti hematokrita i povećane viskoznosti krvi u fetusa uz istodobno smanjenu funkciju antikoagulacijskog sustava, novija istraživanja pokazuju da i nasljedna trombofilija u majke može povećati rizik za nastanak tromboze u fetusa, iako točna uloga majčine trombofilije u etiologiji perinatalnog IMU još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (53, 54). Kako je u etiologiji perinatalnog IMU istovremeno uključeno više rizičnih čimbenika, kako fetalnih, tako i majčinih tijekom trudnoće i poroda, smatra se

kako IMU najvjerojatnije nastaje kao rezultat složenog međudjelovanja više rizičnih čimbenika (16, 55).

Unatoč sve brojnijim spoznajama o rizičnim čimbenicima perinatalnog IMU, u 25-47% slučajeva nisu utvrđeni rizični čimbenici, slično kao i u dječjoj dobi (51, 56).

#### 1. 1. 4. PATOGENEZA

Patogeneza MU razlikuje se ovisno o etiologiji i tipu MU (Slika 3.). Tri različita mehanizma mogu uzrokovati IMU: tromboza, embolija, ili sistemska hipoperfuzija, od kojih je najčešći uzrok tromboza moždanih arterija zbog primarnih anatomskih strukturnih abnormalnosti samih arterija ili nasljednih i stečenih protrombotičkih poremećaja.



Slika 3. Patogeneza ishemijskog i hemoragijskoga moždanog udara (prema 59).

Lokalizirana okluzija moždane arterije nastaje u policitemiji ili u hiperkoagulabilnim stanjima. Alternativno, anatomske strukturne abnormalnosti mogu uzrokovati nastajanje tromba ili mehaničku opstrukciju kao npr. u fibromuskularnoj displaziji, arteritisu ili arterijskoj disekciji (12, 15). Tromboza i embolija mozga mogu uzrokovati stenozu i potpunu okluziju krvnih žila vrata i mozga.

Embolija moždanih arterija najčešći je uzrok IMU u djece s nasljednim srčanim greškama i strukturnim promjenama moždanih arterija. Embolus iz srca može izravno ući u moždanu cirkulaciju ili kroz desno-lijevi intrakardijalni spoj kod atrijskoga septalnog defekta, otvorenog *foramena ovale* ili Fallotove tetralogije (12).

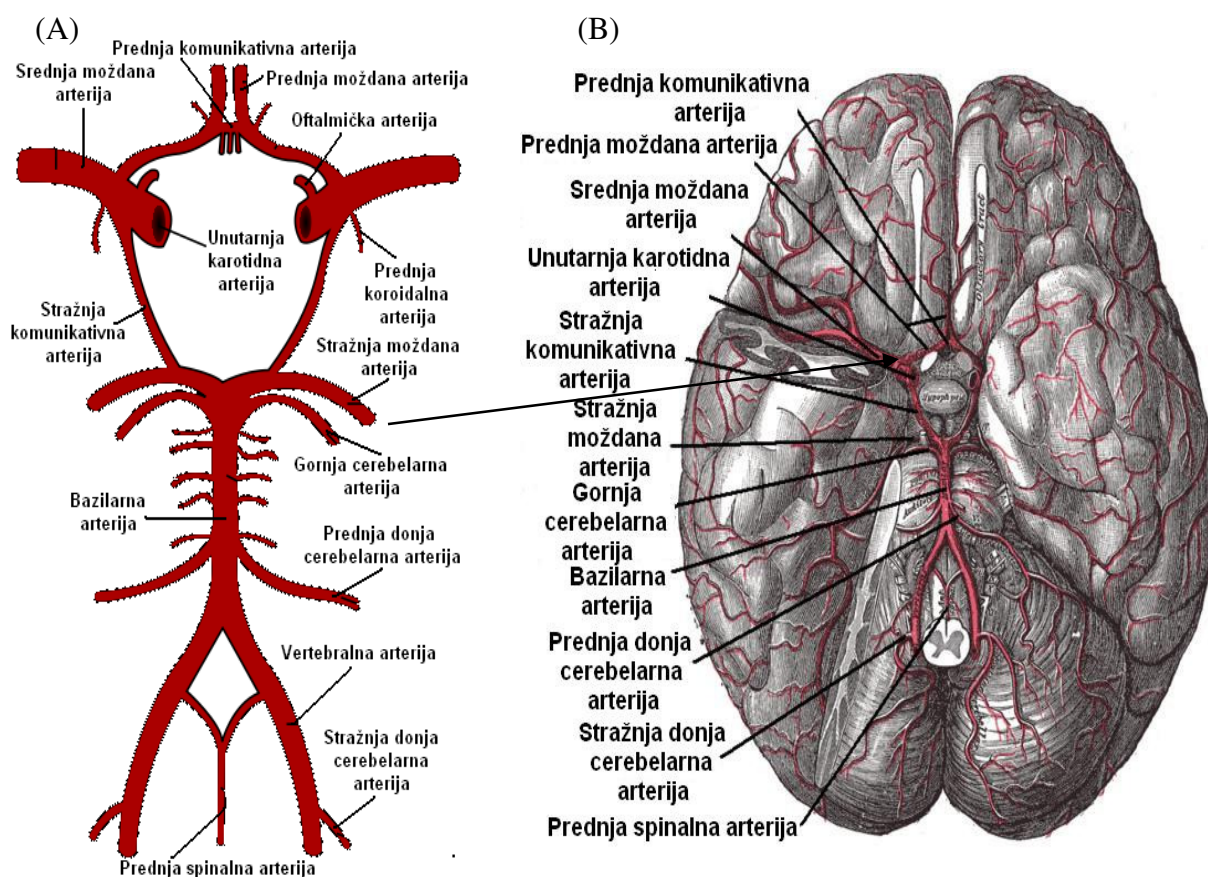
U patogenezi perinatalnog MU najvažniju ulogu imaju tromboza intrakranijalnih krvnih žila ili embolija zbog tromba nastalih u ekstrakranijalnim krvnim žilama, srcu, umbilikalnoj veni ili posteljici. Iako nije moguće u potpunosti utvrditi točan izvor, posteljica sa svojim zasebnim hemostatskim mehanizmom vjerovatno predstavlja najvažniji lokus u patologiji perinatalnog IMU, pa se fetalna strana posteljice smatra najčešćim izvorom *embolusa* (16, 53). Otvoreni *foramen ovale* omogućuje trombima podrijetlom iz fetalne strane posteljice embolizaciju u fetusu tako što zaobilazeći jetrenu i plućnu cirkulaciju dolaze izravno u fetalni mozak (57).

U slučaju naglog pada tlaka dolazi do narušene moždane perfuzije zbog smanjene sistemske perfuzije, što uzrokuje oštećenje SŽS. Sistemska hipoperfuzija kao i zatajenje srca zbog hipovolemije (sistemske hipotenzije) može uzrokovati ishemijsko oštećenje mozga koje je često difuznije u usporedbi sa žarišnim ozljedama zbog tromboze ili embolije. U konačnici moždana ishemija dovodi do oštećenja mozga bez obzira na njen uzrok (okluzivni ili hipotenzivni), koje je ovisno o stupnju ishemije, tj. postotku smanjenog protoka u odnosu na normalni protok i trajanju ishemije (sistemska hipotenzija ili lokalno smanjenje moždanog protoka) (12).

Moždano krvarenje nastaje kod krvarenja iz moždanih krvnih žila te prodora i izlivanja krvi u ekstravaskularne intrakranijalne ili intraspinalne prostore (12). Zbog prevelike količine krvi unutar zatvorene intrakranijske šupljine dolazi do porasta tlaka i posljedične ishemije koja dovodi do žarišne ozljede mozga ili tkiva produžene moždine (58). U slučaju kad su nakupine krvi odvojene od parenhima mozga duralnom ili arahnoidalnom membranom, krvarenje je epiduralno ili subduralno, dok je u slučaju kad krv teče izvan intrakranijskih krvnih žila i ispod površine mozga krvarenje subarahnoidalno, a kod krvarenja u moždani parenhim intracerebralno (12).

#### 1. 1. 4. 1. Krvne žile vrata i mozga (moždana cirkulacija)

Mozak opskrbljuju krvlju dvije parne krvne žile: unutarnja karotidna i vertebralna arterija (ekstrakranijalne arterije) koje su u intrakranijalnom dijelu povezane u Willisov arterijski krug (Slika 4A.). Willisov arterijski krug je funkcionalni sustav moždanih arterija na bazi mozga, koji je sastavljen od međusobno povezanih ogranaka velikih moždanih arterija, prednje, srednje i stražnje moždane arterije, te prednje i stražnje komunikacijske arterije. Funkcija Willisovog arterijskog kruga je preusmjeravanje krvi iz bazena s većom opskrbom u bazen s manjom opskrbom u slučaju smanjene opskrbe krvi u jednom dijelu.



**Slika 4.** (A) Arterije povezane u Willisov arterijski krug; (B) Prikaz glavnih moždanih arterija (prema 61).

Moždane arterije zajedno s karotidnim i vertebralnim arterijama čine prednju i stražnju moždanu cirkulaciju (Slika 4B.). Prednju moždanu cirkulaciju čine unutarnje karotidne arterije iz kojih se tijekom prolaska kroz kavernozi sinus odvaja oftalmična arterija, dok se nakon izlaska iz kavernoznog sinusa grana na stražnju komunicirajuću arteriju, prednju

koroidnu arteriju te završne grane, prednju i srednju moždanu arteriju. Prednje moždane arterije povezuje mala prednja komunikacijska arterija. Srednja moždana arterija je najveća moždana arterija i najvažnija grana unutarnje karotidne arterije (12, 15, 60).

Stražnju moždanu cirkulaciju, koja se naziva i vertebro-bazilarna cirkulacija, čine vertebralne arterije, bazilarna arterija, cerebelarna arterija i stražnje moždane arterije. Vertebralne arterije nakon ulaska u lubanjsku šupljinu kroz *foramen magnum* daju dvije grane za leđnu moždinu: prednju i stražnju spinalnu arteriju te jednu za mali mozak, stražnju donju cerebelarnu arteriju. Vertebralne se arterije spajaju u bazilarnu arteriju koja teče uz prednju stranu produžene moždine i ponsa gdje se dijeli na dvije završne grane, stražnje moždane arterije koje su međusobno povezane stražnjom komunicirajućom arterijom. Stražnjom moždanom cirkulacijom opskrbljuju se mali mozak, produžena moždina i kaudalni dio ponsa (60).

Venski sustav mozga sastoji se od mreže površinskih i dubokih vena koje skupljaju vensku krv kroz duralne sinuse i ulijevaju je većim dijelom u unutarnju jugularnu venu, a manjim dijelom u vanjsku jugularnu venu. Duboki venski sustav čine dubinske moždane vene koje dolaze moždane unutrašnjosti i ulijevaju se u veliku moždanu venu, venu Galeni (15, 62).

### **1. 1. 5. KLINIČKA SLIKA**

Specifična klinička slika MU ne postoji, već se ona uvelike razlikuje ovisno o dobi, uzroku i lokalizaciji MU (15, 47 63). Neurološki simptomi mogu biti žarišni i generalizirani. Žarišni neurološki simptomi su odraz poremećaja funkcije određenog dijela oštećenog mozga. Generalizirani neurološki simptomi mogu se pojaviti u različitim oblicima MU. Najčešći opći simptomi su glavobolja, mučnina i povraćanje, generalizirani epileptički napadaji, te poremećaj svijesti koji se može razviti do kome (64).

MU se može očitovati naglim ili blagim početnim smetnjama moždane cirkulacije, s kliničkom slikom koja se javlja odmah u trenutku nastanka bolesti ili postupnim pogoršanjem kliničke slike. Obično embolijski MU ima nagli početak, dok trombotički može imati progresivni početak. IMU i HMU se ne mogu razlikovati prema kliničkim simptomima.

Žarišni neurološki poremećaji su najčešći klinički simptomi AIMU, ponajprije hemipareza, a od ostalih simptoma to su napadaji, glavobolja, problemi s govorom i poremećaji svijesti. Najčešći simptomi MU u stražnjoj cirkulaciji su ataksija, vrtoglavica i

povraćanje (14). Epileptički napadaji su posebice česti u novorođenčadi s IMU i bilježe se u 25-40% slučajeva, bez pratećih znakova encefalopatije (poremećaja svijesti, tonusa, povraćanja). Ponekad se IMU u dojenčeta očituje nespecifičnim znakovima koji obuhvaćaju hipotoniju, apneju ili somnolenciju (letargija), obično bez žarišnih neuroloških poremećaja (27). Često se dijagnoza postavlja kasnije nakon 4-8 mjeseci kada se u dojenčeta očituje asimetrija pokreta ili epileptički napadaji uz znakove MU koji se mogu uočiti neuroradiološkim tehnikama (65, 66).

Klinički simptomi HMU ponajprije su ovisni o dobi djeteta, opsegu i lokalizaciji krvarenja (27). Iako su tipični simptomi HMU, intraparenhimnog i subarahnoidnog krvarenja, glavobolja i povraćanje, simptomi mogu biti napadaji, poremećaj svijesti i/ili žarišni neurološki poremećaji, pa tako iznenadni gubitak svijesti upućuje ponajprije na HMU (67). AVM, intrakranijalne aneurizme i kavernozne malformacije sa slikom HMU klinički se očituju iznenadnom intenzivnom glavoboljom, bolovima u vratu, fotofobijom i fonofobijom, mučninom i povraćanjem uz poremećaj svijesti s pojavom žarišnih neuroloških znakova ili bez njih.

Klinička slika SVT ovisna je o dobi i mjestu tromboze. Simptomi su nespecifični, te mogu biti blagi i preklapati se sa simptomima upale ili dehidracije u obliku napadaja, poremećaja svijesti i encefalopatije ili mogu biti žarišni i difuzni kao što su glavobolja, mučnina i povraćanje (15).

## **1.2. POLIMORFIZMI U GENIMA ZA KOAGULACIJSKE I FIBRINOLITIČKE ČIMBENIKE**

Za održavanje normalnoga hemostatskog odgovora nužna je ravnoteža između protrombotičkih i antitrombotičkih procesa koji se održavaju međudjelovanjem staničnih komponenti, topljivih plazmatskih proteina i endotelnih čimbenika. Fiziološku ravnotežu mogu narušiti poremećaji na razini gena koji utječu na sintezu, aktivnost, bioraspoloživost ili metabolizam specifičnih čimbenika koji sudjeluju u hemostatskom odgovoru (68).

Povećani rizik za nastanak tromboze i kliničkih ishemijskih događaja povezuje se s polimorfizmima više različitih gena za koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike koji sudjeluju u različitim hemostatskim procesima. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazali su na moguću povezanost nekoliko genskih (nasljednih) rizičnih čimbenika tromboze s MU: izolirani

manjak proteina C, čimbenik V (FV) Leiden i čimbenik II (FII) G20210A (10, 49, 69). Pojedinačni rezultati istraživanja u različitim zemljama potvrđeni su u multicentričnoj studiji IPSS koja je ukazala na statistički značajnu razliku u učestalosti protrombotičkih poremećaja u različitim dijelovima svijeta, s najvećom učestalosti od čak 38% u Europi (46).

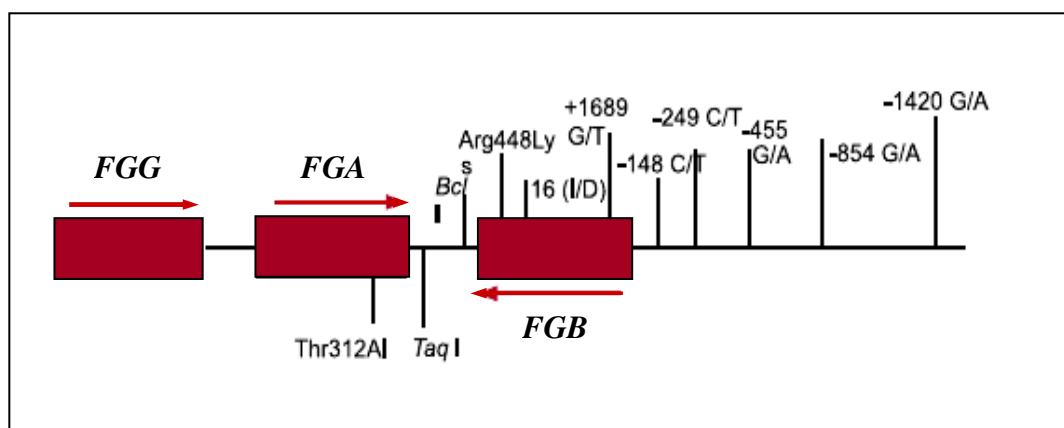
### 1. 2. 1. FIBRINOGEN

Fibrinogen je glikoprotein (GP) molekularne mase 340 kDa koji se sastoji od dva simetrična dimera građena od 3 homologna polipeptidna lanca  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ , međusobno povezana s 29 disulfidnih veza (70). Strukturno se molekula fibrinogena sastoji od tri domene: središnje domene E u kojoj su međusobno spojeni aminoterminalni dijelovi svih 6 polipeptidnih lanaca i dvije periferno smještene domene D koje sadrže karboksiterminalne dijelove lanaca  $B\beta$  i  $\gamma$  (71).

Svaki se polipeptidni lanac sintetizira u hepatocitima neovisno jedan od drugog, a kodiraju ih 3 različita gena: *FGA* kodira lanac  $A\alpha$ , *FGB* lanac  $B\beta$ , a *FGG* lanac  $\gamma$ . Geni su poredani u nizu *FGG-FGA-FGB* i organizirani u skupinu gena koja zauzima područje od 50 kilobaza (kb) na dugom kraku 4. kromosoma (4q23-32) (72). *FGA*, koji zauzima središnji položaj u ovoj skupini gena, sastoji se od 5 eksona i odgovoran je za sintezu polipeptidnog lanca građenog od 625 aminokiselinskih ostataka. *FGB* je smješten 13 kb nizvodno od *FGA* i sadrži 8 eksona, a transkripcija se odvija u suprotnom smjeru od *FGA* i *FGG*. Pritom je sinteza lanca  $B\beta$  koji je građen od 461 aminokiselinskog ostatka, ograničavajući čimbenik u sintezi molekule fibrinogena. Treći polipeptidni lanac od 411 aminokiselinskih ostataka kodira *FGG* koji je smješten 10 kb uzvodno od *FGA* (Slika 5.) (73).

Fibrinogen je nazastupljeniji od svih koagulacijskih čimbenika, s koncentracijom u plazmi od 2,0-4,0 g/L. Protein je akutne faze, a povišene koncentracije nalazimo u žena i u starijoj dobi, kao i u pušača, šećernoj bolesti, hiperlipidemiji, hipertenziji i upali. Postoje čvrsti dokazi o snažnoj povezanosti povišenih koncentracija fibrinogena, tromboze i kardiovaskularnih bolesti. Osim neosporne činjenice da povišene koncentracije fibrinogena same po sebi utječu na strukturu fibrinskog ugruška, fibrinogen ima značajnu ulogu u nastajanju tromboze sudjelovanjem u važnim hemostatskim procesima kao prethodnik fibrina, medijator agregacije trombocita i važan čimbenik koji značajno utječe na viskoznost plazme (68, 76, 77).





**Slika 5.** Shematski prikaz organizacije skupine gena *FGG-FGA-FGB* na 4. kromosomu koji kodiraju sintezu polipeptidnih lanaca  $\gamma$ ,  $A\alpha$  i  $B\beta$  molekule fibrinogena. Slika prikazuje i položaje najčešćih polimorfizama u genima *FGA* i *FGB*. Smjer transkripcije za svaki gen označen je strelicom, a kodirajuće regije ispunjenim pravokutnicima (modificirano prema 74, 75).

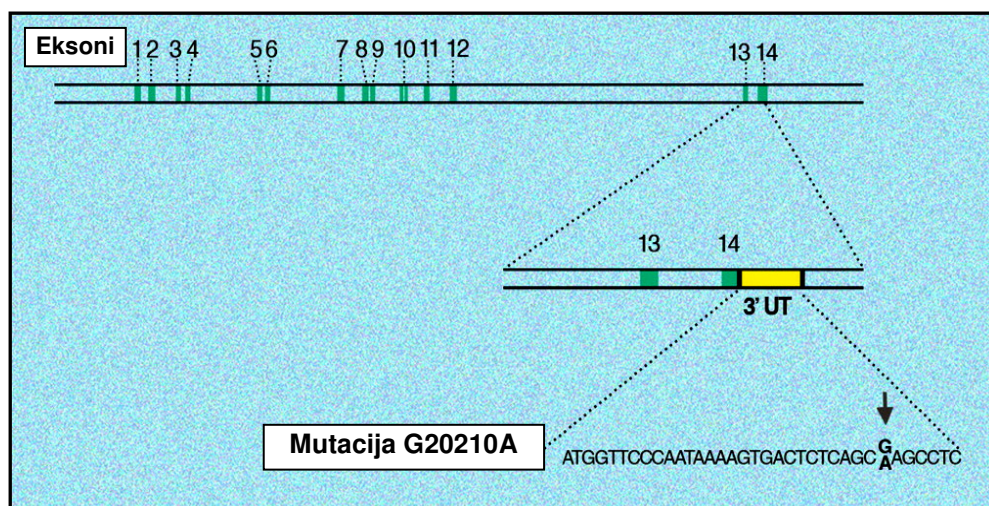
Polimorfizmi u fibrinogenским genima mogu utjecati na koncentraciju i kvalitetu sintetiziranog fibrinogena pa se stoga s vaskularnim bolestima mogu povezati polimorfizmi koji rezultiraju povišenim koncentracijama fibrinogena, abnormalnom (promijenjenom) strukturom ugruška ili poremećenom fibinolizom (73). Različiti su polimorfizmi utvrđeni u sva tri gena, od kojih najviše u lokusu koji kodira lanac  $B\beta$ . Nekoliko polimorfizama u promotorskoj regiji lanca  $B\beta$  fibrinogena povezuje se s povišenim koncentracijama fibrinogena, a jedan od najčešće ispitivanih je polimorfizam u kojem je gvanin zamijenjen adeninom na položaju -455 (-455 G>A) (78). Više je studija pokazalo kako nosioci alela A imaju više vrijednosti fibrinogena zbog povećane transkripcije lanca  $B\beta$  za 1,2-1,5 puta u odnosu na nosioce alela G (povećani rizik za kardiovaskularne bolesti i ishemijski MU u odraslih) (79). Povezanost ovog polimorfizma s MU u odrasloj populaciji pronađena je u 3 studije: Kessler i suradnici pronašli su povezanost genotipa AA s IMU velikih krvnih žila (80), Nishiuma i suradnici dvaput viši rizik za IMU u hipertenzivnih bolesnika nosioca alela A (81), a Martiskainen za lakunarnim IMU (79).

### 1. 2. 2. PROTROMBIN

Protrombin (FII) je protein ovisan o vitaminu K koji se sintetizira u jetri kao inaktivni prethodnik trombina. Aktivirani čimbenik zgrušavanja X (FXa) aktivira protrombin u

trombin. Trombin zauzima središnje mjesto u hemostatskom odgovoru organizma na ozljedu, izravnom aktivacijom trombocita i više čimbenika zgrušavanja: V, VIII, XI i XIII, što rezultira nastajanjem fibrinskog ugruška iz topljivog fibrinogena. Povišene aktivnosti protrombina izravno utječu na količinu stvorenog trombina pa time predstavljaju mogući protrombotički rizični čimbenik.

Poort i suradnici su 1996. godine opisali točkastu mutaciju koja nastaje zbog zamjene gvanina adeninom na položaju 20210 u 3' nekodirajućoj regiji u genu za protrombin (*F2*) (82). Gen *F2* veličine 21 kb smješten je na kromosomu 11 i sastoji se od 14 eksona (Slika 6.). Mutacija rezultira pojačanim izrezivanjem na 3' kraju s posljedičnim nakupljanjem mRNA (83). Mutacija ne utječe na strukturu molekule protrombina, ali je povezana s blagom hiperprotrombinemijom pa heterozigoti imaju približno 30%, a homozigoti 70% više aktivnosti od nosioca divljeg tipa (82). Pokazano je kako hiperprotrombinemija rezultira značajnim porastom stvaranja trombina, hiperkoagulabilnim stanjem i povećanim rizikom za vensku trombozu za približno 3-4 puta (84).



**Slika 6.** Točkasta mutacija G20210A u 3' nekodirajućoj regiji u genu za protrombin (*F2*) u kojoj je gvanin zamijenjen adeninom na položaju 20210 (prema 85).

Prevalencija mutacije razlikuje se s obzirom na geografsku rasprostranjenost i rasnu pripadnost. Ukupna prevalencija mutacije u općoj bjelačkoj populaciji iznosi približno 2%, s tim da je prevalencija od 2-4% u južnoj Europi dvaput veća od prevalencije u sjevernoj Europi. Izrazito je rijetko zastupljena u ostalim populacijama, tj. u Azijata i Afrikanaca kao i u domorodačkoj populaciji Australije i Amerike (86).

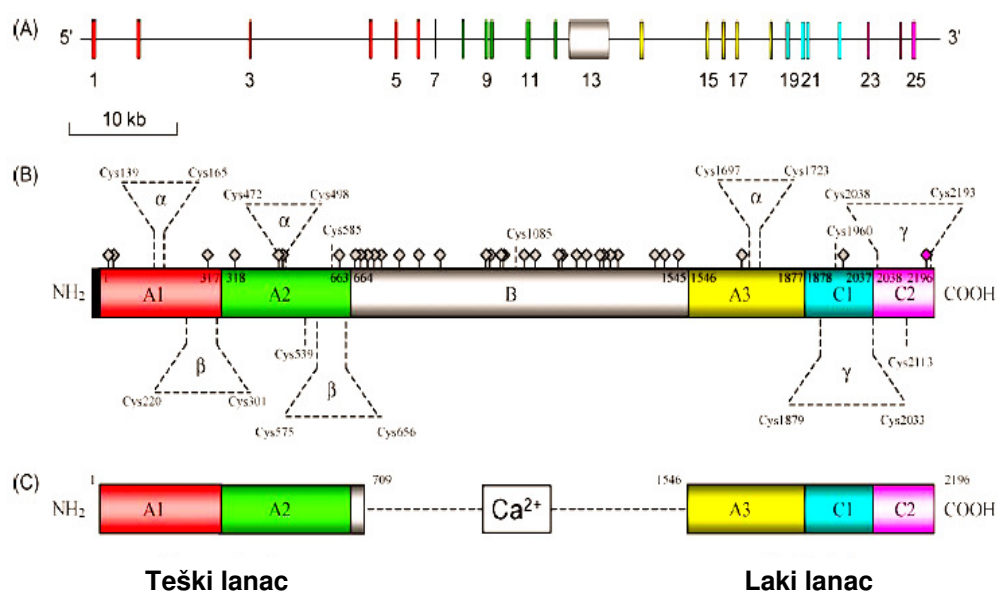
U zapadnoeuropskim zemljama mutacija je prisutna u 6-8% uzastopnih bolesnika s venskom trombozom i do 18% bolesnika s nerazjašnjenom obiteljskom anamnezom venske tromboze (82, 87).

### 1. 2. 3. KOAGULACIJSKI ČIMBENIK V (FV)

Koagulacijski čimbenik V (FV) je iznimno važan protein s dvojnog ulogom u održavanju hemostatske ravnoteže zbog izravnog sudjelovanja kako u prokoagulacijskom tako i u antikoagulacijskom mehanizmu zgrušavanja krvi. Sukladno tome, poremećaj u izražaju ili regulaciji prokoagulacijske ili antikoagulacijske funkcije FV može rezultirati krvarenjem ili trombozom (88).

#### 1. 2. 3. 1. Struktura i funkcije FV

Gen koji kodira FV (*F5*), veličine 80 kb, smješten je na dugom kraku 1. kromosoma na lokusu 1q23 (q21-25), a sastoji se od 25 eksona i 24 introna (89) (Slika 7A.).



**Slika 7.** Struktura ljudskog gena za FV (*F5*) i proteina FV. (A) Shematski prikaz strukture gena *F5*; (B) Struktura jednolančanog FV (Mr=330 kDa) sa shematskim prikazom rasporeda domena i položaja slobodnih cisteinskih ostataka i onih koji tvore disulfidne mostove dok su položaji N-glikozilacije prikazani sivim rombovima; (C) Struktura aktiviranog čimbenika V (FVa), heterodimera koji se sastoji od teškog (domene A1 i A2) i lakog lanca (domene A3, C1 i C2) koje su međusobno povezane kalcijevim ionom (prema 90).

FV je jednolančani GP molekularne mase 330 kDa čija koncentracija u plazmi iznosi 21 nmol/L. Od ukupnog FV, 20-25% je pohranjeno u trombocitnim  $\alpha$ -granulama u djelomično aktivnom obliku vezanom na multimerin (91). Plazmatski FV sintetizira se u jetri, dok se trombocitni FV manjim dijelom sintetizira u megakariocitima, a većim se dijelom adsorbira iz plazme endocitozom. Nativni je protein građen od 2224 aminokiseline i sadržava signalni peptid od 28 aminokiselina koji se otcjepljuje nakon premještanja u endoplazmatsku mrežicu. Molekula zrelog FV (Slika 7B.) koja se izlučuje u plazmu građena je od 2196 aminokiselina, a sastoji se od 3 domene A (A1, A2 i A3), središnje domene B i 2 domene C (C1 i C2). Strukturna građa FV (A1-A2-B-A3-C1-C2) je slična strukturnoj građi čimbenika VIII (FVIII). FV je podložan brojnim posttranslacijskim modifikacijama koje uključuju fosforilaciju, sulfataciju i glikozilaciju, pa je tako utvrđeno postojanje 2 funkcionalno različite varijante FV, nazvane FV<sub>1</sub> i FV<sub>2</sub>, koje su rezultat razlike u glikozilaciji domene C2 (92-94). Obje su varijante zastupljene i u krvi i u trombocitima u molarnom odnosu 33:67 (FV<sub>1</sub>:FV<sub>2</sub>).

Jednolančani FV je prokočimbenik koji tek nakon aktivacije postaje funkcionalan. Utvrđeno je kako FV aktivira nekoliko proteaza, među kojima trombin, FXa, enzim iz zmijskog otrova (engl. *Russel Viper Venom*, RVV-V) i plazmin. Trombin, kao najvažniji i ključni fiziološki aktivator, aktivira FV uzastopnim proteolitičkim cijepanjem 3 peptidne veze (Arg<sup>709</sup>, Arg<sup>1018</sup> i Arg<sup>1545</sup>) u domeni B, što rezultira izrezivanjem središnje domene B i njenim cijepanjem u 2 visokoglikozilirana ulomka molekularnih masa 71 i 150 kDa. Aktivacijom FV nastaju 2 ulomka, od kojih je prvi sastavljen od domena A1 i A2 (M<sub>r</sub>=105 kDa) i nazvan teškim lancem, dok je drugi nazvan lakim lancem (M<sub>r</sub>=74 kDa) koji je sastavljen od domena A3, C1 i C2 (90, 95). U molekuli aktiviranog FV (FVa) teški i laki lanac su međusobno povezani nekovalentnim vezama u prisutnosti kalcijevog iona (Slika 7C.).

Na teškom lancu FVa nalaze se vezna mjesta za FXa i protrombin, dok se na lakom lancu nalaze vezna mjesta za FXa i membranske fosfolipide. Aktivni kofaktor FVa veže se s FXa na trombocitnoj membrani u enzimski kompleks protrombinazu koji pretvara protrombin vezan na membranskoj površini u trombin (89). Iako i sam FXa može aktivirati protrombin, reakcija se odvija izrazito sporo. Za razliku od toga, ugradnjom FVa u kompleks, eksponencijalno se povećava katalitička aktivnost FXa i do 300.000 puta, što ujedno omogućava nastajanje fiziološki potrebnih količina trombina (95). Iako nije u potpunosti razjašnjena kofaktorska aktivnost FVa, smatra se kako djeluje kao receptor za FXa i čvrsto ga veže i zadržava na membranskoj površini.

Inaktivacija FVa odvija se slično aktivaciji FV, tj. proteolitičkim cijepanjem teškog lanca na položajima Arg<sup>306</sup>, Arg<sup>506</sup> i Arg<sup>679</sup>, djelovanjem aktiviranog proteina C (APC) u

prisutnosti proteina S (PS). Nakon početnog mjesta cijepanja na položaju 506, što rezultira 40 puta manjim afinitetom FVa za FXa, tek se daljnjim cijepanjem na položaju 306 FVa u potpunosti inaktivira, uz odvajanje domene A2 (88).

Nativni FV ima i antikoagulacijsku funkciju koja postaje izražena nakon cijepanja na položaju Arg<sup>506</sup> djelovanjem APC-a. Novonastali FV je kočimbenik koji ubrzava inaktivaciju aktiviranog čimbenika VIII (FVIIIa) posredovanu APC-om i PS (96).

### **1. 2. 3. 2. Nasljedna rezistencija na aktivirani protein C (APC)**

Molekularna osnova rezistencije (otpornosti) na APC (nasljedna rezistencija na APC) je u >95% slučajeva točkasta mutacija u genu *F5*. Mutacija nazvana FV Leiden nastaje zbog zamjene gvanina adeninom na položaju 1691 u eksonu 10, što rezultira sintezom proteina s promijenjenim aminokiselinskim slijedom u teškom lancu FVa u kojem je arginin zamijenjen glutaminom na položaju 506 (Arg506Gln, R506Q) (97). S obzirom da se mutacija nalazi na ciljnom mjestu djelovanja APC-a, istodobno je usporena inaktivacija (razgradnja) FVa za 10-20 puta, a smanjena je i antikoagulacijska kofaktorska aktivnost FV u inaktivaciji FVIIIa (98). Utvrđeno je kako heterozigoti za FV Leiden imaju 5-8 puta veći rizik za nastanak venske tromboze, a homozigoti čak 80 puta veći rizik (84, 99, 100).

Prevalencija FV Leidena značajno se razlikuje u različitim populacijama i iznosi od 2% do 15% u zdravoj bjelačkoj populaciji, s tim što je češće zastupljena u Skandinaviji i sjevernoj Europi, ali i na istočnom Mediteranu (88, 101). FV Leiden je prisutan u približno 18% bolesnika s dubokom venskom trombozom i u 40% bolesnika s obiteljskom trombofilijom (97).

Osim FV Leiden utvrđene su i druge mutacije i polimorfizmi koji doprinose rezistenciji na APC (Tablica 2.). Ispitivanjem utjecaja mutacija koje se nalaze na preostalim mjestima proteolitičkog cijepanja APC-om (306 i 679), pokazano je kako mutacije FV Cambridge (R306T, Arg306Thr) i FV Hong Kong (R306G, Arg306Gly) pokazuju samo blagu rezistenciju na APC, dok mutacija na položaju R679 ne rezultira rezistencijom na APC (102). Mutacija u teškom lancu FV Liverpool (I359T, Ile359Thr) također rezultira blagom rezistencijom na APC zbog novonastalog glikozilacijskog mjesta na položaju Asn<sup>357</sup> koje sterički ometa djelovanje APC-a, ali se povezuje s povećanim rizikom za nastanak tromboze u mlađoj životnoj dobi (102, 103).

**Tablica 2.** Prikaz mutacija i polimorfizama u FV koji su povezani s nasljednom rezistencijom na aktivirani protein C (prema 88).

| Zamjena nukleotida | Zamjena aminokiselina | Uobičajeni naziv | Domena | Ekson | Broj SNP* |
|--------------------|-----------------------|------------------|--------|-------|-----------|
| G1691A             | Arg506Gln             | FV Leiden        | A2     | 10    | rs6025    |
| G1091C             | Arg306Thr             | FV Cambridge     | A2     | 7     | /         |
| A1090G             | Arg306Gly             | FV Hong Kong     | A2     | 7     | /         |
| T2150C             | Ile359Thr             | FV Liverpool     | A2     | 8     | /         |
| G1628A             | Arg485Lys             | /                | A2     | 10    | rs6020    |
| T1328C             | Met385Thr             | Haplotip R2      | A2     | 8     | rs6033    |
| A4070G             | His1299Arg            |                  | B      | 13    | rs1800395 |
| A5380G             | Met1736Val            |                  | A3     | 16    | rs6030    |
| A6755G             | Asp2194Gly            |                  | C2     | 25    | rs6027    |
| A2391G             | Ser739Ser             | Alel A/G         | B      | 13    | rs6021    |
| A2663G             | Lys830Arg             |                  | B      | 13    | rs4524    |
| A2684G             | His837Arg             |                  | B      | 13    | rs4525    |
| A2683G             | Lys897Asp             |                  | B      | 13    | rs6032    |

\*SNP- polimorfizam jednog nukleotida

Blaga rezistencija na APC rezultat je i haplotipa R2 (HR2) koji je otkriven 1996. (104, 105). HR2 uključuje 13 polimorfizama u kodirajućoj regiji gena *F5*, u eksonima 13 i 16, među kojima je najčešće analiziran polimorfizam R2 (A4070G) u eksonu 13, zbog kojeg dolazi do zamjene histidina argininom na položaju 1299 (H1299R, His1299Arg) u domeni B (106, 107). Kako je između polimorfizama unutar haplotipa utvrđena neravnotežna povezanost, za potvrdu prisutnosti HR2 dovoljno je utvrditi polimorfizam R2 (108). Uz polimorfizam R2 još je 3 polimorfizma: M385T (Met385Thr), M1736V (Met1736Val) i D2194G (Asp2194Gly) povezano sa sniženim vrijednostima FV u plazmi i blagom rezistencijom na APC, ali samo u homozigota, dok kod heterozigota to nije slučaj (109). HR2 je relativno često zastupljen u Europi, Aziji, Africi i Australiji, s utvrđenom učestalosti alela R2 u zdravoj populaciji, većoj od FV Leidena, u rasponu od 5 do 17% (105, 110-112).

O povezanosti ovog haplotipa s venskom trombozom dobiveni su proturječni rezultati. Prema nekim studijama prisutnost ovog haplotipa predstavlja blagi neovisni rizični čimbenik za nastanak venske tromboze, dok je prema drugim studijama povezanost s venskom trombozom utvrđena samo u slučaju kad je uz ovaj haplotip prisutan i FV Leiden (105, 113, 114).

## 1. 2. 4. KOAGULACIJSKI ČIMBENIK XIII (FXIII)

### 1. 2. 4. 1. Struktura i funkcija FXIII

Koagulacijski čimbenik XIII (FXIII) je protransglutaminaza koja se u plazmi nalazi kao heterotetramer sastavljen od po 2 podjedinice A i B (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Podjedinice se sintetiziraju odvojeno pa se tako podjedinica A, koja je ujedno aktivni dio FXIII (FXIII-A), sintetizira u megakariocitima i monocitima/makrofazima, dok se podjedinica B (FXIII-B) koja ima ulogu proteinskog nosača FXIII-A sintetizira u hepatocitima. FXIII-B se nalazi u plazmi u suvišku te se približno 50% FXIII-B u plazmi nalazi u slobodnom obliku. Za razliku od toga FXIII-A se u plazmi nalazi isključivo vezan u kompleksu s FXIII-B. Strukturno različit FXIII nalazi se u trombocitima, megakariocitima i monocitima, ali isključivo kao dimer sastavljen od 2 podjedinice A (FXIII-A<sub>2</sub>). Izrazito visoka koncentracija FXIII-A<sub>2</sub> nalazi se u trombocitima i to približno 100-150 puta viša od one u plazmi (115).

U cirkulaciji je >90% FXIII vezano na fibrinogen na kojem se nalazi vezno mjesto za FXIII-B, pa fibrinogen služi kao nosač neaktivnog oblika FXIII u cirkulaciji (116). FXIII se aktivira u završnoj reakciji koagulacijske kaskade djelovanjem trombina i kalcijevih iona. Prvo trombin proteolitički otcjepljuje aktivacijski peptid građen od 37 aminokiselina s N-terminalnog dijela FXIII-A, nakon čega se u prisutnosti kalcijevih iona odvajaju FXIII-B od tetramera, a dimer FXIII-A postaje aktivan oblik FXIII (FXIIIa). Otcjepljivanje aktivacijskog peptida ubrzava se za približno 100 puta u prisutnosti fibrinogena i proteolitičkih produkata fibrina (polimerizirani des-A i des-A,B fibrinogen) (115).

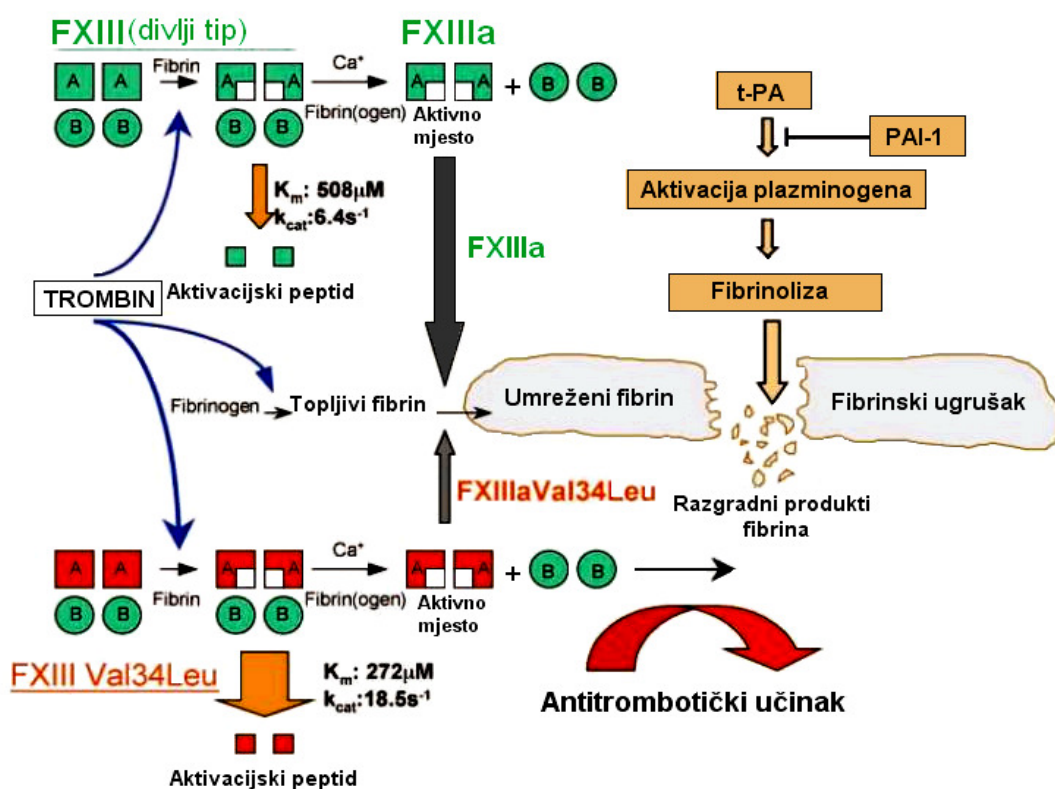
FXIIIa je transglutaminaza (EC 2.3.2.13) koja katalizira nastajanje poprečnih kovalentnih veza između glutaminskih i lizinskih ostataka dva susjedna  $\gamma$ -lanca fibrina pri čemu nastaju dimeri  $\gamma$ -lanaca, kao i polimerizaciju  $\alpha$ -lanaca fibrina. Na taj se način povećava mehanička čvrstoća fibrinskih polimera koji ujedno postaju zaštićeni od fibrinolitike razgradnje (117).

Gen za FXIII-A (*F13A*) nalazi se na 6. kromosomu i sastoji se od 15 eksona odvojenih pomoću 14 introna i kodira polipeptid od 731 aminokiseline. Opisano je >20 mutacija u genu *F13A* u bolesnika s izraženim manjkom FXIII koje rezultiraju čak i potpunim nedostatkom FXIII-A. FXIII-A je polimorfan protein pa je poznato 5 polimorfizama koji rezultiraju zamjenom aminokiselina u polipeptidu i nisu povezani s manjkom FXIII i sklonosti krvarenju: Val34Leu, Tyr204Phe, Leu564Pro, Val650Ile i Glu651Gln, od kojih je relativno često zastupljen u populaciji i najčešće ispitan Val34Leu (117).



#### 1. 2. 4. 2. Polimorfizam FXIII-A Val34Leu

Polimorfizam FXIII-A Val34Leu je točkasta mutacija (G100T) u kodonu 34 u eksonu 2, u genu *F13A* u kojoj je gvanin zamijenjen timinom, što rezultira zamjenom valina leucinom (FXIII-A Val34Leu). Iako je polimorfizam prvi put opisan u finskoj populaciji u bolesnika s manjkom FXIII-A, zaključeno je kako polimorfizam nije uzrok manjka FXIII-A jer je homozigotni oblik utvrđen i u zdravih ispitanika (118). S obzirom da se polimorfizam nalazi u neposrednoj blizini aktivacijskog mjesta djelovanja trombina od kojeg je udaljen samo 3 aminokiseline, pretpostavljeno je kako bi ovaj polimorfizam mogao utjecati na aktivaciju FXIII. Dokazano je da je u nosioca alela Leu34 otcjepljivanje aktivacijskog peptida i aktivacija FXIII trombinom 2,5 puta brža, i to kod niže koncentracije trombina, nego u nosioca alela Val34 (Slika 8.). Brža aktivacija FXIII rezultira i ubrzanim umreženjem fibrina kao i većim stupnjem ugradnje inhibitora plazmina u fibrin (119).



**Slika 8.** Aktivacija FXIII i mogući antitrombotički utjecaj polimorfizma FXIII-A Val34Leu na nastajanje fibrinskog ugruška. Nakon aktivacije FXIII trombinom, otcjepljuje se mali aktivacijski peptid od podjedinice A. U sljedećem koraku podjedinica B koja služi kao nosač podjedinice A odvađa se od tetramera, pa aktivno mjesto FXIII postaje dostupno za reakciju umreženja. Stupanj aktivacije FXIII i otcjepljenje aktivacijskog peptida ovisno je o polimorfizmu Val34Leu (s porastom katalitičke koncentracije, ali uz smanjenu konstantu  $K_m$  u prisutnosti alela Leu). Ove promjene dovode do prijevremenog iscrpljivanja (nestajanja) FXIII-A Val34Leu i smanjene reakcije umreženja (prema 119).



Pokazano je da polimorfizam nema utjecaj ni na koncentraciju FXIII u plazmi niti na enzimsku aktivnost FXIII-A, ali su novija istraživanja ukazala na utjecaj polimorfizma na strukturu fibrinskog ugruška ovisno o koncentraciji fibrinogena u plazmi. Kod homozigota za alel Leu koji su ujedno imali povišenu koncentraciju fibrinogena u plazmi dokazano je da su fibrinska vlakna gušća, poroznija i podložnija fibrinolizi, dok su kod niž koncentracija fibrinogena fibrinska vlakna bila tanja, gušće pakirana i manje porozna. Za razliku od toga, u nosioca divljeg tipa nisu uočene strukturne promjene ugruška bez obzira na koncentraciju fibrinogena (119).

Utvrđena je izrazita razlika u prevalenciji ovog polimorfizma prema etničkoj pripadnosti, pa je relativno čest u bjelačkoj populaciji u kojoj iznosi približno 25%, a posebice u nekim južnoameričkim indijanskim plemenima (40%), dok je vrlo rijetko zastupljen u Japanaca u svega 0,01% (120).

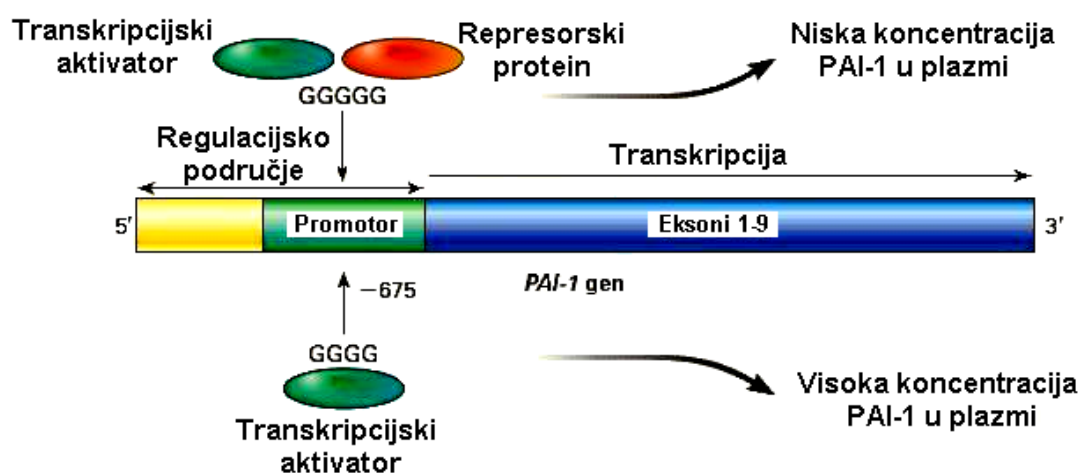
Smatra se kako ovaj polimorfizam ima antitrombotički učinak u okluzivnoj arterijskoj bolesti i venskoj trombozi. Dosad je objavljeno 16 istraživanja o povezanosti polimorfizma Val34Leu s IMU, od kojih samo 2 u dječjoj populaciji. U većini studija nije pronađena povezanost, u 3 studije dokazana je zaštitna uloga alela Leu34, dok je u samo jednoj studiji alel Leu34 bio značajno povezan s povišenim rizikom za IMU. Prema objavljenim rezultatima izgleda da ovaj polimorfizam nema zaštitnu ulogu, ali nije niti značajan rizični čimbenik za IMU (117).

### **1. 2. 5. INHIBITOR AKTIVATORA PLAZMINOGENA 1 (PAI-1)**

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) je uz inhibitor plazmina glavni inhibitor fibrinolitičkog sustava, koji brzim i specifičnim djelovanjem inhibira oba aktivatora plazminogena (serinske proteaze): tkivni aktivator plazminogena (engl. *tissue type plasminogen activator*, t-PA) i urokinazni aktivator plazminogena (engl. *urokinase plasminogen activator*, u-PA). (121).

PAI-1 je jednolančani GP iz skupine inhibitora serinskih proteaza (serpina) koji je građen od 379 aminokiselina s molekularnom masom od 48 kDa. Veže se na t-PA i u-PA uz nastajanje stabilnog kompleksa u omjeru 1:1 koji se izlučuje preko hepatocita. Trombociti i endotelne stanice sintetiziraju aktivni oblik PAI-1 koji je nestabilan s poluvremenom života od 30 minuta, a u plazmi se veže na vitronektin, što stabilizira aktivni oblik.

Ljudski gen za PAI-1 (*SERPINE1*) smješten je na dugom kraku 7. kromosoma, lokus 7q21.3-q22 i sastoji se od 9 eksona i 8 introna (121, 122). Unutar gena opisano je nekoliko polimorfizama od kojih je dosad najčešće ispitivan polimorfizam jedne baze (4 ili 5 gvaninskih baza, gvanozina) u promotorskoj regiji gena 675 parova baza (pb) uzvodno od početnog mjesta transkripcije (4G/5G). Dokazana je povezanost koncentracije PAI-1 u plazmi i polimorfizma 4G/5G, pa tako homozigoti za alel 4G imaju približno 25% višu koncentraciju PAI-1 u plazmi od homozigota za alel 5G. Razlog tome je različito vezanje transkripcijskih regulacijskih proteina, pa je tako povećana transkripcija gena povezana s 4 gvanozina (alel 4G) i rezultira vezanjem samo transkripcijskog aktivatora, za razliku od 5 gvanozina (alel 5G) kad se uz transkripcijski aktivator veže i represorski protein koji smanjuje vezanje aktivatora (Slika 9.).



**Slika 9.** Struktura gena za inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) i položaj polimorfizma 4G/5G u promotorskoj regiji. Polimorfizam 4G/5G na položaju -675 utječe na transkripciju i koncentraciju PAI-1 u plazmi. Povećana transkripcija gena povezana je s 4 gvanozina (alel 4G) što rezultira vezanjem samo transkripcijskog aktivatora, dok se kod 5 gvanozina (alel 5G) uz transkripcijski aktivator veže i represorski protein te na taj način smanjuje vezanje aktivatora (prema 121).

Povišene koncentracije PAI-1 mogu narušiti normalan fibrinolitički proces uklanjanja fibrina, čime potiču povećano odlaganje fibrina i posljedično trombotičke događaje. Povezanost polimorfizma 4G/5G i MU još uvijek nije jasna. Neki autori smatraju da genotip 4G/4G predstavlja povećani rizik za MU, neki nisu utvrdili povezanost, a poneki čak smatraju da ima zaštitnu ulogu. Meta-analiza Tsantesi i suradnika (123) koja je uključivala 18 studija nije pokazala značajnu povezanost između polimorfizma i IMU, ali je pretpostavljeno kako je porast PAI-1 u reakcijama akutne faze izraženiji u bolesnika s alelom 4G pa bi ovaj

polimorfizam mogao imati utjecaj na rizik od IMU u akutnim stresnim situacijama zajedničkim djelovanjem s drugim prokoagulacijskim čimbenicima (123).

### **1. 3. METABOLIZAM HOMOCISTEINA**

Homocistein (Hcy) je aminokiselina koja sadrži tiolnu skupinu, a kako nije sastavni dio proteina, nije je moguće unijeti u organizam ishranom. Nastaje isključivo kao međuprodukt u metabolizmu metionina, jedine esencijalne aminokiseline koja sadrži sumpor i koja ujedno predstavlja jedini izvor Hcy u ljudskom organizmu.

Koncentraciju Hcy u plazmi kontroliraju 2 metabolička puta: remetilacija Hcy u metionin (metioninski ciklus) i transsulfuracija Hcy u cistein (transsulfuracijski ciklus), pri čemu je S-adenozilmetionin (SAM) važan regulator oba metabolička puta (Slika 10.). U fiziološkim uvjetima približno 50% Hcy se remetilira, dok se preostalih 50% Hcy katabolizira transsulfuracijom (124).

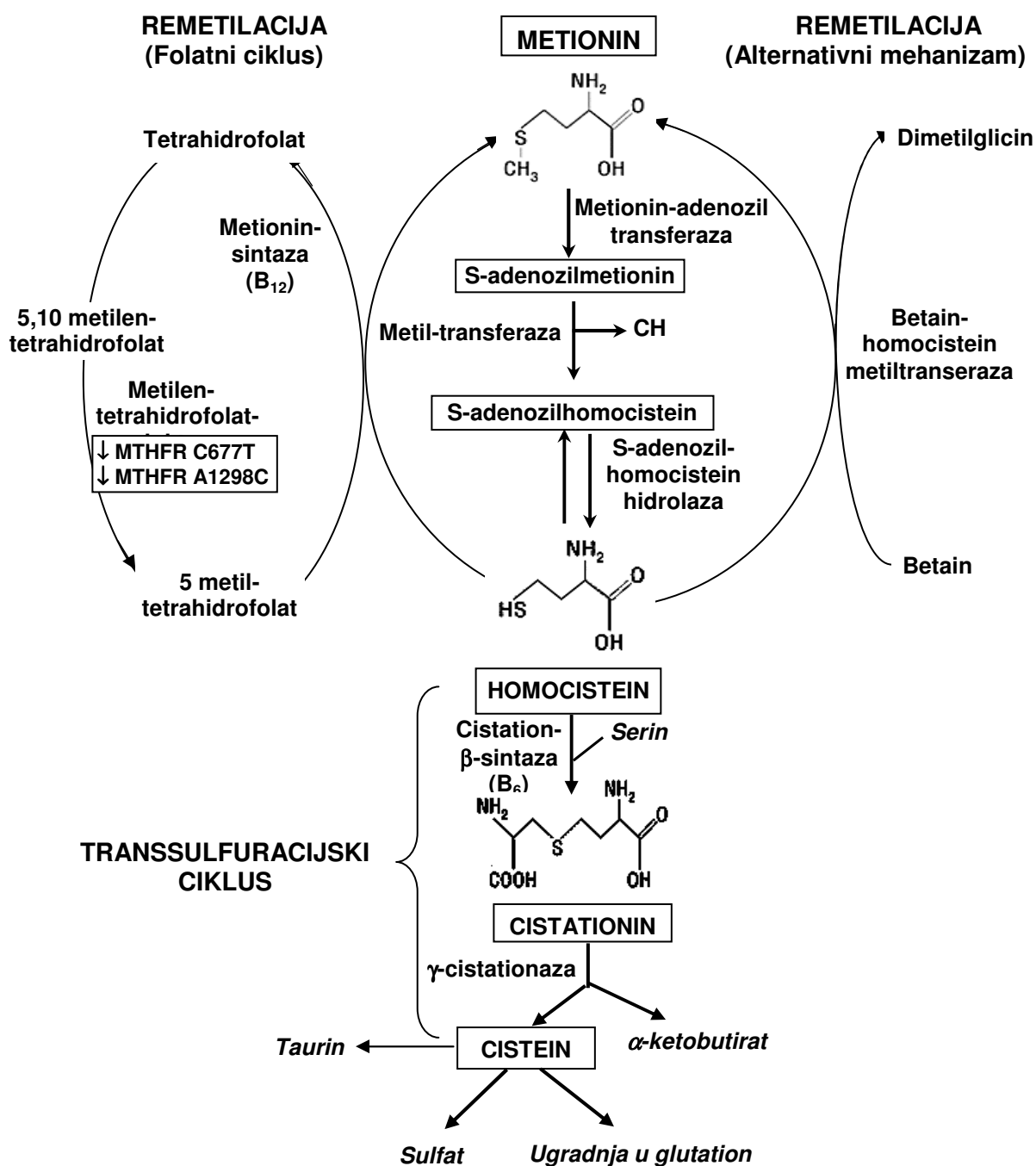
#### **1. 3. 1. METIONINSKI CIKLUS**

U stanici Hcy nastaje u metioninskom ciklusu demetilacijom metionina. Metionin adenozil-transferaza u prisutnosti adenozin-trifosfata (ATP) aktivira metionin u univerzalni donor metilne skupine SAM koji sudjeluje u više od 100 reakcija koje uključuju metilaciju nukleinskih kiselina, proteina, fosfolipida, mijelina, polisaharida, kolina i kateholamina (125, 126). Prijenosom metilne skupine na metiltransferaze iz SAM-a nastaje međuprodukt S-adenozilhomocistein koji se razgrađuje u Hcy i adenozin djelovanjem S-adenozilhomocistein-hidrolaze. Na taj se način obnavlja Hcy, omogućava novi prijenos metilne skupine i samim tim stalno održava metioninski ciklus.

Hcy se remetilira u metionin pomoću 2 različita mehanizma. U prvom mehanizmu (folatni ciklus), koji se ujedno i češće odvija, djelovanjem metionin-sintaze (MS) u prisutnosti kočimbenika vitamina B<sub>12</sub>, iz 5-metiltetrahidrofolata (5-MTHF) nastaje tetrahidrofolat (THF). Nastali THF se reciklira u 5-MTHF u dva koraka, pri čemu prvo nastaje 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-MTHF), koji se nakon toga reducira u 5-MTHF djelovanjem metilentetrahidrofolat-reduktaze (MTHFR). Drugi se remetilacijski mehanizam odvija rjeđe i pomaže folatnom ciklusu u održavanju metioninskog ciklusa i sintezi SAM-a. Ovaj

mehanizam nije ovisan ni o vitaminu B<sub>12</sub> ni o folatima, ali je za reakciju nužan betain kao donor metilne skupine i betain-homocistein-metiltransferaza (BHMT), pri čemu nastaje dimetilglicerin i metionin (124).

Folatni se ciklus odvija u svim tkivima, dok je alternativni remetilacijski mehanizam ograničen na jetru, a pretpostavka je da se odvija i u bubrezima (127).



**Slika 10.** Metabolizam homocisteina i utjecaj mutacija MTHFR C677T i MTHFR A1298C (modificirano prema 126, 128).

### 1. 3. 2. TRANSSULFURACIJSKI CIKLUS

Hcy se metabolizira transsulfuracijskim ciklusom kad je koncentracija metionina viša od koncentracije potrebne za normalno odvijanje metioninskog ciklusa, kad je nadmašen kapacitet remetilacije folatnog ciklusa ili u slučaju kad je potrebna sinteza cisteina (126). U transsulfuracijskom ciklusu se iz metionina sintetizira cistein. Prve tri reakcije ciklusa istovjetne su reakcijama metioninskog ciklusa koje završavaju nastajanjem Hcy. Cystationin  $\beta$ -sintaza (CBS) u prisutnosti vitamina B<sub>6</sub> katalizira ključnu, u fiziološkim uvjetima nepovratnu reakciju u transsulfuracijskom ciklusu, spajanje Hcy sa serinom i nastajanje cystationina. U sljedećem koraku, u reakciji koja je ovisna o vitaminu B<sub>6</sub>, razgradnjom cystationina nastaje cistein (prethodnik glutationa) i  $\alpha$ -ketobutirat djelovanjem  $\gamma$ -cystationaze. Suvišak cisteina se oksidira u taurin i anorganske sulfate ili izlučuje mokraćom. Uloga transsulfuracijskog ciklusa je, uz sintezu cisteina i katabolizam prekomjernog Hcy, nastajanje sulfata potrebnih za sintezu heparina, heparan-, dermatan- i kondroitin sulfata (127).

### 1. 3. 3. POLIMORFIZMI GENA *MTHFR*

MTHFR je flavoprotein, enzim (EC 1.5.1.20) koji katalizira demetilaciju 5,10-MTHF u najzastupljeniji cirkulirajući oblik folata u krvi 5-MTHF (Slika 10.). Nužan je u remetilaciji Hcy u metionin kao donor metilne skupine.

Gen *MTHFR* se nalazi na 1. kromosomu (1p36.3) i sadrži 11 eksona i 10 introna. Najčešći polimorfizam koji je povezan s blagom hiperhomocisteinemijom je zamjena nukleotida citozina timinom na položaju 677 (C677T) u eksonu 4, što uzrokuje zamjenu valina alaninom na položaju 226 i rezultira sintezom enzima s pojačanom osjetljivosti na temperaturu i sa sniženom ukupnom aktivnosti za 30-50% (129). Učestalost ove mutacije je različita s obzirom na rasnu i etničku pripadnost. Česta je u bjelačkoj populaciji i u Azijata, kod kojih učestalost homozigota za alel T iznosi 10-13%, a heterozigota 50%, dok je vrlo rijetko zastupljena u Afroamerikanaca. Hiperhomocisteinemija je prisutna samo u homozigota, posebice u onih s manjkom endogenih folata.

U istom je genu opisana i druga mutacija u eksonu 7 u kojoj je adenin zamijenjen citozinom na položaju 1298 (A1298C), što u MTHFR uzrokuje zamjenu glutaminske kiseline alaninom (130, 131). Rezultat ove mutacije je, slično mutaciji C677T, smanjena aktivnost enzima MTHFR koja je više izražena u homozigota, ali za razliku od mutacije C677T enzim nije pojačano osjetljiv na temperaturu. Smanjena aktivnost MTHFR je izraženija u slučaju

istodobne pojave oba polimorfizma, kao i utjecaj na porast koncentracije Hcy u odnosu na utjecaj kod prisutnosti samo jedne mutacije.

## **1.4. GENI KOJI KONTROLIRAJU INTERMEDIJARNE RIZIČNE ČIMBENIKE**

S obzirom da je, za razliku od odraslih, ateroskleroza u djece zanemariva i ne predstavlja značajan rizični čimbenik za nastanak MU, mehanizmi koji dovode do početnog oštećenja endotela i služe kao okidači za nastanak MU su nepoznati i nedovoljno istraženi. Pretpostavka je da bi polimorfizmi u genima koji kontroliraju intermedijarne rizične čimbenike, kao što su arterijska stenoza, hipertenzija, hiperlipidemija i hiperhomocisteinemija, mogli imati važnu ulogu (10).

### **1.4.1. ANGIOTENZIN-KONVERTIRAJUĆI ENZIM (ACE)**

Angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*, ACE) je dipeptidil-karboksiptidaza (EC 3.4.15.1), metaloproteinaza koja sadrži cink u aktivnom centru, a enzimska aktivnost je ovisna o kloridima. Prisutan je u različitim tkivima i stanicama primarno kao integralni GP stanične membrane na luminalnoj površini endotelnih stanica krvnih žila, a posebice je izražen u plućnim i moždanim kapilarama u mikrocirkulaciji. Osim u endotelnim stanicama nalazi se i u epitelnim stanicama četkaste prevlake bubrežnih tubula, crijeva i koroidnom plexusu (132). Plazmatski ACE uglavnom potječe iz endotelnih stanica.

ACE ima važnu ulogu u dva fiziološka hormonska sustava: renin-angiotenzinskom i kinin-kalikreinskom sustavu. Odgovoran je za pretvorbu neaktivnog deka-peptida angiotenzina I (Ang I ili Ang 1-10) u aktivni oktapeptid angiotenzin II (Ang II ili Ang 1-8) s vazokonstriktorskim djelovanjem, koji je ujedno i glavni aktivni produkt renin-angiotenzinskog sustava. Nadalje, ACE metabolizira bradikinin, vazodilatator sa snažnim djelovanjem (neurokinin koji uzrokuje proširenje krvnih žila) u neaktivni metabolit bradikinin 1-5, čime dodatno doprinosi suženju krvnih žila i regulaciji krvnog tlaka.

Istraživanja o genskim polimorfizmima započela su 1988. godine nakon otkrića Cambiena i suradnika o genskoj regulaciji aktivnosti ACE (133). Ljudski gen *ACE* je

smješten na dugom kraku 17. kromosoma, na lokusu 17q23, dugačak je 21 kb i sastoji se od 26 eksona i 25 introna. Gen je odgovoran za izražaj 2 izoforme ACE: somatskog (sACE), građenog od 1300 aminokiselina s molekularnom masom od 170 kDa i prisutnog u somatskim stanicama, te germinalnog ili testikularnog (t-ACE) s manjom molekularnom masom od 100 kDa prisutnog samo u testisima.

#### 1. 4. 1. 1. Polimorfizam I/D u genu *ACE*

Kloniranje ljudskog gena *ACE* omogućilo je otkrivanje mnogobrojnih polimorfizama, pa je prema Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) poznato više od 160 polimorfizama uglavnom jednog nukleotida (SNPs), od kojih se samo 34 nalaze u kodirajućoj regiji (132).

Najčešće ispitivan polimorfizam *ACE* je insercijsko-delecijski polimorfizam (I/D), kojeg su prvi opisali Rigat i suradnici 1990. godine (134). Autori su pronašli da dolazi do umetanja slijeda od 287 pb (NCBI ref. SNP ID: rs1799752) u ponovljenim redosljedima *Alu* sekvencama u intronu 16, što rezultira intronskim alelom I, odnosno delecijskim alelom D u slučaju kad nema insercije (Slika 11.).



**Slika 11.** Shematski prikaz gena *ACE* s naznačenim položajem insercijsko/delecijskog (I/D) polimorfizma (prema 132).

Polimorfizam je povezan sa stupnjem aktivnosti ACE i odgovoran za približno 50% interindividualnih razlika aktivnosti ACE u plazmi i u tkivu. Homozigoti za alel D imaju otprilike dvostruko višu aktivnost ACE u odnosu na homozigote za alel I, dok heterozigoti (I/D) imaju srednje aktivnosti ACE (134).

Smatralo se da je ovaj polimorfizam odgovoran za dugovječnost, a uvrđen je i utjecaj genotipa I/I na rani rast nakon rođenja, posebice u muške populacije. Brojna su istraživanja

pokazala povezanost ovog polimorfizma s različitim bolestima: šećernom bolesti, dijabetičkom nefropatijom, Alzheimerovom i Parkinsonovom bolesti te karcinomom dojke (135). Iako su dobiveni proturječni rezultati za koronarnu srčanu bolest, opsežna je meta-analiza pokazala samo povezanost polimorfizma gena ACE s aktivnosti enzima u plazmi, ali ne i povezanost s kardiovaskularnim bolestima (136). Iako je pokazana značajna, ali blaga povezanost između alela D i ishemijskog MU u odraslih u 2 meta-analize (137, 138), to nije potvrđeno u kasnije provedenoj prospektivnoj studiji (139).

#### 1. 4. 2. APOLIPOPROTEIN E (APOE)

Apolipoprotein E (apoE) je GP molekularne mase 34 kDa, građen od 299 aminokiselina, s višestrukim biološkim funkcijama (140). Iako se uglavnom sintetizira u jetri, u manjoj se mjeri sintetizira u makrofagima i u drugim organima i tkivima, prije svega u mozgu, slezeni, bubrezima, spolnim i nadbubrežnim žlijezdama (141, 142). Strukturni je protein hilomikrona, lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL), srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoprotein*, IDL) i velike gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL) (143). Utvrđeno je da je apoE specifični visokoafinitetni ligand za nekoliko staničnih receptora za:

- lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL)
- protein sličan LDL receptoru (engl. *LDL receptor related protein 1*, LRP1)
- VLDL
- apoE (LRP8) (144)

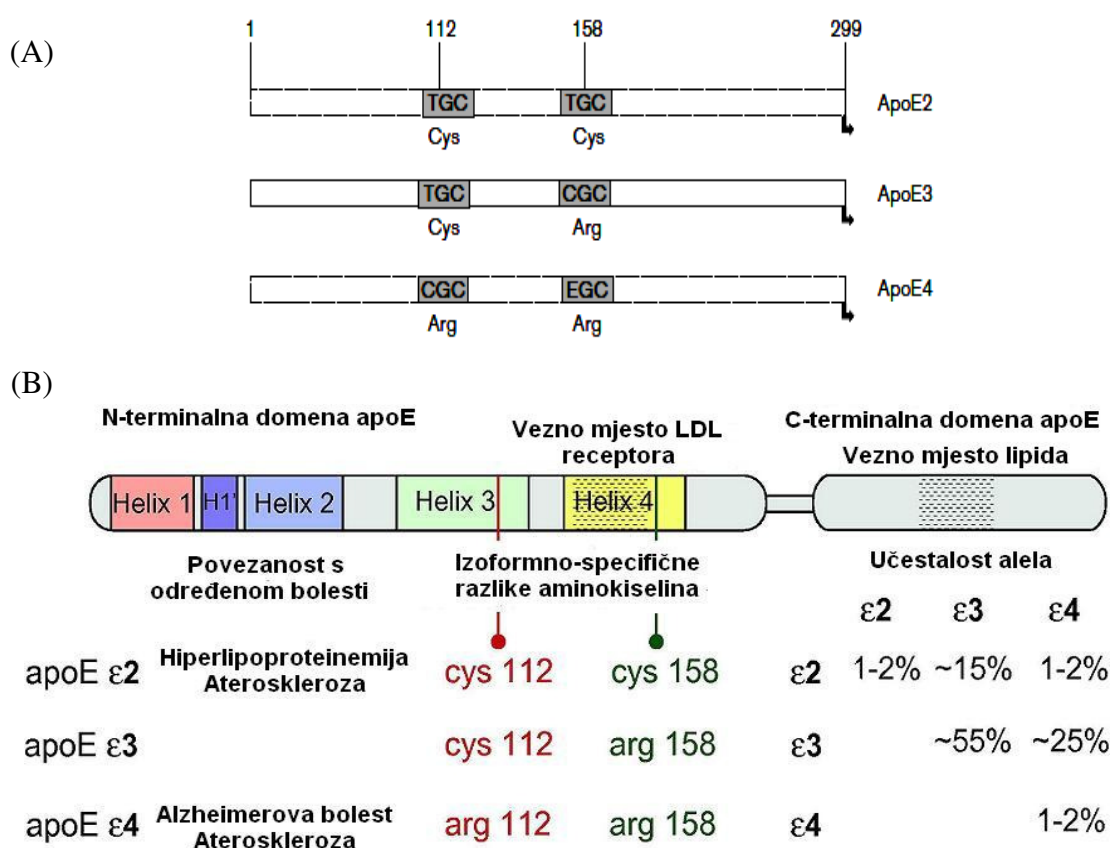
ApoE je jedan od najvažnijih proteina koji regulira i kontrolira metabolizam lipida, posebice transport kolesterola i metabolizam lipoproteinskih čestica čime izravno utječe na međustaničnu raspodjelu lipida i kolesterola (145-147). Specifično vezanje apoE na LDL receptor nužno je za katabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima, hilomikrona i VLDL-a, te uklanjanje njihovih visokoaterogenih ostataka, ostatnih hilomikrona i IDL-a iz plazme (148). Kao sastavni dio HDL-kolesterola apoE je uključen i u obrnuti transport kolesterola, a aktivira i nekoliko lipolitičkih enzima kao što su jetrena lipaza, lipoproteinska lipaza i lecitin-kolesterol-acil-transferaza. Osim osnovne uloge, smatra se kako je apoE uključen u mnoge



druge fiziološke i patološke procese koji uključuju imunoregulaciju, homeostazu neurona, obnavljanje živaca i tkiva (149).

Gen odgovoran za sintezu apoE (*APOE*) veličine 3,6 kb smješten je na 19. kromosomu (lokus 19q13.2) u blizini genskog kompleksa za apoC-I/C-II, te se sastoji od 4 eksona i 3 introna (150, 151). Kako je strukturni genski lokus *APOE* polimorfan postoje 3 osnovna alela  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  i  $\epsilon 4$  koji definiraju 6 mogućih genotipova i pripadajućih fenotipova.

Aleli su definirani kombinacijom 2 kodirajuća SNP-a u 4. eksonu gena *APOE* (*rs429358* i *rs7412*), a razlikuju se s obzirom na prisutnost citozina ili timina u kodonima 112 i 158, što rezultira sintezom jedne od 3 proteinske izoforme: E2, E3 ili E4. Izoforme apoE2 i apoE4 razlikuju se od apoE3 samo u 1 aminokiselini, pa tako apoE3 sadrži cistein na položaju 112 i arginin na položaju 158 aminokiselinskog slijeda, dok apoE2 sadrži na oba položaja cistein, a apoE4 arginin (Slika 12A.) (140, 150).



**Slika 12.** (A) Molekularna osnova polimorfizma *APOE* koja je odgovorna za sintezu 3 izoforme apoE (E2, E3 i E4) kao posljedicu prisutnosti citozina ili timina u kodonima 112 i 158; (B) Linearni dijagram strukturne organizacije apoE prikazuje pojedine funkcionalne regije, izoformno-specifične razlike aminokiselina na položajima kodona 112 i 158, učestalost pojedinih alela, kao i povezanost pojedine izoforme s rizikom za određenu bolest (prema 141, 151).

ApoE se sastoji od 2 strukturne domene, aminoterminalne i karboksiterminalne, od kojih je svaka domena odgovorna za različite važne funkcije samog apolipoproteina. Domene su međusobno odvojene petljom, unutar koje se nalazi područje gdje se odvija proteolitičko cijepanje trombinom. Aminoterminalnu domenu čini 191 aminokiselinskih ostataka (položaji 1-191) strukturno organiziranih u 4 antiparalelne uzvojnice u obliku svežnja. Unutar ove domene, na položajima 112 i 158 nalaze se polimorfni aminokiselinski ostaci koji definiraju izoforme apoE, dok aminokiselinski ostaci smješteni na četvrtoj uzvojnici na položajima 134-150 uz Arg<sup>172</sup> čine vezno mjesto za LDL receptor. Aminokiselinski ostaci na položajima 225-299 definiraju karboksiterminalnu domenu unutar koje aminokiselinski ostaci na položajima 244-272 predstavljaju vezno mjesto za površinske lipoproteine (Slika 12B.) (141, 152, 153).

Istraživanja provedena u različitim populacijama ukazala su na različite učestalosti pojedinih alela, pa je tako najveća učestalost (65-70%) utvrđena za alel ε3 u svim ispitivanim populacijama, dok je najmanja frekvencija (5-10%) utvrđena za alel ε2 (147, 152, 154). Od genotipova najčešći je genotip ε3/3, koji se stoga smatra referentnim, a prema utvrđenim učestalostima slijede genotipovi ε3/4, ε2/3, ε4/4, ε2/4 i ε2/2 (Slika 12B.) (141, 155).

Polimorfizam *APOE* izravno utječe na koncentraciju genskog produkta, pa nosioci alela ε2 imaju višu, a nosioci alela ε4 nižu koncentraciju apoE. Nadalje, brojna populacijska istraživanja dokazala su utjecaj alela i genotipova *APOE* na plazmatske koncentracije lipoproteina (148). U usporedbi s nosiocima alela ε3, nosioci alela ε2 imaju niže koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola te više koncentracije HDL-kolesterola, dok nosioci alela ε4 imaju više koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola te niže koncentracije HDL-kolesterola bez obzira na spol (148, 151, 154). Ovim genskim polimorfizmom moguće je objasniti 2-5% interindividualnih razlika u koncentraciji ukupnog, te 4-15% interindividualnih razlika u koncentraciji LDL-kolesterola (156, 157).

Pronađeno je i da su u općoj populaciji aleli ε2 i ε4 povezani s višim koncentracijama triglicerida u plazmi (147, 158). Plazmatska koncentracija apoE odrednica je metabolizma lipoproteina bogatih trigliceridima te može objasniti 20-40% razlika u koncentracijama triglicerida (146).

Polimorfizam *APOE* utječe na funkcijska i strukturna svojstva apoE pa izoforme imaju različit afinitet prema specifičnim lipoproteinskim receptorima, s tim što apoE3 i apoE4 imaju podjednaki afinitet, dok apoE2 ima čak 100 puta manji afinitet prema LDL-receptoru u usporedbi s apoE3 i apoE4 (148, 151, 153). Stoga se zbog izrazito smanjenog afiniteta prema LDL-receptoru, svi lipoproteini koji sadrže apoE2 sporije uklanjaju iz plazme i potiču

regulacijsko povećanje broja LDL-receptora te posljedično nižu koncentraciju ukupnog kolesterola u plazmi, dok se suprotno tome lipoproteini koji sadrže apoE4 brže uklanjaju iz plazme potičući regulacijsko sniženje broja LDL receptora i povišenu koncentraciju ukupnog kolesterola.

Brojni literaturni podatci ukazuju da osim izravnog utjecaja polimorfizma *APOE* na lipidni profil, pojedini aleli  $\epsilon$  i specifični fenotipovi mogu biti povezani s povećanim rizikom za neke bolesti krvožilnog i neurološkog sustava (Slika 12B.) (141, 154).

Povezanost između polimorfizma *APOE* i ateroskleroze poznata je desetljećima, a prvi put je utvrđena u bolesnika s koronarnom bolesti srca u mlađoj životnoj dobi kod kojeg je dokazana hiperlipoproteinemija tipa III uz fenotip apoE2/2 (159). Raspodjela genotipova *APOE* ispitivana je i u drugim bolestima (poremećajima) povezanim s povišenim koncentracijama kolesterola, a povezanost alela  $\epsilon$  s ranim razvojem ateroskleroze (160, 161), ishemijskom srčanom bolesti (162-164) ili cerebrovaskularnim bolestima (165, 166) dokazana je u nekoliko istraživanja. U 4 istraživanja u odrasloj populaciji utvrđen je povećan rizik za nastanak MU u bolesnika s alelom  $\epsilon$ 4 kao i s genotipovima  $\epsilon$ 3/4 i  $\epsilon$ 4/4 (165, 167-169).

Opisana je i povezanost alela  $\epsilon$ 2 s dugovječnošću u oba spola, dok je nasuprot tome pronađena značajna veza između alela  $\epsilon$ 4 i povećane smrtnosti u starijih osoba, posebice muškaraca (156). Najizraženiji patološki utjecaj polimorfizma *APOE* predstavlja značajna povezanost alela  $\epsilon$ 4 s neurodegenerativnim bolestima posebice s Alzheimerovom bolesti, pa je najmanje 1 alel  $\epsilon$ 4 pronađen u 60-80% bolesnika s Alzheimerovom bolesti (146, 154).

## 1. 5. LJUDSKI TROMBOCITNI ALOANTIGENI

Ljudski trombocitni aloantigeni (engl. *Human Platelet Alloantigen*, HPA) su aloantigeni tipa II, većim dijelom specifični za trombocite, koji se nalaze na membranskoj površini trombocita i definirani su aloantitijelima usmjerenim prema genetički određenim molekularnim varijantama proteina ili ugljikohidrata na trombocitnoj membrani (170). Prema definiciji Odbora za nazivlje trombocita (engl. *Platelet Nomenclature Committee*, PNC), zajedničkog tijela Radne skupine za trombocite Međunarodnog društva transfuziologa (engl. *Platelet Working Party of the International Society of Blood Transfusion*, ISBT) i Pododbora za imunologiju trombocita Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (engl. *Scientific Subcommittee on Platelet Immunology of the International Society on Thrombosis and*

*Haemostasis*, ISTH), u HPA se ubrajaju svi proteinski aloantigeni s definiranom molekularnom strukturom koji su izraženi na trombocitnoj membrani, osim aloantigena kodiranih genima glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) (171).

HPA su polimorfni epitopi trombocitnih membranskih GP i označeni su brojevima dodijeljenim prema redoslijedu otkrivanja. Alel unutar sustava koji se češće pojavljuje označen je slovom "a", dok je alel koji se rjeđe pojavljuje označen slovom "b". Slovo "w" je dodano nakon naziva aloantigena ako je opisano samo jedno antitijelo za pojedini HPA (171).

Do danas su serološki definirana 24 aloantigena. U 23 aloantigena, od kojih je 12 svrstano u 6 bialelnih sustava (HPA-1, -2, -3, -4, -5 i -15), utvrđena je zamjena jednog nukleotida u slijedu DNA, odnosno zamjena jedne aminokiseline u molekuli GP (Tablica 3.). Jedino je HPA-14bw rezultat delecije tripleta u kodirajućoj regiji za aminokiselinu ( $\beta$ 3-Lys611) na GPIIIa (172).

Svi dosad definirani HPA-ovi smješteni su na 6 trombocitnih membranskih GP: GPIa, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIIb, GPIIIa i GPI-CD109 (Slika 13.) (170). Osim HPA-15 koji je preko glikozilfosfatidilinozitola vezan na protein CD109 i sastavni je dio receptorskog sustava za transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *Transforming Growth Factor*, TGF- $\beta$ ) (170, 172-174), svi ostali HPA-ovi nalaze se na najvažnijim GP kompleksima i trombocitnim receptorima za:

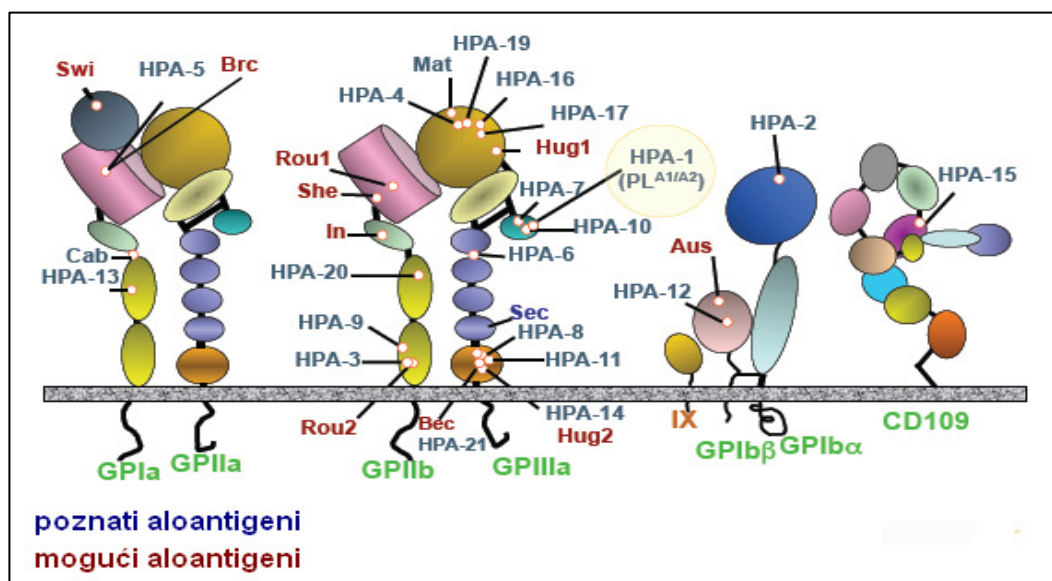
- **kolagen** – kompleks GPIa/IIa (integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1)
- **von Willebrandov čimbenik (VWF)** – kompleks GPIb/IX/V
- **fibrinogen** – kompleks GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3)

Ovi GP kompleksi uključeni su u sve faze stvaranja ugruška i nužni su za adheziju trombocita na komponente subendotelnog izvanstaničnog matriksa, prije svega na kolagen, te za međudjelovanje između trombocita koje rezultiraju agregacijom trombocita (68).

HPA-ovi nisu jednakomjerno raspoređeni na svim GP (Tablica 3. i Slika 13.). Najveći broj HPA, njih čak 11, smješteno je na kompleksu GPIIb/IIIa koji je s 50.000-80.000 kopija po trombocitu najzastupljeniji GP kompleks na trombocitnoj površini, dok se 3 HPA nalaze na kompleksu GPIa/IIa, a 2 na kompleksu GPIb/V/IX (172).

**Tablica 3.** Ljudski trombocitni aloantigeni (HPA) i polimorfizmi koji su odgovorni za pojedine HPA-ove (modificirano prema 171, 172).

| Sustav        | Aloantigen | Izvorni naziv                       | Glikoprotein  | Naziv gena    | Kromosom | Zamjena nukleotida | Polimorfizam (aminokiselina) |
|---------------|------------|-------------------------------------|---------------|---------------|----------|--------------------|------------------------------|
| <b>HPA-1</b>  | HPA-1a     | Zw <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup>  | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 176 T>C            | Leu33Pro                     |
|               | HPA-1b     | Zw <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>  |               |               |          |                    |                              |
| <b>HPA-2</b>  | HPA-2a     | Ko <sup>b</sup>                     | GPIb $\alpha$ | <i>GP1BA</i>  | 17       | 482 C>T            | Thr145Met                    |
|               | HPA-2b     | Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>  |               |               |          |                    |                              |
| <b>HPA-3</b>  | HPA-3a     | Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> | GPIIb         | <i>ITGA2B</i> | 17       | 2621 T>G           | Ile843Ser                    |
|               | HPA-3b     | Bak <sup>b</sup>                    |               |               |          |                    |                              |
| <b>HPA-4</b>  | HPA-4a     | Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 506 G>A            | Arg143Gln                    |
|               | HPA-4b     | Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup> |               |               |          |                    |                              |
| <b>HPA-5</b>  | HPA-5a     | Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup>  | GPIa          | <i>ITGA2</i>  | 5        | 1600 G>A           | Glu505Lys                    |
|               | HPA-5b     | Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup>  |               |               |          |                    |                              |
|               | HPA-6bw    | Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>   | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 1544 G>A           | Arg489Gln                    |
|               | HPA-7bw    | Mo <sup>a</sup>                     | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 1297 C>G           | Pro407Ala                    |
|               | HPA-8bw    | Sr <sup>a</sup>                     | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 1984 C>T           | Arg636Cys                    |
|               | HPA-9bw    | Max <sup>a</sup>                    | GPIIb         | <i>ITGA2B</i> | 17       | 2602 G>A           | Val837Met                    |
|               | HPA-10bw   | La <sup>a</sup>                     | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 263 G>A            | Arg62Gln                     |
|               | HPA-11bw   | Gro <sup>a</sup>                    | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 1976 G>A           | Arg633His                    |
|               | HPA-12bw   | Iy <sup>a</sup>                     | GPIb $\beta$  | <i>GP1BB</i>  | 22       | 119 G>A            | Gly15Glu                     |
|               | HPA-13bw   | Sit <sup>a</sup>                    | GPIa          | <i>ITGA2</i>  | 5        | 2483 C>T           | Thr799Met                    |
|               | HPA-14bw   | Oe <sup>a</sup>                     | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 1909-11 del AAG    | Lys611del                    |
| <b>HPA-15</b> | HPA-15a    | Gov <sup>b</sup>                    | CD109         | <i>CD109</i>  | 6        | 2108 C>A           | Tyr703Ser                    |
|               | HPA-15b    | Gov <sup>a</sup>                    |               |               |          |                    |                              |
|               | HPA-16bw   | Duv <sup>a</sup>                    | GPIIIa        | <i>ITGB3</i>  | 17       | 497 C>T            | Thr140Ile                    |
|               | HPA-17bw   |                                     | GPIa          | <i>ITGA2</i>  | 5        | 3389 C>T           | Thr1087Met                   |



**Slika 13.** Ljudski trombocitni aloantigeni (HPA) i njihovi položaji na glikoproteinskim kompleksima (prema 175).

### 1. 5. 1. GENSKA REGULACIJA, POLIMORFIZMI GLIKOPROTEINSKIH KOMPLEKSA I PROMJENA FUNKCIJSKIH OSOBINA TROMBOCITA

Gen *ITGB3* koji je smješten na 17. kromosomu (lokus 17q21.32) kodira GPIIIa, podjedinicu  $\beta 3$  kompleksa GPIIb/IIIa. Na ovom najpolimorfnijem GP na trombocitnoj membrani smješteno je 9 HPA od kojih je najistraženiji i klinički najvažniji HPA-1 (172). Dimorfizam HPA-1a/b ( $PI^{A1/A2}$ , *rs5918*) nastaje zbog zamjene timina citozinom na položaju 196 u 2. eksonu, što rezultira zamjenom leucina (HPA-1a) prolinom (HPA-1b) na položaju 33 (Leu33Pro) aminokiselinskog slijeda GPIIIa (176). Polimorfizam dovodi do strukturne promjene u aminoterminalnoj disulfidnoj petlji koja je važna za vezanje fibrinogena te posljedične promjene funkcijskih osobina trombocita posredovanih kompleksom GPIIb/IIIa kao što su adhezija, širenje i retrakcija ugruška (177-179). Trombociti koji nose alel HPA-1b imaju niži aktivacijski prag te pokazuju pojačan agregacijski odgovor *in vitro* potaknut dodatkom adenozin-difosfata (ADP), adrenalina i kolagena kao i povećanu osjetljivost na antiagregacijske lijekove (acetilsalicilnu kiselinu) i Abciximab u odnosu na trombocite koji nose alel HPA-1a (178, 180-182). Za razliku od toga homozigoti za alel HPA-1a pokazuju povećanu osjetljivost prema arahidonskoj kiselini i analogima tromboksana (183). Za alel HPA-1b (Pro33) utvrđena je heterogena etnička raspodjela, pa tako učestalost alela HPA-1b iznosi približno 15% u bijelaca te 5-8% u crnaca dok je izrazito mala (gotovo odsutna) u Azijata (181,184).

Gen *ITGA2B* također je smješten na 17. kromosomu i kodira GPIIb na kojem su opisana 2 HPA (HPA-3 i HPA-9). HPA-3 je nakon HPA-1 drugi najistraženiji aloantigen kompleksa GPIIb/IIIa. Dimorfizam HPA-3a/b rezultat je zamjene timina gvaninom na položaju 2622 koja na položaju 843 teškog lanca GPIIb dovodi do zamjene aminokiseline izoleucina (HPA-3a, Ile843) serinom (HPA-3b, Ser843) (185).

**Kompleks GPIb/IX/V** ima važnu ulogu u početnom i prolaznom priljubljivanju trombocita na izvanstanični matriks vezanjem VWF na aminoterminalnu domenu GPIb $\alpha$  (186). Od GP koji čine kompleks GPIb/IX/V samo je GPIb polimorfan i na njegovoj se površini nalaze 2 HPA: HPA-2 na podjedinici Ib $\alpha$  i HPA-12 na podjedinici Ib $\beta$ . Molekularna osnova dimorfizma HPA-2a/b je zamjena nukleotida citozina timinom na položaju 524 (*rs6065*) u genu *GP1BA* smještenom na 17. kromosomu (17pter-p12) (187). Promjena u aminokiselinskom slijedu na položaju 145 (Thr145Met) koji se nalazi u području bogatom leucinom i važnom za vezanje VWF i trombina na GPIb $\alpha$ , rezultira promjenom strukture s konačnim učinkom na funkciju samog receptora (188). Pokazano je kako je dimorfizam HPA-

2a/b povezan s većim afinitetom za vezanje VWF potaknuto ristocetinom ili botrocetinom, ali ne i za vezanje trombina, pa se aloforma HPA-2a (Thr145) čvršće veže za VWF (189). Literaturni podatci upućuju na razlike u učestalosti alela HPA-2 s obzirom na etničku pripadnost, pa tako učestalost alela HPA-2b (Met145) iznosi 7-10% u bijelaca, 14% u Japanaca i 18% u Afroamerikanaca (186, 190).

**Kompleks GPIa/IIa** (integrin  $\alpha 2\beta 1$ ) glavni je trombocitni receptor za kolagen s ključnom ulogom u adheziji trombocita na fibrilarni (tip I ili III) i nefibrilarni (tip IV ili VI) kolagen (186). Istraživanja su pokazala postojanje interindividualnih razlika u gustoći receptora (razlika i do 4 puta) kao i izravnu povezanost gustoće receptora GPIa/IIa na trombocitnoj površini i brzine vezanja trombocita na kolagen tipa I kod fiziološke brzine protoka arterijske krvi (191). Stoga izražaj ovog receptora na membranskoj površini može imati važan utjecaj na adheziju trombocita *in vivo* i time doprinijeti povećanom riziku od tromboze ili krvarenja (192).

Sva se 3 HPA koji su sastavni dio kompleksa GPIa/IIa (HPA-5, -13 i -17) nalaze na GPIa kojeg kodira gen *ITGA2* smješten na kratkom kraku kromosoma 5 (lokus 5p11.12) (193). Najpoznatiji od njih je dimorfizam HPA-5a/b kod kojeg je nukleotid gvanin zamijenjen adeninom na položaju 1648 (G1648A) pa se na položaju 505 aminokiselinskog slijeda umjesto glutaminske kiseline (HPA-5a, Glu505) nalazi lizin (HPA-5b, Lys505) (194). U nosioca alela HPA-5b opažena je manja gustoća receptora na trombocitnoj površini, ali je zaključeno kako ovaj dimorfizam ne dovodi do promjene razine izražaja, već samo do kvalitativne promjene funkcije receptora (191).

Dobro je poznata uloga polimorfnih epitopa HPA u aloimunim trombocitnim poremećajima kao što su neonatalna aloimuna trombocitopenija, posttransfuzijska purpura i refraktornost na transfuzije trombocita (170, 190). Zbog važne uloge trombocita u patogenezi akutne koronarne i cerebrovaskularnih bolesti te dokazanog utjecaja nekih od aloepitopa HPA na funkcijske osobine trombocita, proveden je veći broj istraživanja s ciljem ispitivanja moguće povezanosti aloepitopa HPA, posebice HPA-1, s arterijskom trombozom i to s koronarnom bolesti srca, infarktom miokarda i cerebrovaskularnim bolestima (170, 192). Iako su Weiss i sur. 1996. godine prvi ukazali na povezanost alela HPA-1b s akutnim infarktom miokarda i nestabilnom anginom u mlađih bolesnika (195), u kasnije provedenim istraživanjima dobiveni su proturječni rezultati (196-201). Alel HPA-1b povezuje se i s blagim rizikom za akutni koronarni sindrom u mlađih bolesnika i to posebice pušača (202).

Proturječni rezultati dobiveni su i u ispitivanjima o povezanosti pojedinih aloepitopa HPA s MU u odraslih i djece. U dvije studije u odraslih dokazana je statistički značajna

povezanost alela HPA-1b s MU koji je posljedica tromboze ili embolije zbog ateroskleroze velikih krvnih žila (203, 204), a u studiji Saidi i sur. povezanost alela HPA-1b i genotipa HPA-1b/b s IMU (205), dok povezanost nije dokazana u nekoliko drugih studija (197, 206-209). Rezultati studije Inieste i sur. ukazuju na značajno smanjeni rizik od SAH u odraslih nosioca alela HPA-1b (210).

Iako je povezanost HPA-2b s MU u odraslih dokazana samo u manjem broju ispitivanja (211, 212), dok je veći broj studija bio negativan (206, 208, 213, 214), prema rezultatima nedavno objavljene meta-analize alel HPA-2b predstavlja blagi rizični čimbenik za nastanak IMU (215).

U studiji Reiner i sur. opisana je povezanost genotipa HPA-3b/b s povećanim rizikom od IMU u žena mlađe životne dobi sa šećernom bolesti, hipertenzijom i povišenom koncentracijom homocisteina (208), ali povezanost s MU nije potvrđena u drugim studijama (206, 216, 217).

Statistički značajna povezanost HPA-5 (genotipova HPA-5a/b i HPA-5b/b) s IMU u odraslih dokazana je samo u studiji Saidi i sur. (217), ali nije dokazana u ostale 2 studije (206, 208).

Povezanost aloepitopa HPA s MU u djece ispitana je do danas samo u 4 istraživanja, od kojih je u 3 ispitivan samo HPA-1. Slično kao i u istraživanjima u odraslih, dobiveni su proturječni rezultati, pa je tako u studiji Biswas i sur. dokazana značajna povezanost prisutnosti najmanje 1 alela HPA-1b i nekardioembolijskog MU u indijske djece (218), dok u studijama Komitopoulou i sur. u grčke djece s IMU (219) i Millera i sur. u kalifornijske novorođenčadi povezanost nije potvrđena (220). Značajna povezanost HPA-1 s MU u djece nije pokazana niti u našem prethodnom istraživanju, jedinom u kojem su ispitivani HPA-1, -2, -3 i -5, ali je u nosioca alela HPA-3b utvrđen smanjeni rizik za pojavu AIMU (211).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Moždani udar (MU) u djece relativno je rijetka bolest s višestrukom etiologijom, ali predstavlja značajan uzrok smrtnosti i kroničnog pobola. Godišnja incidencija MU prema različitim studijama iznosi 1,3-13,0/100.000 djece starosti do 18 godina, a razlikuje se prema geografskoj rasprostranjenosti (1, 2, 22, 27). U posljednjih 25 godina bilježi se porast incidencije kao rezultat tehnološkog napretka i veće dostupnosti različitih tehnika slikovnih prikaza mozga koji su omogućili lakšu dijagnostiku i klasifikaciju bolesti. Danas je poznato više od 100 različitih rizičnih čimbenika za nastanak MU u djece, za razliku od odraslih kod kojih ateroskleroza i hipertenzija predstavljaju glavne rizične čimbenike (15, 22). Iako je dosad utvrđen veći broj nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika koji uključuju srčane bolesti, infekcije, protrombotičke, metaboličke i vaskularne poremećaje, etiologija je još uvijek nepoznata u približno 30% slučajeva (9, 15, 27, 38, 45, 49). Osim dobro utvrđenih monogenских poremećaja povezanih s nastankom MU u djece, sve je više podataka koji upućuju na važnost protrombotičkih poremećaja zbog promjena na razini gena koji reguliraju čimbenike zgrušavanja i fibrinolize (10, 49, 69). Prema dosadašnjim istraživanjima najčešći nasljedni protrombotički rizični čimbenici koji se povezuju s MU u djece su polimorfizmi u genima za koagulacijske čimbenike II (FII G20210A) i V (FV Leiden) te za metabolizam homocisteina MTHFR C677T. Unatoč tome povezanost ovih polimorfizama s MU u djece nije utvrđena u svim ispitivanim populacijama, već se razlikuje od populacije do populacije, čak i na području Europe (10, 49, 69). Vrlo malo je literaturnih podataka o mogućem utjecaju drugih protrombotičkih polimorfizama u genima uključenim u hemostatski sustav koji kodiraju koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike (FV HR2,  $\beta$ -FIB -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), trombocitne GP receptore (HPA-1) i metabolizam homocisteina (MTHFR A1298C) na pojavu MU u djece, dok polimorfizmi ljudskih trombocitnih aloantigena (HPA-2, -3 i -5) i intermedijarnih rizičnih čimbenika (ACE I/D i apoE  $\epsilon$ 2-4) nisu dosad ispitivani (10, 49). Nadalje, dokazano je dodatno povećanje rizika za nastanak trombotičkog događaja u prisutnosti više od jednog protrombotičkog rizičnog čimbenika. Stoga se očekuje i veći utjecaj prisutnosti kombinacije dva protrombotička polimorfizma u istom genu za FV (FV Leiden i FV HR2) te MTHFR (MTHFR C677T i MTHFR A1298C), u odnosu na pojedinačne polimorfizme, ili u više gena smještenih na istom kromosomu (haplotipova HPA-ACE sastavljenog od alela polimorfizama HPA-1, -2, -3 i ACE I/D, te FV-

MTHFR sastavljenog od alela polimorfizama FV Leiden, FV HR2, MTHFR C677T i MTHFR A1298C) što dosad nije istraženo.

Osim toga dosadašnja istraživanja nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika, provedena su uglavnom u djece s arterijskim ishemijskim MU u dječjoj dobi. Povezanost protrombotičkih polimorfizama FII G20210A, FV Leiden i MTHFR C677T s perinatalnim arterijskim ishemijskim MU do danas je analizirana samo u nekoliko studija u drugim populacijama, dok nasljedni protrombotički rizični čimbenici obučeni ovim istraživanjem nisu do sada ispitivani u hemoragijskom MU u djece. Također je i raspodjela gena kandidata za nastanak MU različita u pojedinim populacijama, a razlikuje se i s obzirom na tip i dob pojave MU (10, 49).

Statistička obrada rezultata dobivenih u istraživanju multivarijantnom logističkom regresijskom analizom pružit će informacije o povezanosti pojedinačnih dosad utvrđenih polimorfizama (FII G20210A, FV Leiden i MTHFR C677T) kao i nedovoljno istraženih protrombotičkih polimorfizama u genima za koagulacijske čimbenike (FV HR2,  $\beta$ -FGB - 455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G) i enzime metabolizma homocisteina (MTHFR A1298C), intermedijarnih rizičnih čimbenika (ACE I/D i apoE  $\epsilon$ 2-4) te ljudskih trombocitnih aloantigena (HPA-1, -2, -3 i -5) s nastankom MU u djece, ovisno o spolu, tipu i dobi pojave MU. Ispitat će se i mogući statistički značajan utjecaj kombinacija genotipova protrombotičkih polimorfizama FV Leiden i FV HR2 te MTHFR C677T i MTHFR A1298C na pojavu MU ovisno o spolu, dobi i tipu MU, te će se uporabom programa za statističku analizu povezanosti haplotipa i bolesti odrediti učestalosti haplotipova HPA-ACE i FV-MTHFR koje će ukazati na mogući statistički značajan utjecaj nekog od haplotipova na pojavnost MU.

Pretpostavka je da protrombotički genski čimbenici koji kodiraju proteine uključene u hemostatski sustav i metabolizam homocisteina imaju veću ulogu u djece u odnosu na odrasle. Stoga istraživanja u djece s MU predstavljaju idealnu metodu za ispitivanje uloge neaterosklerotskih mehanizama u spolnim i etničkim razlikama u riziku od nastanka MU, pa utvrđivanje rizičnih protrombotičkih genskih čimbenika može doprinijeti i razumijevanju patogeneze MU u odraslih.

Kako je ovo prvo istraživanje u Hrvatskoj utvrđeni protrombotički genetički rizični čimbenici dodatno će razjasniti etiologiju MU u djece, te će uz prikupljene epidemiološke i kliničke podatke o spolu, tipu i dobi pojave MU poslužiti za izradu nacionalnog registra.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. prikupiti i obraditi epidemiološke i kliničke podatke (dob, spol, kliničke simptome i rizične čimbenike) o MU u djece
2. ispitati postoji li razlika u pojavnosti MU u djece s obzirom na spol, dobne skupine i tip MU
3. genotipizirati 14 polimorfizama u 12 gena kandidata koji kodiraju proteine:
  - uključene u sustav zgrušavanja i fibrinolize (FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G)
  - metabolizma homocisteina (MTHFR C677T i MTHFR A1298C)
  - intermedijarnih rizičnih čimbenika (ACE I/D i apoE  $\epsilon$ 2-4)
  - ljudskih trombocitnih aloantigena (HPA -1, -2, -3 i -5)
4. analizom dobivenih rezultata ispitati postoji li razlika u učestalosti pojedinačnih ispitivanih genskih polimorfizama u djece s MU usporedbom s kontrolnom skupinom
5. ispitati postoji li razlika u učestalosti ispitivanih genskih polimorfizama u djece s MU s obzirom na spol, tip moždanog udara te dob pojave MU
6. ispitati postoji li udruženost analiziranih genskih polimorfizama u ispitivanim skupinama i podskupinama

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4. 1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 100 djece starosne dobi do 18 godina s dijagnosticiranim MU, zaprimljenih na Neurološkom odjelu Klinike za pedijatriju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Neuropedijatrijskom odjelu Klinike za dječje bolesti u Zagrebu.

Dijagnoza je postavljena na temelju iscrpne analize kliničke povijesti, fizikalnog i neurološkog pregleda koji je uključivao kliničke simptome i znakove te je potvrđena najmanje 1 slikovnom tehnikom morfoloških prikaza mozga kompjutoriziranom tomografijom (CT) i/ili MR-om. U nekim slučajevima učinjeni su i transfontanelarni ultrazvuk i MR angiografija. Osim morfoloških prikaza mozga u svih je ispitanika provedena i kardiovaskularna i cerebrovaskularna obrada koja je uključivala elektrokardiografiju, elektroencefalografiju i transkranijски obojeni dopler prikaz (engl. *Transcranial Color Doppler*).

U istraživanje je osim djece s dijagnosticiranim MU uključeno i 100 zdrave djece starosne dobi do 18 godina koji su predstavljali kontrolnu skupinu. Kriteriji za uključivanje u kontrolnu skupinu bili su odsutnost neuroloških i tromboembolijskih poremećaja te podudarnost po dobi i spolu s djecom s MU. Uzorci djece iz kontrolne skupine prikupljeni su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti u Zagrebu, te na Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Dječje bolnice Srebrnjak.

Uzorci ispitanika uključenih u ovo istraživanje prikupljeni su u desetogodišnjem razdoblju od 2000. do 2010. godine većim dijelom u okviru Projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i športa br. 214212 "Protrombotički čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima u djece". Istraživanje je provedeno u uzorcima krvi preostalim nakon redovne bolničke i polikliničke obrade bolesnika uz dobivenu suglasnost Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

## 4. 2. METODE

### 4. 2. 1. IZDVAJANJE GENOMSKE DNA

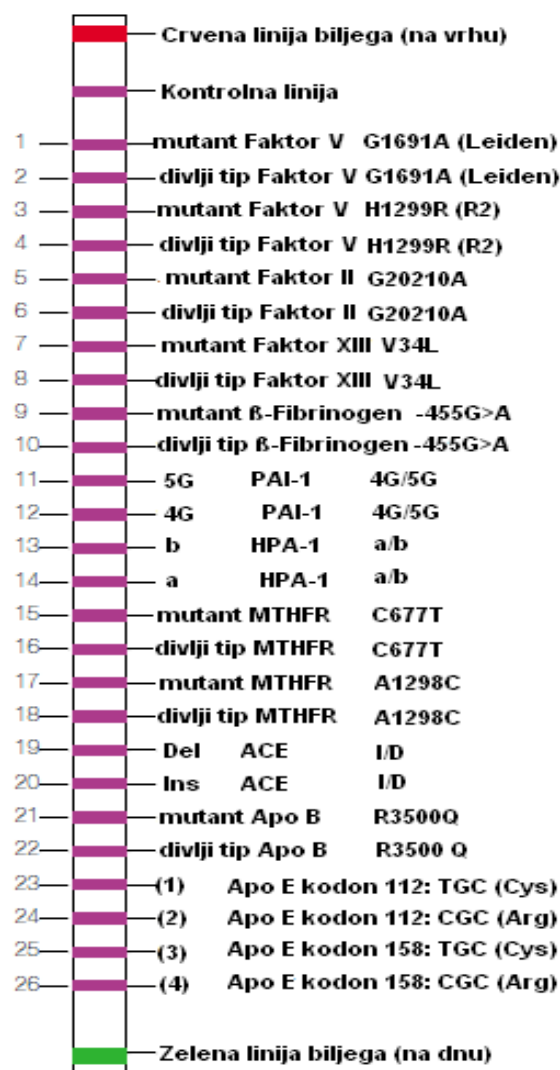
Za izdvajanje genomske DNA uzeti su uzorci periferne krvi u epruvetu s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA ili s 0,105 M puferiranim trinitrijevim citratom. DNA je izdvojena iz leukocita periferne krvi standardnim postupkom, metodom isoljavanja (222). Uzorci DNA ispitanika pohranjeni su na +4° C za molekularno-genetičku analizu.

### 4. 2. 2. DOKAZIVANJE POLIMORFIZAMA METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM I HIBRIDIZACIJOM POMOĆU SUSTAVA TESTNIH TRAKA *CVD STRIP ASSAY*

Sustav testnih traka *CVD Strip Assay* (Vienna Lab Diagnostics GmbH, Beč, Austrija) omogućuje istovremenim umnožavanjem i obilježavanjem biotinom sekvenci gena od interesa dokazivanje 12 polimorfizama unutar 10 gena:

- koagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika: ***FGB*** (β-FBG -455G>A), ***F2*** (FII G20210A) ***F5*** (FV Leiden, FV HR2), ***F13*** (FXIII-A Val34Leu), ***SERPINE1*** (PAI-1 4G/5G)
- metabolizma homocisteina: ***MTHFR*** (MTHFR C677T, MTHFR A1298C)
- intermedijarnih čimbenika: ***ACE*** (ACE I/D), ***APOB*** (ApoB R3500Q), ***APOE*** (apoE ε2-4)
- ljudskih trombocitnih aloantigena: ***ITGB3*** (HPA-1)

Postupak dokazivanja polimorfizama izvodi se u dva koraka. U prvom se koraku u uzorku genomske DNA umnože dijelovi gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s višestrukim umnažanjem (engl. *multiplex-PCR*, M-PCR) uporabom 2 smjese parova početnica obilježenih biotinom. Umnoženi se produkti hibridiziraju na najlonsku membranu (testnu traku) koja sadrži alel-specifične oligonukleotidne sonde raspoređene kao usporedne linije. Biotinilirane sekvence koje su se vezale dokazuju se kromogenom reakcijom pomoću kromogenog reagensa koji sadrži alkalnu fosfatazu vezanu na streptavidin i supstrat, a hibridizacijski signal (pozitivni rezultat) je linijski ljubičasti precipitat (Slika 14.). Kontrolna linija na svakoj testnoj traci omogućuje kontrolu uspješnosti kromogene reakcije.



**Slika 14.** Testna traka CVD. Slika prikazuje linearni raspored alel-specifičnih oligonukleotidnih sonda na najlonskoj membrani za ispitivanje 12 polimorfizama u 10 gena. Svaka ljubičasta linija predstavlja hibridizacijski signal (precipitat) nakon kromogene reakcije pomoću alkalne fosfataze vezane na streptavidin i supstrat.

#### 4. 2. 2. 1. Umnožavanje produkata metodom M-PCR

Za svaki ispitivani uzorak DNA priređene su po dvije zasebne reakcijske smjese za umnožavanje (A i B) koje su se sastojale od biotiniliranih početnica, kao i svježa radna otopina Taq DNA-polimeraze (1:25) u Taq-puferu za razrjeđivanje (*Taq Dilution Buffer*) konačne koncentracije 0,2 U/ $\mu$ L. Koncentracija DNA podešena je na 25  $\mu$ g/mL. Protokol izrade reakcijskih smjesa prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Protokol izrade reakcijskih smjesa za genotipizaciju metodom M-PCR-a.

| Reakcijska smjesa | Reagens                                | Volumen (μL) |
|-------------------|----------------------------------------|--------------|
| <b>Smjesa A</b>   | Smjesa za umnožavanje A                | 15           |
|                   | Radna otopina Taq DNA polimeraze (1U)  | 5            |
|                   | Genomska DNA (koncentracija: 25 μg/mL) | 5            |
|                   | Ukupno                                 | 25           |
| <b>Smjesa B</b>   | Smjesa za umnožavanje B                | 15           |
|                   | Radna otopina Taq DNA polimeraze (1U)  | 5            |
|                   | Genomska DNA (koncentracija: 25 μg/mL) | 5            |
|                   | Ukupno                                 | 25           |

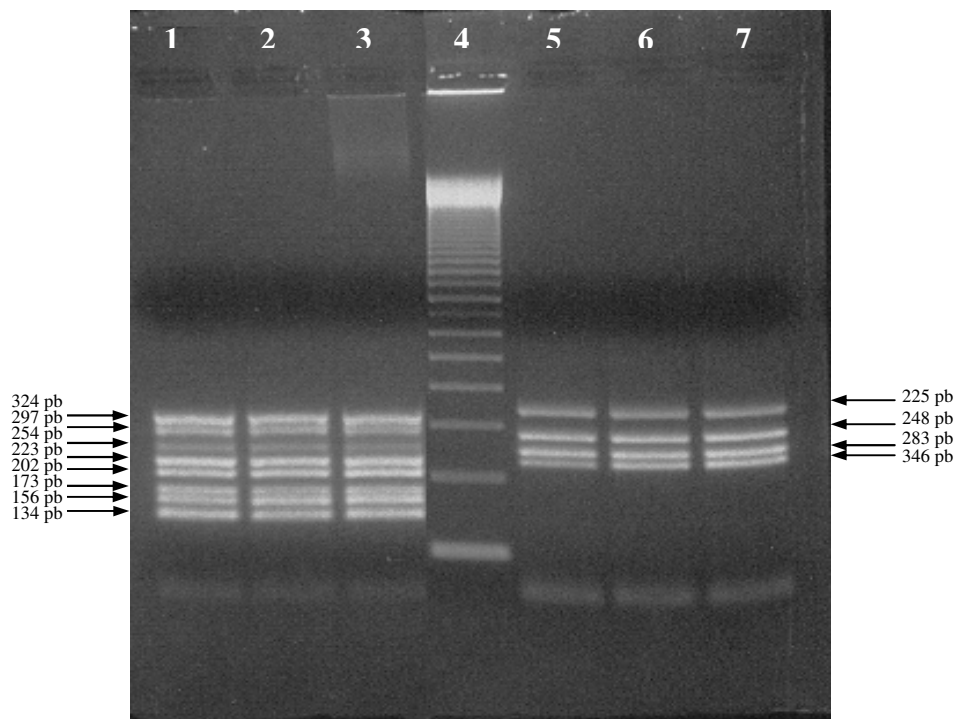
Umnožavanje s obje reakcijske smjese izvedeno je na termobloku GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) s istovjetnim programom umnožavanja koji je prikazan u Tablici 5.

**Tablica 5.** Uvjeti reakcije za umnožavanje metodom M-PCR.

| Faza ciklusa                | Temperatura (°C) | Vrijeme trajanja ciklusa | Broj ciklusa |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|--------------|
| <b>Početna denaturacija</b> | 94               | 2 min                    | 1            |
| <b>Denaturacija</b>         | 94               | 15 s                     | 35           |
| <b>Vežanje početnica</b>    | 58               | 30 s                     |              |
| <b>Sinteza novog lanca</b>  | 72               | 30 s                     |              |
| <b>Završna sinteza</b>      | 72               | 3 min                    | 1            |

#### 4. 2. 2. 2. Provjera reakcije umnožavanja produkata metodom M-PCR

Za provjeru reakcije, umnoženi produkti PCR su analizirani elektroforetskim razdvajanjem na 3%-tnom agaroznom gelu. Dobiveno je 8 produkata sa smjesom A, veličina od 134-324 pb (134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 pb) i 4 produkta sa smjesom B, veličina od 225-346 pb (225, 248, 283, 346 pb). Elektroforetsko je razdvajanje prikazano na Slici 15.



**Slika 15.** Elektroforetsko razdvajanje umnoženih produkata PCR s pripadajućim veličinama ulomaka na 3%-tnom agaroznom gelu; linije 1-3: produkti 3 uzorka DNA umnoženi s reakcijskom smjesom A; linija 4: molekularni biljeg od 100 pb; linije 5-7: produkti 3 uzorka DNA umnoženi s reakcijskom smjesom B.

#### 4. 2. 2. 3. Hibridizacija umnoženih produkata

Hibridizacija je provedena u vodenoj kupelji s mješalicom (Kötterman, Hänigsen, Njemačka) na temperaturi od 45 °C. Prije hibridizacije su testne trake, otopine za denaturiranje (DNAT), konjugata i ispiranje B, kao i razvijač boje (*Color Developer*) ostavljeni stajati na sobnoj temperaturi, dok su hibridizacijski pufer (*Hybridization Buffer*) i otopina za ispiranje (*Wash Solution*) A prije uporabe zagrijani na 45 °C.

#### Postupak hibridizacije:

1. Otpipetirano je po 20  $\mu$ L DNAT u lijevi kut svakog segmenta plastične posudice s 8 ograđenih segmenata (za svaku traku zasebni segment).
2. Na prethodno nanesen DNAT dodano je po 10  $\mu$ L PCR-produkta A i po 10  $\mu$ L PCR-produkta B na istu kap, te nakon miješanja ostavljeno stajati 5 minuta na sobnoj temperaturi (otopina ostaje plavo obojena).



3. U svaki segment dodano je po 1 mL prethodno zagrijanoga hibridizacijskog pufera koji je lagano promiješan. Nakon dodatka pufera otopina se obezboji.
4. Testne su trakice potpuno uronjene u priređene smjese tako da su označene vidljive vrpce na gornjoj strani.
5. Trakice su u plastičnoj posudici inkubirane 45 minuta na 45 °C u vodenoj kupelji s mješalicom, uz neprekidnu umjerenu trešnju i poklopljenu vodenu kupelj zbog održavanja konstantne temperature.
6. Nakon inkubacije su hibridizacijske otopine odsisane pomoću sisaljke na vakuum.

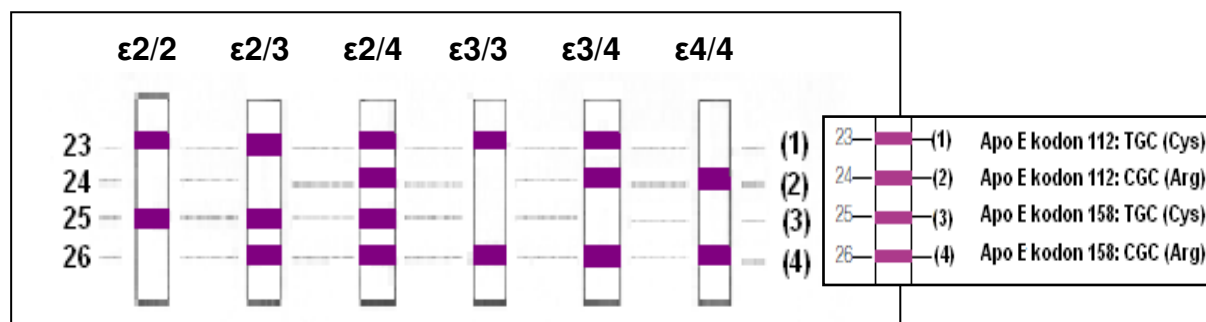
Kako se trakice ne bi osušile, postupak je odmah nastavljen ispiranjem u vodenoj kupelji na 45 °C. Prvo su trakice brzo isprane (10 s) dodatkom po 1 mL prethodno zagrijane otopine za ispiranje A, te je otopina odsisana pomoću sisaljke na vakuum. Nakon toga je ponovno dodano po 1 mL prethodno zagrijane otopine za ispiranje A te inkubirano 20 min u vodenoj kupelji s mješalicom uz stalnu umjerenu trešnju na 45 °C, te je otopina odsisana pomoću sisaljke na vakuum. Isti postupak ponovljen je još 2 puta.

Završna faza (kromogena reakcija) izvedena je na sobnoj temperaturi. Prvo je dodano po 1 mL otopine konjugata i inkubirano 15 minuta uz neprekidnu trešnju na sobnoj temperaturi, nakon čega je tekućina odsisana pomoću sisaljke na vakuum. Nakon toga su trakice brzo isprane (10 s) dodatkom po 1 mL otopine za ispiranje B, te je otopina odsisana pomoću sisaljke na vakuum. Ponovno je dodano po 1 mL otopine za ispiranje B, inkubirano 5 minuta uz neprekidnu trešnju na mješalici, te otopina odsisana pomoću sisaljke na vakuum. Isti je postupak ponovljen još 2 puta pa je dodano po 1 mL razvijača boje (obojenog supstrata) te inkubirano 15 minuta zaklonjeno od svjetla uz neprekidnu trešnju. Kod pozitivne reakcije razvija se ljubičasta boja. Nakon toga su testne trakice isprane nekoliko puta destiliranom vodom i ostavljene se sušiti na staničevini zaklonjeno od svjetla.

#### **4. 2. 2. 4. Analiza i tumačenje dobivenih rezultata**

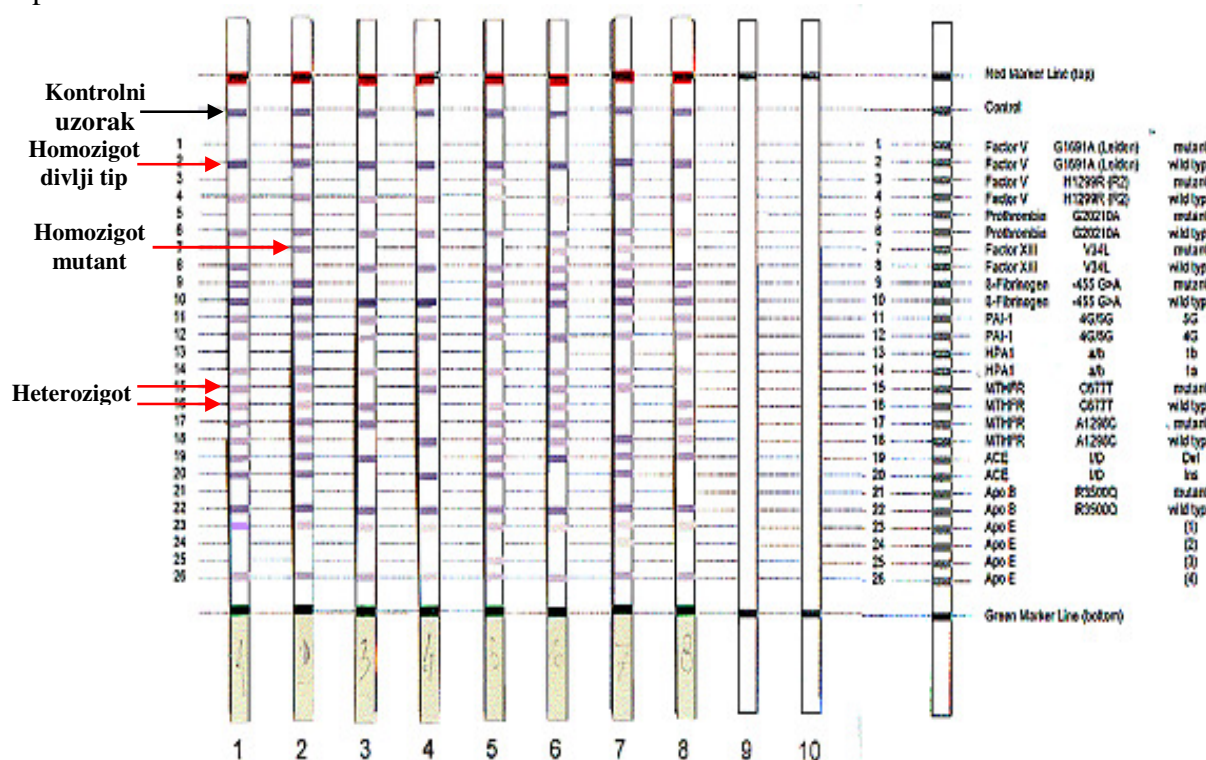
Osušene su trakice postavljene na odgovarajuća mjesta papirne sheme priložene unutar pakiranja i pričvršćene pomoću ljepljive trake s obilježenu crvenom linijom na vrhu, a zelenom linijom na dnu. Kontrola uspješnosti kromogene reakcije očitovala se prisutnošću kontrolne obojene linije. Za svaki polimorfizam, osim za apoE, genotip je utvrđen prema priloženoj shemi pa samo jedna ljubičasta linija na položaju alel-specifičnih oligonukleotida

divljeg tipa označava homozigota za divlji tip, a na položaju mutiranog tipa homozigota za ispitivani polimorfizam, dok dvije ljubičaste linije (divlji tip i mutiran) označavaju heterozigotni oblik. Genotip apoE određen je prema priloženoj shemi proizvođača koja je prikazana na Slici 16. na temelju prisutnosti ljubičastih linija na odgovarajućim položajima.



**Slika 16.** Shema za određivanje genotipa apoE. Genotip  $\epsilon 2/2$  (cistein na položajima 112 i 158) karakteriziraju ljubičaste linije na položajima 23 i 25; genotip  $\epsilon 2/3$  linije na položajima 23, 25 i 26; genotip  $\epsilon 2/4$  linije na položajima 23-26; genotip  $\epsilon 3/3$  (cistein na položaju 112 i arginin na položaju 158), linije na položajima 23 i 26; genotip  $\epsilon 3/4$  linije na položajima 23, 24 i 26; te genotip  $\epsilon 4/4$  (arginin na položajima 112 i 158) linije na položajima 24 i 26.

Na Slici 17. prikazan je primjer dobivenih rezultata za uzorke genomske DNA 8 ispitanika.



**Slika 17.** Testne trakice CVD nakon hibridizacije i završne kromogene reakcije za 8 ispitanika. Crvene strelice prikazuju način analize dobivenih rezultata (1 ljubičasta linija označava homozigote za divlji tip i mutanta ovisno o položaju, a 2 ljubičaste linije heterozigota), dok crna strelica označava kontrolni uzorak.

#### 4. 2. 3. GENOTIPIZACIJA HPA METODOM ALEL-SPECIFIČNOG PCR-A

Alel-specifični PCR (engl. *allele-specific* PCR) je oblik PCR-a koji se izvodi u dvije paralelne reakcije. U prvoj reakciji 5' početnica je komplementarna sekvenci divljeg tipa, dok je u drugoj reakciji 5' početnica komplementarna mutaciji, odnosno polimorfizmu sekvence. Pri tome se umnožava samo jedan alel (divljeg tipa ili mutirane DNA) i to samo u slučaju kad su početnica i sekvenca od interesa komplementarne.

Genotipizacija HPA-1, -2, -3 i -5 provedena je uporabom početnica prema Klüтеру i suradnicima koje su prikazane u Tablici 6. (223).

**Tablica 6.** Početnice uporabljene za genotipizaciju HPA-1, -2, -3 i -5.

| Naziv početnice | Slijed početnice                               | Veličina umnoženog produkta (pb) |
|-----------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| HPA-1a-I        | 5'- ACT TAC AGG CCC TGC CTC T-3'               | 196                              |
| HPA-1b-I        | 5'- ACT TAC AGG CCC TGC CTC C-3'               | 196                              |
| HPA-1-II z      | 5'- GTG CAA TCC TCT GGG GAC T-3'               |                                  |
| HPA-2a-I        | 5'- CCC CCA GGG CTC CTG AC-3'                  | 241                              |
| HPA-2b-I        | 5'- CCC CCA GGG CTC CTG AT-3'                  | 241                              |
| HPA-2-II z      | 5'- GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG-3'              |                                  |
| HPA-3a-II       | 5'- GGG GGA GGG GCT GGG GA-3'                  | 293                              |
| HPA-3b-II       | 5'- GGG GGA GGG GCT GGG GC-3'                  | 293                              |
| HPA-3-I z       | 5'- GGC CCT GGG ACT GTG AAT G-3'               |                                  |
| HPA-5a-I        | 5'- AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG-3'  | 250                              |
| HPA-5b-I        | 5'- AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA-3'  | 250                              |
| HPA-5-II z      | 5'- CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA-3'             |                                  |
| CRP-I           | 5'- CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG-3' | 440                              |
| CRP-II          | 5'- GGA TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA-3' |                                  |

#### Postupak:

Za svakog ispitanika pripremljeno je 8 reakcijskih smjesa potrebnih za umnožavanje HPA-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -5a, -5b koje su sadržavale alel-specifične HPA početnice i početnice unutarnje pozitivne kontrole CRP-a. Konačne koncentracije reaktanata u reakcijskim smjesama PCR bile su: 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol/L dNTP, 0,5 μmol/L HPA početnica, 0,05 μmol/L CRP početnica, 50 ng genomske DNA i 0,5 U AmpliTaq Gold polimeraze u ukupnom volumenu od 20 μL. Svi reagensi su bili od tvrtke Applied Biosystems (Foster City, SAD) osim početnica (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Njemačka).

Sve reakcije umnožavanja izvedene su na termobloku GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) uz istovjetne reakcijske uvjete: početna denaturacija na 95 °C/10 min, zatim 10 ciklusa na 95 °C/15 s, 67 °C/30 s i 72 °C/30 s, te 25 ciklusa na 95 °C/15 s, 61 °C/30 s i 72 °C/30 s, sa završnom sintezom na 72 °C/10 min.

Kao pozitivne kontrole u pojedinim reakcijama genotipizacije korišten je referentni materijal, izdvojena DNA B-limfoblastoidnih staničnih linija:

1. COX (HPA-1a/a, -2a/a, -3a/a, -5a/a),
2. HAG (HPA-1a/a, -2a/a, -3a/b, -5a/b),
3. KAS011 (HPA-1a/a, -2a/a, -3a/b, -5a/b)

### **Provjera uspješnosti genotipizacije:**

Provjera uspješnosti genotipizacije ispitana je elektroforetskim razdvajanjem na 2%-tnom agaroznom gelu.

Reagensi:

1. 2%-tni agarozni gel:

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Agaroz (Roche Molecular Biochemicals) | 2,0 g    |
| Puferska otopina 1xTBE                | 100,0 mL |
| Etidijev bromid (Merck), 10mg/mL      | 2,4 µL   |

2. Puferska otopina 10x TBE:

|                                                  |         |
|--------------------------------------------------|---------|
| Tris (Kemika)                                    | 121,1 g |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Kemika)          | 47,6 g  |
| EDTA (Kemika)                                    | 9,3 g   |
| Sterilna destilirana H <sub>2</sub> O do 1000 mL |         |

3. Puferska otopina 1x TBE:

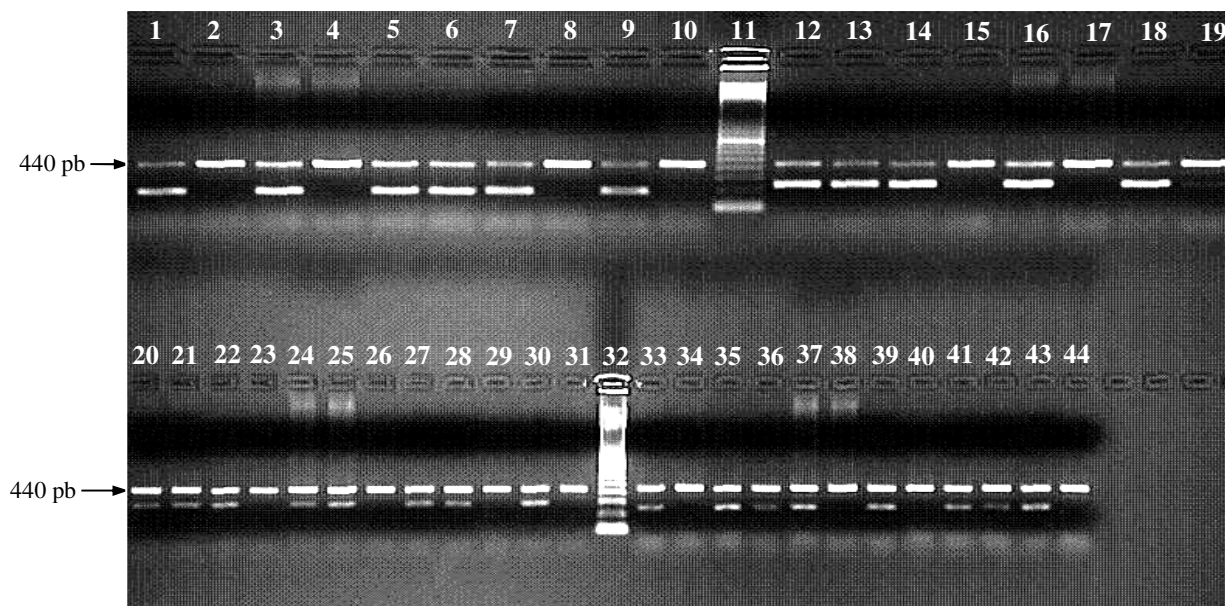
|                                                 |       |
|-------------------------------------------------|-------|
| Puferska otopina 10x TBE                        | 80 mL |
| Sterilna destilirana H <sub>2</sub> O do 800 mL |       |

4. Boja za nanošenje uzoraka (sastav: 5mL 50%-tnog glicerola, 1mL 1%-tnog bromfenolnog plavila, 1 mL 1%-tnog ksilen-cijanola, 1,0 mL 2%-tne puferske otopine 10x TAE, 2 mL sterilne destilirane H<sub>2</sub>O, otopina boje alikvotira se po 1mL i čuva na +4 °C)

5. Biljeg molekularne mase od 100 pb (Amersham, GE Healthcare UK Limited, Amersham Place Little Chalfont. Velika Britanija)

### Postupak elektroforeze:

U 100 mL puferske otopine 1xTBE doda se 2 g agaroze i zagrije do vrenja. Nakon što se otopljena agarozna otopina ohladi na približno 60 °C doda se 2,4 µL etidijevog bromida. Gel se ohladi, izlije u priređenu kadu za elektroforezu i pusti da se skruti. U kadu se izlije ostatak pufera, a na pripremljeni gel nanese se 10 µL umnoženog produkta alel-specifičnog PCR-a i 2 µL boje za nanošenje uzoraka), te 10 µL pripremljenog molekularnog biljega i 2 µL boje za nanošenje uzoraka. Elektroforeza se provodi na 140V/160mA/1h. Gel se nakon završene elektroforeze prenese na UV-transluminator, a dobiveni ulomci dokumentiraju se fotografiranjem kamerom GBOX (Syngene). Prisutnost ulomka od 440 pb ljudskog gena CRP-a kao unutarnje pozitivne kontrole dokaz je uspješnosti umnožavanja, dok se genotip određuje iz izgleda slike na temelju frakcija koje ukazuju na postojanje pojedinih alela (Slika 18.).



**Slika 18.** Elektroforetsko razdvajanje umnoženih produkata alel-specifičnog PCR-a na 2%-tnom agaroznom gelu. Ulomci od 440 pb predstavljaju pozitivnu unutarnju kontrolu (ljudski CRP), a linije 11 i 32 molekularni biljeg od 100 pb.

Linije 1-10 su ulomci HPA-1: linije 1-2, 3-4, 7-10 HPA-1a/a; linije 5-6 HPA-1a/b.

Linije 12-19 su ulomci HPA-2: linije 14-19 HPA-2a/a; linije 12-13 HPA-2a/b.

Linije 20-31 su ulomci HPA-3: linije 22-23, 28-31 HPA-3a/a; linije 20-21, 24-25 HPA-3a/b; linije 26-27 HPA-3 b/b.

Linije 33-44 su ulomci HPA-5: linije 33-34, 37-40, 43-44 HPA-5a/a; linije 35-36, 41-42 HPA-5a/b.

Za statističku obradu rezultata nisu uzeti u obzir dobiveni rezultati genotipizacije testnim sustavom CVD za polimorfizam ApoB R3500Q jer su svi ispitanici imali divlji tip i polimorfizam HPA-1 jer je obrada izvedena rezultatima dobivenim alel-specifičnim PCR-om

za sve polimorfizme HPA (-1, -2, -3 i -5). Dobiveni rezultati za polimorfizam HPA-1 testnim sustavom CVD služili su pri tome kao provjera rezultata dobivenih alel-specifičnim PCR-om.

#### 4. 2. 4. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka napravljena je uporabom programskog sustava MedCalc, verzija 9.3.2.0. na operativnom sustavu Windows (Frank Schoonjans, Nizozemska). Normalnost raspodjele podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Normalno raspodijeljene kontinuirane varijable izražene su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD), a u slučaju kad nisu bile normalno raspodijeljene kao medijani uz odgovarajuće interkvartilne raspone. Usporedba kontinuiranih varijabli između skupina ispitana je Studentovim t-testom ili Mann-Whitneyevim testom ovisno o raspodjeli. Usporedba zastupljenosti dječaka i djevojčica unutar i između skupina napravljena je testom usporedbe proporcija. Za svaki ispitivani polimorfizam dobivene učestalosti genotipova i alela između skupina su uspoređene  $\chi^2$ -testom ili Fisherovim egzaktnim testom ako je broj podataka u skupini bio  $<5$ . Hardy-Weinbergova ravnoteža određena je Courtlabovim kalkulatorom (224), a odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže (razlika između dobivenih i očekivanih genotipova) ispitano je  $\chi^2$ -testom. Moguća povezanost ispitivanih polimorfizama s nastankom moždanog udara utvrđena je na temelju izračunatih omjera izgleda (engl. *odds ratio*, OR) uz pripadajuće 95%-e intervale pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) prema dominantnom, odnosno recesivnom modelu. U dominantnom modelu heterozigotne i homozigotne varijante uspoređene su s homozigotima divljeg tipa, dok su u recesivnom modelu homozigotne varijante uspoređene s heterozigotima i homozigotima divljeg tipa. Učestalosti haplotipova za HPA -1, -2, -3 i ACE, te FV Leiden, FV HR2, MTHFR C677T i MTHFR A1298C određene su uporabom programa za statističku analizu povezanosti haplotipa i bolesti HAPSTAT, verzija 3.0 (Tammy Bailey i Danyu Lin, Chapel Hill, Sjeverna Karolina, SAD) (225). Usporedba učestalosti haplotipova između skupina ispitana je  $\chi^2$ -testom. Modelom logističke regresije ispitan je utjecaj polimorfizama na nastanak MU u djece, kao i na pojedini tip MU. Utjecaj svakog pojedinog polimorfizma na nastanak MU zasebno je ispitan univarijantnim regresijskim modelima, te multivarijantnim modelom kombinacijom više polimorfizama sa statistički značajnim utjecajem ( $P < 0,05$ ). Rezultati logističke regresije izraženi su kao OR uz pripadajuće 95%-e CI. Vrijednosti  $P < 0,05$  smatrane su statistički značajne.

## 5. REZULTATI

### 5.1. KARAKTERISTIKE SKUPINA ISPITANIKA

Istraživanje je provedeno u skupini od 100 djece (63 dječaka i 37 djevojčica) s MU i u kontrolnoj skupini od 100 djece (63 dječaka i 37 djevojčica), sparenih po dobi s djecom s MU. Karakteristike skupina ispitanika uključenih u istraživanje prikazane su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Karakteristike ispitivanih skupina djece s moždanim udarom (N=100) i kontrolne skupine (N=100).

| Karakteristika                                     | Moždani udar   | Kontrolna skupina | P                  |
|----------------------------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|
| <b>Dob pri ispitivanju</b> (godina)*               | 6,6 ± 5,0      | 6,5 ± 4,9         | 0,948 <sup>a</sup> |
| Dječaci (n=63)                                     | 6,6 ± 5,4      | 6,5 ± 5,2         | 0,886 <sup>a</sup> |
| Djevojčice (n=37)                                  | 6,5 ± 4,3      | 6,6 ± 4,4         | 0,916 <sup>a</sup> |
| <b>Dob pri dijagnozi moždanog udara</b> (godina)** | 4,5 (0,5; 9,0) | /                 | /                  |
| Dječaci (n=63)                                     | 3,2 (0,6; 8,7) | /                 | 0,867 <sup>b</sup> |
| Djevojčice (n=37)                                  | 5,2 (0,4; 9,4) | /                 | /                  |

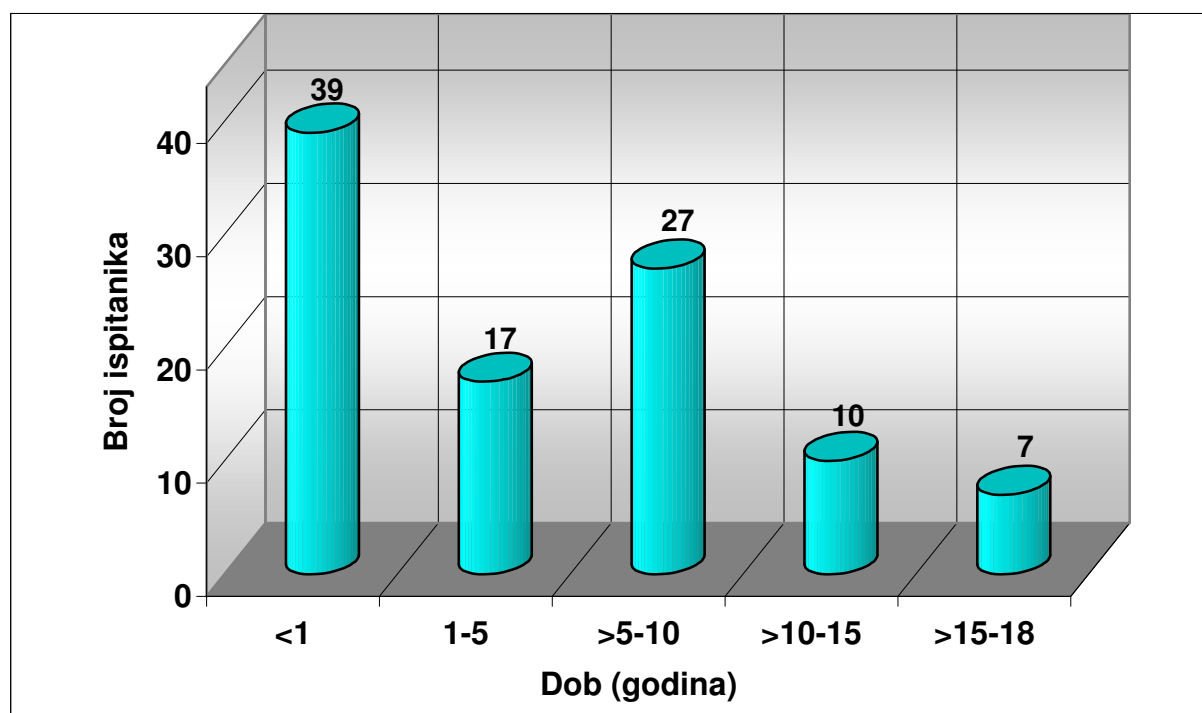
n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj skupini; rezultati su prikazani kao: \*srednja vrijednost±SD, \*\*medijan te interkvartilni raspon; <sup>a</sup>t-test za nezavisne uzorke, <sup>b</sup>Mann-Whitney test za nezavisne uzorke (usporedba dobi pri dijagnozi moždanog udara između dječaka i djevojčica)

Utvrđena je približno 2 puta češća pojavnost MU u dječaka u odnosu na djevojčice, uz dobiveni omjer zastupljenosti dječaka i djevojčica od 1,70:1. Srednje dobi djece s MU i kontrolne skupine iznosile su 6,6 i 6,5 godina i nisu se statistički razlikovale (P=0,948). Dječaci i djevojčice s MU su u vrijeme ispitivanja imali približno istu dob (6,5 i 6,6 godina) te nije utvrđena statistički značajna razlika (P=0,901).

Statistički značajna razlika nije utvrđena ni između srednje dobi dječaka s MU i kontrolne skupine (P=0,886), niti između srednje dobi djevojčica s MU i kontrolne skupine (P=0,916).

Prosječna dob pri dijagnozi MU iznosila je 4,5 godina i statistički se značajno razlikovala (**P=0,016**) od srednje dobi pri ispitivanju (6,6 godina). Iako je MU dijagnosticiran u djevojčica u kasnijoj životnoj dobi (5,2 godina) u odnosu na dječake (3,2 godina), nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P=0,867$ ) između dobi pri dijagnozi MU u dječaka u odnosu na djevojčice.

Djeca s MU su prema dobi kad je dijagnosticiran MU svrstana u 5 dobnih skupina (<1, 1-5, >5-10, >10-15 i >15-18 godina). Raspodjela ispitanika prikazana je grafički na Slici 19.

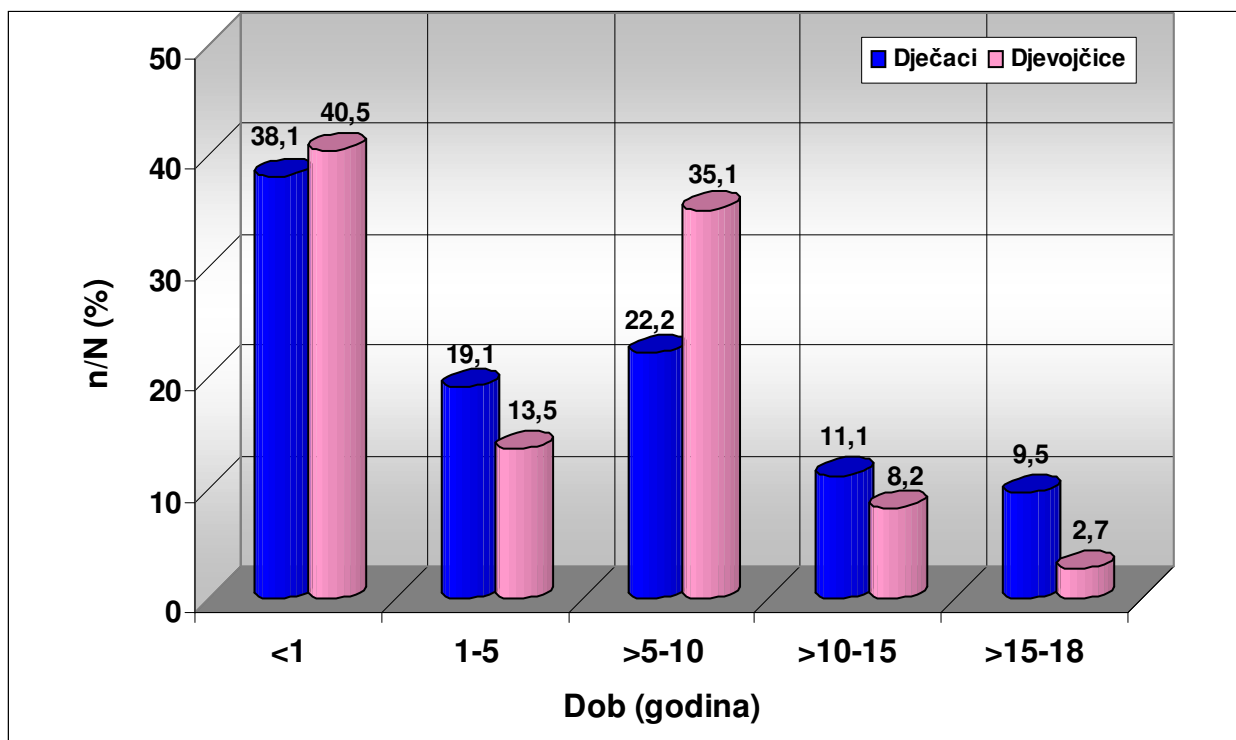


**Slika 19.** Raspodjela djece s moždanim udarom prema dobnim skupinama, ovisno o dobi pri dijagnozi moždanog udara.

Najveći broj MU dijagnosticiran je u djece mlađe od 1 godine (39/100) i u djece od >5-10 godina starosti (27/100), dok je najmanji broj MU dijagnosticiran u djece starije od 15 godina (7/100). Statistički značajno veći broj MU dijagnosticiran je u preadolescenata (djeca mlađa od 13 godina, 88/100) u odnosu na adolescente (dob: 13-18 godina, 12/100) te je pojavnost MU bila 7,3 puta češća u preadolescenata u odnosu na adolescente (**P<0,001**) (43).

Nadalje je ispitana i zastupljenost dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama s obzirom na dob pri dijagnozi MU, a raspodjela zastupljenosti prema spolu grafički je prikazana na Slici 20.





**Slika 20.** Raspodjela zastupljenosti dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama s obzirom na dob pri dijagnozi moždanog udara izražena u %; n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj dobnoj skupini; N predstavlja ukupni broj dječaka ili djevojčica s moždanim udarom.

Najveća zastupljenost i dječaka (24/63) i djevojčica (15/37) u odnosu na ukupni broj dječaka i djevojčica s MU zabilježena je u djece mlađe od 1 godine, te u djece >5-10 godina starosti (dječaci: 14/67, djevojčice: 13/37), dok je najmanja zastupljenost i dječaka (6/63) i djevojčica (1/37) zabilježena u djece starije od 15 godina.

## **5. 2. REZULTATI MORFOLOŠKIH PRETRAGA MOZGA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM**

Dijagnoza MU je potvrđena u svih ispitanika na temelju rezultata najmanje jedne slikovne tehnike morfoloških pretraga (CT-a i/ili MR-a) mozga. Pretraga CT-a mozga je izvedena u 79/100, MR-a mozga u 90/100, a kombinacije CT-a i MR-a mozga u 69/100 djece. Morfološkim pretragama mozga utvrđena je anatomska lokalizacija MU te zahvaćeno vaskularno područje.

Prema anatomske lokalizaciji MU najveći broj djece (91/100) imalo je oštećenje jedne hemisfere dok je 9-ero djece imalo oštećenje obje hemisfere. Kod zahvaćenosti jedne hemisfere, veći broj djece (49/91) imao je oštećenje u lijevoj hemisferi dok je 42/91 djece imalo oštećenje u desnoj hemisferi. Od ukupnog broja MU, veći broj djece (85/100) imao je oštećenje u području prednje moždane cirkulacije, manji broj u području stražnje cirkulacije (11/100), dok je 2 djece imalo oštećenje i prednje i stražnje moždane cirkulacije, a 2 je djece imalo rubno oštećenje prednje i stražnje moždane cirkulacije.

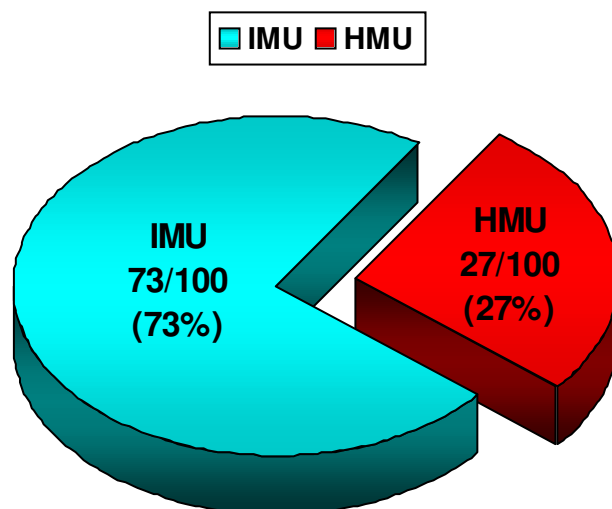
### **5. 2. 1. RASPODJELA DJECE PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA**

Djeca s dijagnozom MU svrstana su u 2 podskupine prema tipu MU: IMU i HMU. Kriteriji za svrstavanje u pojedinu skupinu postavljeni su na temelju kombinacije rezultata slikovnih tehnika, morfoloških pretraga mozga te kliničkih simptoma.

IMU je definiran kao akutni žarišni neurološki poremećaj s trajanjem od najmanje 24 sata, s dokazom moždanog infarkta u arterijskoj ili venskoj distribuciji na prikazu mozga, koji se očitovao kao hemipareza, afazija, poremećaj vida ili ravnoteže ili cerebralni napadaji (226). U novorođenčadi je MU dijagnosticiran nakon napadaja (konvulzija) u prvih nekoliko dana nakon rođenja ili ako je dijagnoza o "pretpostavljenom" MU postavljena retrospektivno nekoliko mjeseci kasnije na temelju kliničkih simptoma hemipareze ili napadaja (226).

HMU je definiran kao akutni žarišni neurološki nedostatak s trajanjem od najmanje 24 sata, s dokazom intrakranijalnog krvarenja na slikovnom prikazu morfološke funkcije mozga koje nije posljedica IMU, sa simptomima glavobolje, povraćanjem, smanjenom razinom svijesti i napadajima (226).

IMU je utvrđen u 73 djece, dok je HMU utvrđen u 27 djece (Slika 21). Prema tome, pojavnost IMU bila je 2,7 puta češća od HMU.



**Slika 21.** Zastupljenost djece unutar skupine djece s MU prema tipu moždanog udara: IMU- ishemijski moždani udar, HMU-hemoragijski moždani udar.

### 5.3. KLINIČKI SIMPTOMI I RIZIČNI ČIMBENICI MOŽDANOG UDARA U DJECE

Analiza kliničkih simptoma MU napravljena je prema dostupnoj medicinskoj dokumentaciji bolesnika, a njihova zastupljenost u djece s MU prikazana je skupno i zasebno za pojedini tip MU (IMU i HMU) u Tablici 8.

Najčešći klinički simptom, bez obzira na tip MU, bila je hemipareza, u čak 50% slučajeva, s tim što je hemipareza u IMU češće bila desnostrana, a u HMU lijevostrana. Od ostalih kliničkih simptoma glavobolja i povraćanje bili su drugi najzastupljeniji simptomi HMU, a cerebralni napadaji simptomi IMU.

**Tablica 8.** Klinički simptomi u skupini djece s ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27), te u skupini djece s moždanim udarom (ukupno N=100).

| Klinički simptom             | Moždani udar |              |         |
|------------------------------|--------------|--------------|---------|
|                              | n (%)        |              |         |
|                              | Ishemijski   | Hemoragijski | Ukupno  |
| Hemipareza                   | 40 (55)      | 10 (37)      | 50 (50) |
| Lijevostrana                 | 17 (23)      | 8 (30)       | 25 (25) |
| Desnostrana                  | 23 (31)      | 2 (7)        | 25 (25) |
| Cerebralni napadaji          | 11 (15)      | 5 (18)       | 16 (16) |
| Distoni sindrom (hipotonija) | 8 (11)       | 1 (4)        | 9 (9)   |
| Monopareza                   | 2 (3)        | 1 (4)        | 3 (3)   |
| Tetrapareza                  | 2 (3)        | 1 (4)        | 3 (3)   |
| Spastičnost                  | 3 (4)        | 1 (4)        | 4 (4)   |
| Glavobolja i povraćanje      | 2 (3)        | 6 (22)       | 8 (8)   |
| Poremećaj ravnoteže          | 1 (1)        | 0 (0)        | 1 (1)   |
| Vrtoglavica                  | 2 (3)        | 0 (0)        | 1 (1)   |
| Povraćanje                   | 1 (1)        | 1 (4)        | 2 (2)   |
| Poremećaji govora            | 1 (1)        | 0 (0)        | 1 (1)   |
| Smetnje vida                 | 0 (0)        | 1 (4)        | 1 (1)   |

n predstavlja broj djece s pojedinim kliničkim simptomom

Rizični su čimbenici utvrđeni u 78/100 djece s MU, od kojih su bili višestruki u 13/100 djece. Utvrđeni rizični čimbenici za osnovnu skupinu djece s MU, kao i za podskupine IMU i HMU, prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Rizični čimbenici utvrđeni u skupini djece s ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27), te u osnovnoj skupini djece s moždanim udarom (ukupno N=100).

| Rizični čimbenik                        | Moždani udar<br>n (%) |                |                |
|-----------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
|                                         | Ishemijski            | Hemoragijski   | Ukupno         |
| Infekcija                               | 19 (26)               | 4 (15)         | 23 (23)        |
| Srčane bolesti                          | 7 (10)                | 1 (4)          | 8 (8)          |
| Vaskulitis                              | 5 (7)                 | 0 (0)          | 5 (5)          |
| Bolest <i>moya-moya</i>                 | 3 (4)                 | 0 (0)          | 3 (3)          |
| Hipoplazija krvne žile                  | 8 (11)                | 4 (15)         | 12 (12)        |
| Perinatalne komplikacije                | 7 (10)                | 1 (4)          | 8 (8)          |
| Trauma glave                            | 1 (1)                 | 1 (4)          | 2 (2)          |
| Sideropenična anemija                   | 1 (1)                 | 0 (0)          | 1 (1)          |
| Koncentracija lipoproteina (a) >0,3 g/L | 7 (10)                | 0 (0)          | 7 (7)          |
| Arterio-venska malformacija             | 0 (0)                 | 4 (15)         | 4 (4)          |
| Aneurizma                               | 0 (0)                 | 1 (3)          | 1 (1)          |
| Hodgkinov limfom                        | 0 (0)                 | 1 (3)          | 1 (3)          |
| <b>Višestruki</b>                       | <b>10 (14)</b>        | <b>3 (11)</b>  | <b>13 (13)</b> |
| <b>Nepoznati</b>                        | <b>12 (16)</b>        | <b>10 (37)</b> | <b>22 (22)</b> |

n predstavlja broj djece s pojedinim kliničkim simptomom

## 5.4. KARAKTERISTIKE SKUPINA DJECE PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA

IMU je utvrđen isključivo u arterijskoj cirkulaciji (arterijski ishemijski moždani udar, AIMU), dok nije utvrđen niti jedan slučaj SVT. Od djece s utvrđenim HMU, najveći broj djece (12/27) imao je ICH, 7/27 djece je imalo IVK, a 4/27 djece imalo je spontani SAH. U 2/27 djece utvrđen je IVK s ICH, dok za 2/27 djece nije bilo moguće iz dostupnih podataka utvrditi o kojem se tipu HMU radilo. Karakteristike djece s AIMU i HMU prikazane su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Karakteristike djece s arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27).

| Karakteristika                                     | Moždani udar          |                 | P                        |
|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|
|                                                    | Arterijski ishemijski | Hemoragijski    |                          |
| <b>Spol n (%)</b>                                  |                       |                 |                          |
| Dječaci                                            | 48 (66)               | 15 (56)         | 0,487 <sup>a</sup>       |
| Djevojčice                                         | 25 (34)               | 12 (44)         | 0,481 <sup>b</sup>       |
| <b>Dob pri ispitivanju (godina)*</b>               | 7,0 ± 4,8             | 5,4 ± 5,4       | 0,149 <sup>c</sup>       |
| Dječaci                                            | 7,6 ± 5,1             | 3,4 ± 5,1       | <b>0,006<sup>c</sup></b> |
| Djevojčice                                         | 5,8 ± 4,0             | 7,9 ± 4,7       | 0,167 <sup>c</sup>       |
| <b>Dob pri dijagnozi moždanog udara (godina)**</b> | 4,3 (0,3; 9,0)        | 5,0 (1,0; 9,0)  | 0,678 <sup>d</sup>       |
| Dječaci                                            | 4,4 (0,3; 9,9)        | 1,2 (0,5; 4,5)  | 0,223 <sup>d</sup>       |
| Djevojčice                                         | 4,0 (0,3; 7,8)        | 5,6 (5,0; 11,5) | <b>0,031<sup>d</sup></b> |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj skupini; rezultati su prikazani kao: \*srednja vrijednost±SD, \*\*medijan i interkvartilni raspon; <sup>a</sup>test usporedbe proporcija zastupljenosti dječaka s arterijskim ishemijskim i hemoragijskim moždanim udarom, <sup>b</sup>test usporedbe proporcija zastupljenosti djevojčica s arterijskim ishemijskim i hemoragijskim moždanim udarom <sup>c</sup>t-test za nezavisne uzorke, <sup>d</sup>Mann-Whitney test za nezavisne uzorke (usporedba dobi pri dijagnozi moždanog udara između arterijskog ishemijskog i hemoragijskoga moždanog udara).

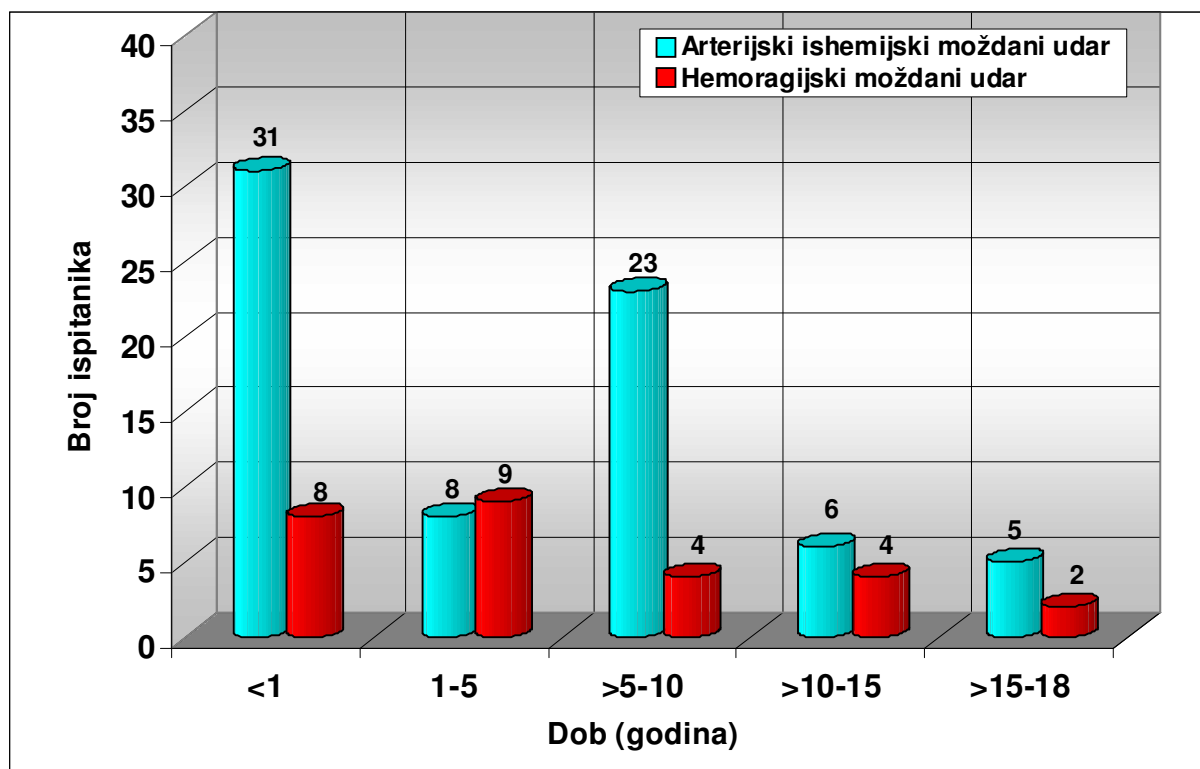
Utvrđena je statistički značajno veća pojavnost AIMU u dječaka (48/73, **P<0,001**) u odnosu na djevojčice (25/73), tj. zastupljenost dječaka je bila 1,92 puta veća od zastupljenosti djevojčica (omjer zastupljenosti dječaka i djevojčica iznosio je 1,92:1). Nadalje, utvrđena je i češća pojavnost HMU u dječaka (15/27) u odnosu na djevojčice (12/27), tj. zastupljenost dječaka bila je 1,25 puta veća od zastupljenosti djevojčica, ali nije bila statistički značajna (P=0,586). Usporedbom zastupljenosti spolova u skupinama djece s AIMU i HMU nije dobivena statistički značajna razlika u zastupljenosti dječaka (P=0,487) ni djevojčica (P=0,481).

Iako je srednja dob djece s AIMU bila viša (7,0 godina) u odnosu na srednju dob djece s HMU (5,4 godina), nije utvrđena statistička značajna razlika (P=0,149). Dječaci i djevojčice s AIMU su u vrijeme ispitivanja imali približno istu dob (7,6 i 5,8 godina), te nije utvrđena statistički značajna razlika (P=0,122). Za razliku od toga, utvrđena je statistički značajna razlika između srednje dobi ispitivanja dječaka i djevojčica s HMU (**P=0,025**), kao i između

srednje dobi dječaka s AIMU i HMU (**P=0,006**), ali ne i između srednje dobi djevojčica s AIMU i HMU (P=0,167).

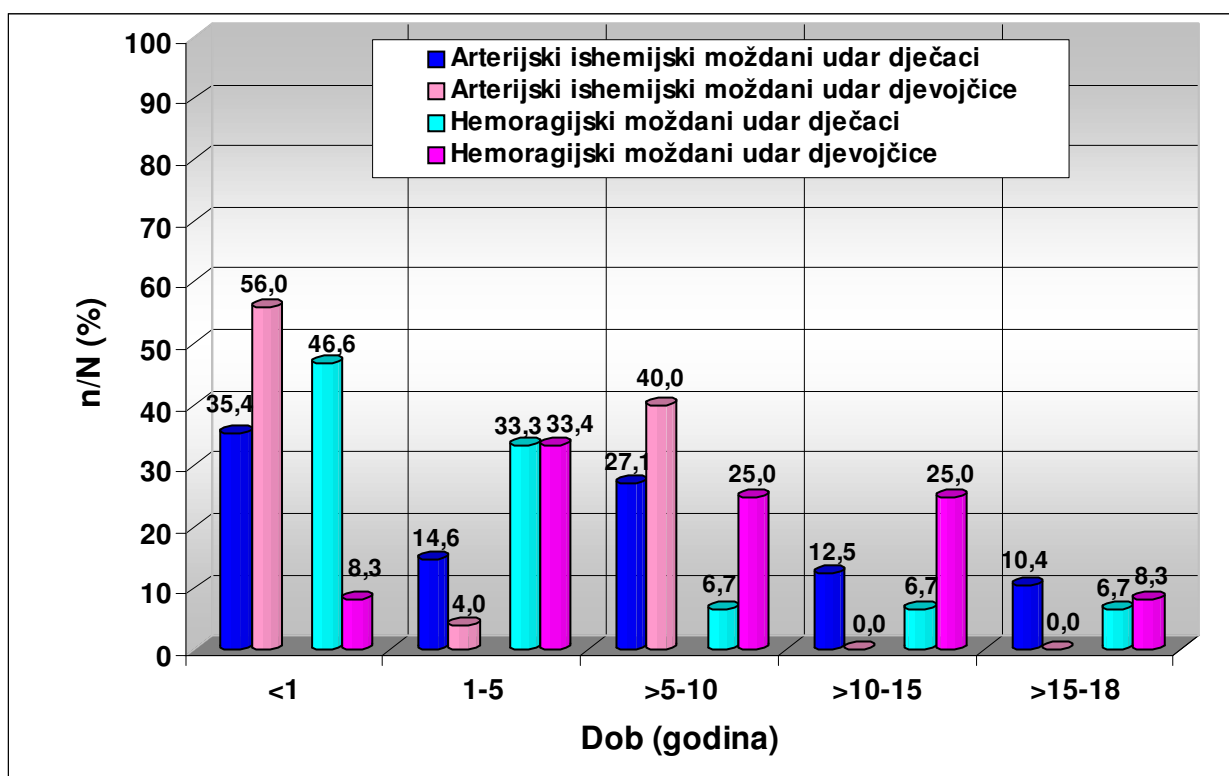
Prosječna dob pri dijagnozi AIMU iznosila je 4,3 godine i nije se statistički značajno razlikovala (P=0,067) od srednje dobi ispitivanja (7,0 godina). Dob dijagnoze AIMU bila je približno jednaka u dječaka (4,4 godina) i djevojčica (4,0 godina) te nije utvrđena statistički značajna razlika (P=0,185). Za razliku od toga, HMU je dijagnosticiran u djevojčica u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na dječake (5,6 u odnosu prema 1,2 godina), te je utvrđena statistički značajna razlika (**P=0,013**) između dobi dijagnoze HMU u dječaka u odnosu na djevojčice. Iako je AIMU dijagnosticiran u dječaka u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na HMU (4,4 u odnosu prema 1,23 godina), nije utvrđena statistički značajna razlika (P=0,223). Za razliku od toga statistički značajna razlika je utvrđena između medijana dobi pri dijagnozi AIMU i HMU u djevojčica (**P=0,013**).

Djeca s AIMU i HMU su prema dobi kad je dijagnosticiran MU svrstana u 5 dobnih skupina (<1, 1-5, >5-10, >10-15 i >15-18 godina). Raspodjela ispitanika prikazana je grafički na Slici 22.



**Slika 22.** Raspodjela djece s arterijskim ishemijskim i hemoragijskim moždanim udarom prema dobnim skupinama, ovisno o dobi dijagnoze moždanog udara.

Istraživanjem je pokazano da je i AIMU i HMU u najvećem broju dijagnosticiran u djece mlađe od 1 godine (31/73 i 8/27). Druga najčešća dobna skupina bila je od 1-5 godina za HMU (9/27) te od >5-10 godina starosti (23/73) za AIMU, dok je u djece starije od 15 godina AIMU dijagnosticiran samo u 5/73 djece, a HMU u 2/27 djece. Analizom učestalosti pojavnosti MU, veći broj AIMU i HMU dijagnosticiran je u preadolescenata u odnosu na adolescente, i to 7,1 puta veći broj AIMU (64/73) te 8 puta veći broj HMU (24/27). Raspodjela zastupljenosti dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama s obzirom na dob pri dijagnozi AIMU prikazana je na Slici 23.



**Slika 23.** Raspodjela zastupljenosti dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama s obzirom na dob pri dijagnozi arterijskog ishemijskog ili hemoragijskog moždanog udara izražena u %; n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj dobnoj skupini; N predstavlja ukupni broj dječaka ili djevojčica s pojedinim tipom moždanog udara.

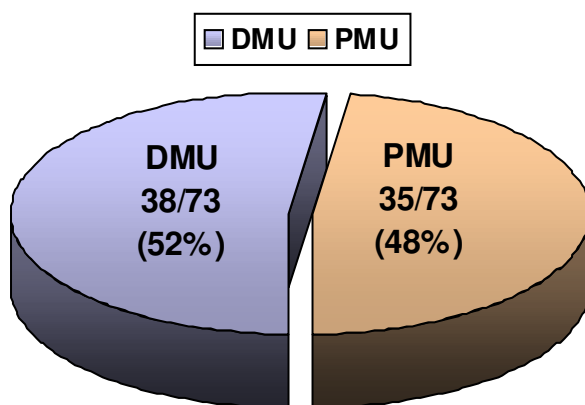
Najveća zastupljenost i dječaka (17/48) i djevojčica (14/25) u odnosu na ukupni broj dječaka i djevojčica s AIMU zabilježena je u djece mlađe od 1 godine te u djece >5-10 godina starosti (dječaci: 13/48, djevojčice: 10/25), dok je najmanja zastupljenost dječaka (5/48) zabilježena u djece starije od 15 godina. Nijedan slučaj AIMU nije zabilježen u djevojčica starijih od 15 g. Najveća zastupljenost dječaka (7/15) u odnosu na ukupni broj dječaka s HMU zabilježena je u mlađim dobnim skupinama i to u djece mlađe od 1 godine te u djece od 1-5



godina starosti (5/15), dok je svega 3/15 dječaka u preostale tri dobne skupine. Za razliku od dječaka, najveća zastupljenost djevojčica s HMU zabilježena je u djece od 1-5 godina (4/12), >5-10 godina (3/12) i >10-15 godina (3/12), dok je po svega 1 djevojčica bila iz dobne skupine <1 i >15 godina.

## 5.5. KARAKTERISTIKE SKUPINE DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM

Unutar skupine djece s AIMU izvršena je podjela u dvije podskupine s obzirom na dob pojave MU: u skupinu perinatalnog arterijskog ishemijskoga moždanog udara (PMU) i skupinu arterijskog ishemijskoga moždanog udara u dječjoj dobi (skupina DMU). PMU je utvrđen u 38-ero djece dok je DMU utvrđen u 35-ero djece, a zastupljenost djece u pojedinim podskupinama prikazana je na Slici 24, dok su karakteristike djece s PMU i s DMU prikazane u Tablici 11.



**Slika 24.** Zastupljenost djece unutar skupine djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom s obzirom na dob pojave moždanog udara: DMU-arterijski ishemijski moždani udar u dječjoj dobi, PMU-perinatalni arterijski ishemijski moždani udar.

**Tablica 11.** Karakteristike djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35) i s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38).

| Karakteristika                                     | Arterijski ishemijski moždani udar |                 | P                            |
|----------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------|
|                                                    | Perinatalni                        | Dječja dob      |                              |
| <b>Spol n (%)</b>                                  |                                    |                 |                              |
| Dječaci                                            | 20 (57)                            | 28 (74)         | 0,199 <sup>a</sup>           |
| Djevojčice                                         | 15 (43)                            | 10 (26)         | 0,199 <sup>b</sup>           |
| <b>Dob pri ispitivanju (godina)*</b>               | 4,7 ± 3,9                          | 9,2 ± 4,5       | <b>&lt;0,001<sup>c</sup></b> |
| Dječaci                                            | 4,5 ± 3,5                          | 9,9 ± 4,8       | <b>&lt;0,001<sup>c</sup></b> |
| Djevojčice                                         | 4,9 ± 4,5                          | 7,2 ± 2,8       | 0,151 <sup>c</sup>           |
| <b>Dob pri dijagnozi moždanog udara (godina)**</b> | 0,3 (0,2; 0,8)                     | 8,6 (5,2; 12,0) | <b>&lt;0,001<sup>d</sup></b> |
| Dječaci                                            | 0,2 (0,2; 0,7)                     | 9,3 (5,4; 13,8) | <b>&lt;0,001<sup>d</sup></b> |
| Djevojčice                                         | 0,6 (0,2; 4,2)                     | 7,4 (5,2; 8,7)  | <b>0,008<sup>d</sup></b>     |

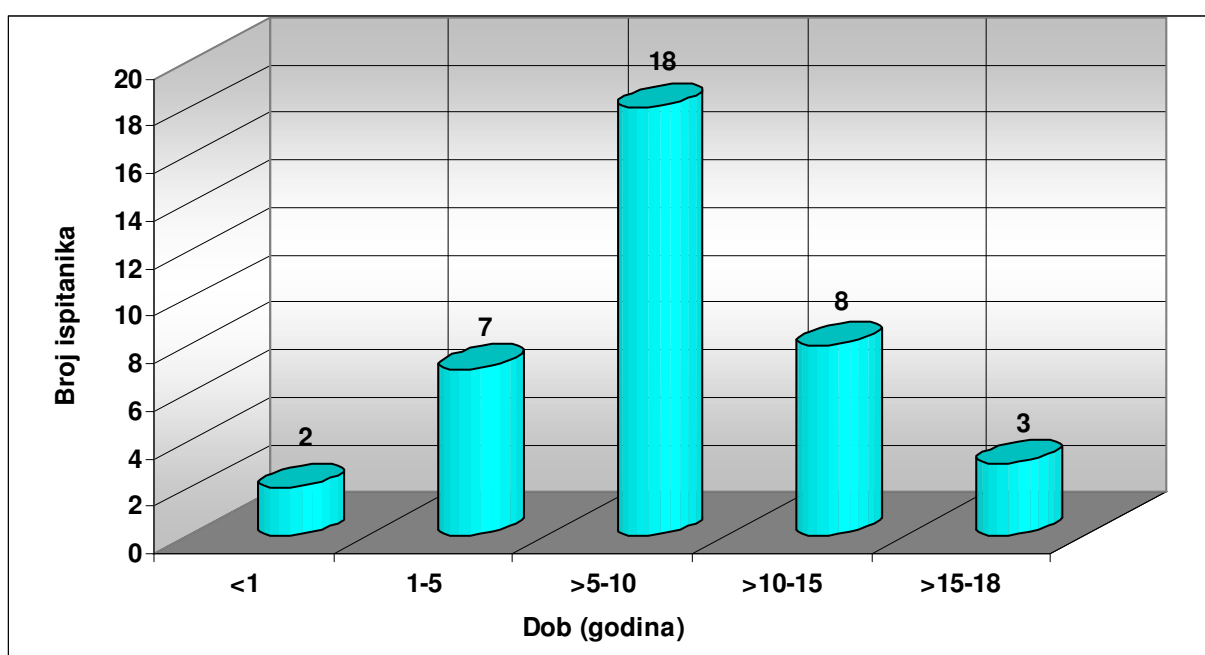
n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj skupini; rezultati su prikazani kao: \*srednja vrijednost±SD, \*\*medijan i interkvartilni raspon; <sup>a</sup>test usporedbe proporcija zastupljenosti dječaka s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi, <sup>b</sup>test usporedbe proporcija zastupljenosti djevojčica s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i arterijskim ishemijskim moždanim udarom dječje dobi, <sup>c</sup>t-test za nezavisne uzorke, <sup>d</sup>Mann-Whitney test za nezavisne uzorke (usporedba dobi pri dijagnozi moždanog udara između perinatalnog arterijskog ishemijskoga moždanog udara i arterijskog ishemijskoga moždanog udara u dječjoj dobi).

Ispitivanjem je utvrđena veća zastupljenost dječaka u odnosu na djevojčice u obje podskupine AIMU. Zabilježen je veći omjer zastupljenosti dječaka i djevojčica u DMU (2,8:1) nego u PMU (1,3:1), uz statistički značajnu razliku u pojavnosti DMU između dječaka i djevojčica (**P<0,001**), dok nije utvrđena statistički značajna razlika pojavnosti PMU u dječaka u odnosu na djevojčice (P=0,351). Zastupljenost dječaka u djece s PMU i DMU nije se statistički značajno razlikovala (P=0,199) kao ni djevojčica u ispitivanim skupinama (P=0,199).

Iako je srednja dob dječaka s DMU u vrijeme ispitivanja bila viša (9,9 godina) od srednje dobi djevojčica (7,2 godina), nije utvrđena statistički značajna razlika (P=0,114), kao ni između dobi pri dijagnozi u dječaka (medijan: 9,4 godina) i djevojčica (medijan: 7,4

godina), ( $P=0,127$ ). Iako je medijan dobi pri dijagnozi PMU bio veći u djevojčica (0,6 godina) u odnosu na dječake (0,2 godine), nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P=0,494$ ). Dob pri dijagnozi PMU (medijan: 0,3 godina) statistički se značajno razlikovala ( $P<0,001$ ) od dobi ispitivanja (medijan: 3,2 godina). MU je dijagnosticiran prije 28. dana života samo u 5 od 35 novorođenčadi, dok je u 30 pretpostavka o PMU postavljena nekoliko mjeseci nakon kliničkih simptoma.

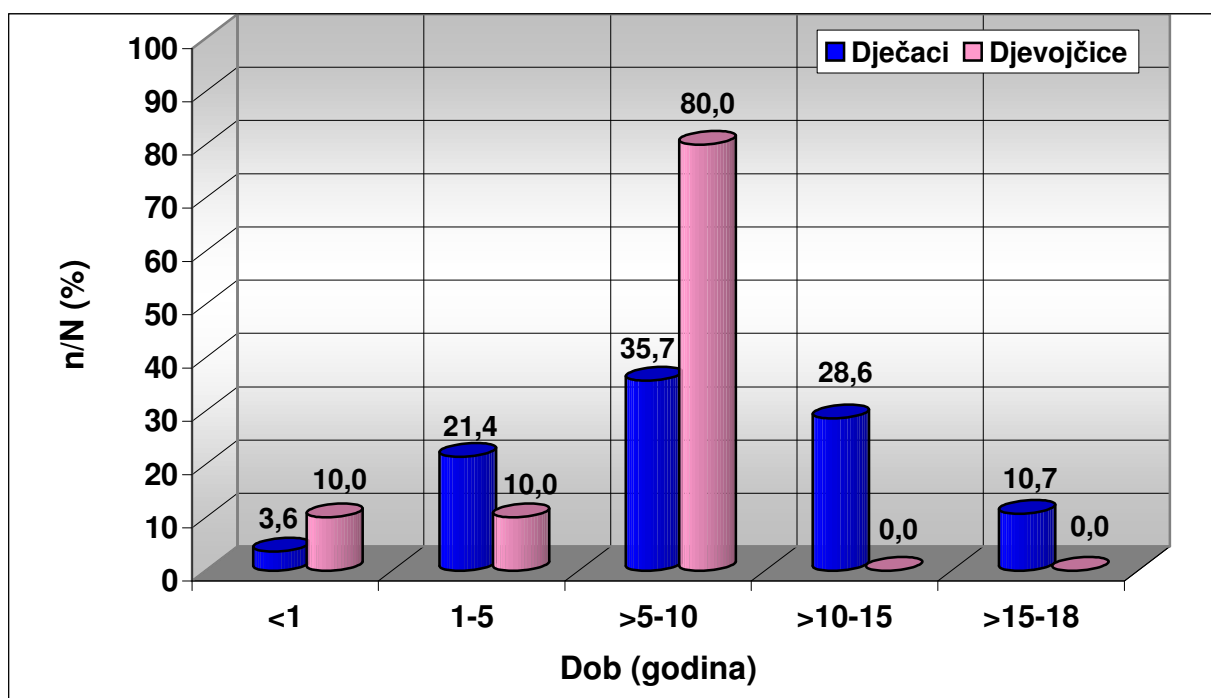
Djeca s DMU su prema dobi kad je dijagnosticiran MU svrstana u 5 dobnih skupina (<1, 1-5, >5-10, >10-15 i >15-18 godina). Raspodjela ispitanika prikazana je grafički na Slici 25.



**Slika 25.** Raspodjela djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi prema dobnim skupinama, ovisno o dobi pri dijagnozi moždanog udara.

Istraživanjem je pokazano da je DMU u najvećem broju dijagnosticiran u djece od >5-10 godina starosti (18/38; 47%) te u djece od >10-15 godina starosti (8/38; 21%) i 1-5 godina starosti (7/38; 18%), a najmanje u djece mlađe od 1 godine (2/38; 5%) i starije od 15 godina (3/38; 7%). Analizom učestalosti pojavnosti DMU, 3,2 puta veći broj moždanih udara dijagnosticiran je u preadolescenata (29/38) u odnosu na adolescente (9/38).

Raspodjela zastupljenosti dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama s obzirom na dob pri dijagnozi DMU prikazana je na Slici 26.



**Slika 26.** Raspodjela zastupljenosti dječaka i djevojčica prema dobnim skupinama u djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi s obzirom na dob pri dijagnozi moždanog udara izražena u %; n predstavlja broj dječaka ili djevojčica u pojedinoj dobnj skupini; N predstavlja ukupni broj dječaka ili djevojčica s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi.

Najveća zastupljenost i dječaka (10/28) i djevojčica (8/10) u odnosu na ukupni broj dječaka i djevojčica s DMU zabilježena je u djece >5-10 godina starosti. Najmanja zastupljenost dječaka zabilježena je u djece mlađe od 1 godine (1/28), dok niti u jedne djevojčice starije od 10 godina nije dijagnosticiran DMU.

## 5. 6. REZULTATI SLIKOVNIH MORFOLOŠKIH PRETRAGA MOZGA U DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM MOŽDANI UDAROM

Pretraga CT-a mozga izvedena je u 56/73 djece s AIMU i to u 25/35 djece s PMU i u 31/38 djece s DMU, MR-a mozga u 68/73 djece s AIMU (32/35 s PMU i u 36/38 s DMU), te kombinacije CT-a i MR-a mozga u 51/73 djece s AIMU (22/35 s PIMU i u 29/38 s DMU). Na temelju rezultata slikovnih morfoloških pretraga mozga u djece s potvrđenom dijagnozom AIMU utvrđena je anatomska lokalizacija oštećenja te su rezultati obrađeni zasebno za skupinu djece s PMU i za skupinu djece s DMU (Tablica 12).

**Tablica 12.** Anatomska lokalizacija moždanog udara i zahvaćeno vaskularno područje u skupinama djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35), arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38), te u skupini djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=73).

| Anatomska lokalizacija moždanog udara /<br>zahvaćeno vaskularno područje    | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |            |         |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|---------|
|                                                                             | Perinatalni                                 | Dječja dob | Ukupno  |
| <b>Anatomska lokalizacija moždanog udara</b>                                |                                             |            |         |
| Jedna hemisfera                                                             | 31 (89)                                     | 36 (95)    | 67 (92) |
| Lijeva                                                                      | 20 (57)                                     | 17 (45)    | 37 (51) |
| Desna                                                                       | 11 (32)                                     | 19 (50)    | 30 (41) |
| Dvije hemisfere                                                             | 4 (11)                                      | 2 (5)      | 6 (8)   |
| <b>Zahvaćeno vaskularno područje</b>                                        |                                             |            |         |
| <b>Jedna arterija</b>                                                       | 30 (86)                                     | 32 (84)    | 62 (85) |
| Srednja moždana arterija                                                    | 27 (77)                                     | 26 (68)    | 53 (73) |
| Glavna grana                                                                | 14 (40)                                     | 8 (21)     | 22 (30) |
| Kortikalno područje                                                         | 5 (14)                                      | 8 (21)     | 13 (18) |
| Subkortikalne strukture                                                     | 3 (9)                                       | 8 (21)     | 11 (15) |
| Nije precizirano                                                            | 5 (14)                                      | 2 (5)      | 7 (10)  |
| Prednja moždana arterija                                                    | 0 (0)                                       | 2 (5)      | 2 (3)   |
| Stražnja moždana arterija                                                   | 3 (9)                                       | 3 (8)      | 6 (8)   |
| Cerebelarna arterija                                                        | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |
| <b>Rubno područje</b>                                                       | 3 (9)                                       | 3 (8)      | 6 (8)   |
| Srednja i prednja moždana arterija                                          | 2 (6)                                       | 3 (8)      | 5 (7)   |
| Srednja i stražnja moždana arterija                                         | 1 (3)                                       | 0 (0)      | 1 (1)   |
| <b>Dvije arterije</b>                                                       | 2 (6)                                       | 2 (5)      | 4 (5)   |
| Srednja i prednja moždana arterija                                          | 1 (3)                                       | 0 (0)      | 1 (1)   |
| Srednja i stražnja moždana arterija                                         | 1 (3)                                       | 1 (3)      | 2 (3)   |
| Srednja moždana i unutarnja karotidna arterija                              | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |
| <b>Rubno područje više arterija</b>                                         | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |
| Srednja i prednja moždana arterija + srednja i<br>stražnja moždana arterija | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |

n predstavlja broj djece s obzirom na lokalizaciju moždanog udara

Prema anatomske lokalizaciji oštećenja u djece s AIMU 67/73 djece imalo je oštećenje jedne hemisfere, dok je 6/73 djece imalo oštećenje obje hemisfere. Kod zahvaćenosti jedne hemisfere, veći broj djece (37/73) imao je oštećenje u lijevoj hemisferi, dok je 30/73 djece

imalo oštećenje u desnoj hemisferi. U 62/73 djece oštećenje je bilo posljedica infarkta lokaliziranog na području samo jedne od arterija moždanog krvotoka, u 4/73 dvije ili više arterija, dok je po 2/27 djece imalo oštećenje rubnog područja između dvije ili više moždanih arterija.

Od ukupnog broja djece s AIMU, veći broj djece (60/73) imao je oštećenje u području prednje moždane cirkulacije, manji broj u području stražnje cirkulacije (7/73), dok je 3/73 djece imalo oštećenje i prednje i stražnje moždane cirkulacije, a 2/73 djece imalo je rubno oštećenje prednje i stražnje moždane cirkulacije.

Manji broj djece s PMU (4/35) i DMU (2/38) imao je oštećenje obje hemisfere. Kod oštećenja jedne hemisfere u djece s PMU (31/35) veći broj djece imao je oštećenje lijeve hemisfere (20/31), dok je u djece s DMU (36/38) veći broj djece imao oštećenje desne hemisfere (19/36). U obje podskupine (PMU i DMU) oštećenje je najčešće bilo posljedica infarkta jedne od arterija moždanog krvotoka i to u najvećem broju djece srednje moždane arterije (PMU: 27/30, DMU: 26/32). U obje podskupine veći broj djece imao je oštećenje u području prednje moždane cirkulacije (PMU: 32/35, DMU: 31/38), manji broj u području stražnje moždane cirkulacije (PMU: 3/35, DMU: 4/38), 1/35 djece s PMU i 2/38 djece s DMU imalo je oštećenje i prednje i stražnje moždane cirkulacije, dok je 1/35 djece s PMU i 1/38 djece s DMU imalo rubno oštećenje prednje i stražnje moždane cirkulacije.

## 5.7. KLINIČKI SIMPTOMI I RIZIČNI ČIMBENICI ARTERIJSKOG ISHEMIJSKOGA MOŽDANOG UDARA

Uvidom u medicinsku dokumentaciju djece s AIMU zabilježeni klinički simptomi kao i njihova zastupljenost u djece s PMU i s DMU prikazani su u Tablici 13.

**Tablica 13.** Klinički simptomi u skupinama djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35), arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38) te u skupini djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=73).

| Klinički simptom             | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |            |         |
|------------------------------|---------------------------------------------|------------|---------|
|                              | Perinatalni                                 | Dječja dob | Ukupno  |
| Hemipareza                   | 20 (57)                                     | 20 (53)    | 40 (55) |
| Lijevostrana                 | 8 (23)                                      | 9 (24)     | 17 (23) |
| Desnostrana                  | 12 (34)                                     | 11 (29)    | 23 (31) |
| Cerebralni napadaji          | 2 (6)                                       | 9 (24)     | 11 (15) |
| Distoni sindrom (hipotonija) | 7 (20)                                      | 1 (3)      | 8 (11)  |
| Monopareza                   | 0 (0)                                       | 2 (5)      | 2 (3)   |
| Tetrapareza                  | 2 (6)                                       | 0 (0)      | 2 (3)   |
| Spastičnost                  | 3 (9)                                       | 0 (0)      | 3 (4)   |
| Glavobolja                   | 0 (0)                                       | 2 (5)      | 2 (3)   |
| Poremećaj ravnoteže          | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |
| Vrtoglavica                  | 1 (3)                                       | 1 (3)      | 2 (3)   |
| Povraćanje                   | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |
| Poremećaji govora            | 0 (0)                                       | 1 (3)      | 1 (1)   |

n predstavlja broj djece s obzirom na lokalizaciju moždanog udara

Najčešći klinički simptom i u djece s PMU i s DMU bila je hemipareza, u približno 50% slučajeva, i to češće desnostrana u oba podtipa AIMU. Od ostalih kliničkih simptoma drugi najzastupljeniji simptomi u djece s PMU bio je distoni sindrom, a u djece s DMU cerebralni napadaji. U Tablici 14. prikazani su utvrđeni rizični čimbenici u djece s AIMU i u skupinama djece s PMU i DMU.

**Tablica 14.** Rizični čimbenici utvrđeni u skupinama djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35), arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38) te u skupini djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=73).

| Rizični čimbenik                        | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |               |                |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------|---------------|----------------|
|                                         | Perinatalni                                 | Dječja dob    | Ukupno         |
| Infekcija                               | 9 (26)                                      | 10 (26)       | 19 (26)        |
| Srčane bolesti                          | 3 (9)                                       | 4 (10)        | 7 (10)         |
| Vaskulitis                              | 0 (0)                                       | 5 (13)        | 5 (7)          |
| Bolest <i>moya-moya</i>                 | 1 (3)                                       | 2 (5)         | 3 (4)          |
| Hipoplazija krvne žile                  | 4 (11)                                      | 4 (10)        | 8 (11)         |
| Perinatalne komplikacije                | 7 (20)                                      | 0 (0)         | 7 (10)         |
| Trauma glave                            | 0 (0)                                       | 1 (3)         | 1 (1)          |
| Sideropenična anemija                   | 0 (0)                                       | 1 (3)         | 1 (1)          |
| Koncentracija lipoproteina (a) >0,3 g/L | 2 (6)                                       | 5 (13)        | 7 (10)         |
| <b>Višestruki</b>                       | <b>5 (14)</b>                               | <b>5 (13)</b> | <b>10 (14)</b> |
| <b>Nepoznati</b>                        | <b>7 (20)</b>                               | <b>5 (13)</b> | <b>12 (16)</b> |

n predstavlja broj djece s obzirom na lokalizaciju moždanog udara u pojedinoj skupini

U većini djece s AIMU 61/73 (84%) utvrđen je najmanje 1 rizični čimbenik. Niti jedan rizični čimbenik nije utvrđen u 7/35 (20%) djece s PMU te u 5/38 (13%) djece s DMU. Višestruki rizični čimbenici utvrđeni su u po 5-ero djece iz svake podskupine, odnosno u ukupno 10/73 (14%) djece s AIMU. Najzastupljeniji rizični čimbenik u približno trećine djece u obje podskupine bila je infekcija. Drugi najzastupljeniji rizični čimbenici u djece s PMU bile su perinatalne komplikacije, a u djece s DMU povišena koncentracija lipoproteina (a) i vaskulitis.



## 5.8. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM I KONTROLNOJ SKUPINI

U djece s MU i kontrolnoj skupini napravljena je genotipizacija 14 polimorfizama u 12 gena: FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G, MTHFR C677T i A1298C, ACE I/D, apoE  $\epsilon$ 2-4 te HPA-1, -2, -3 i -5. Raspodjele učestalosti genotipova i alela za svaki ispitani polimorfizam u skupini djece s MU i kontrolnoj skupini prikazane su u Tablicama 15. i 16.

Statistička analiza usporedbe raspodjele genotipova u djece s MU i kontrolnoj skupini napravljena je uporabom dominantnog modela (heterozigoti+homozigoti za polimorfni alel u odnosu na homozigote za divlji tip) za sve polimorfizme osim za MTHFR C677T koji je analiziran prema recesivnom modelu (homozigoti za divlji tip+heterozigoti u odnosu na homozigote za polimorfni alel) i apoE  $\epsilon$ 2-4 kod kojeg je analiziran genotip  $\epsilon$ 3/3 u odnosu prema zbroju ostalih genotipova apoE  $\epsilon$ 2-4.

**Tablica 15.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama u djece s moždanim udarom (N=100) i kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam         | Genotip | Moždani udar<br>n (%) | Kontrolna skupina<br>n (%) | P                        |
|----------------------|---------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
| FV Leiden (G1691A)   | GG      | 89 (89,0)             | 97 (97,0)                  | <b>0,049<sup>a</sup></b> |
|                      | GA      | 11 (11,0)             | 3 (3,0)                    |                          |
|                      | AA      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)                    |                          |
| FV HR2 (A4070G)      | AA      | 79 (79,0)             | 79 (79,0)                  | 0,862 <sup>a</sup>       |
|                      | GA      | 21 (21,0)             | 21 (21,0)                  |                          |
|                      | GG      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)                    |                          |
| FII G20210A          | GG      | 98 (98,0)             | 97 (97,0)                  | 1,000 <sup>a</sup>       |
|                      | GA      | 2 (2,0)               | 3 (3,0)                    |                          |
|                      | AA      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)                    |                          |
| FXIII-A Val34Leu     | ValVal  | 50 (50,0)             | 59 (59,0)                  | 0,256 <sup>a</sup>       |
|                      | ValLeu  | 43 (43,0)             | 37 (37,0)                  |                          |
|                      | LeuLeu  | 7 (7,0)               | 4 (4,0)                    |                          |
| $\beta$ -FBG -455G>A | GG      | 49 (49,0)             | 42 (42,0)                  | 0,394 <sup>a</sup>       |
|                      | GA      | 44 (44,0)             | 51 (51,0)                  |                          |
|                      | AA      | 7 (7,0)               | 7 (7,0)                    |                          |
| PAI-1 4G/5G          | 5G5G    | 23 (23,0)             | 20 (20,0)                  | 0,731 <sup>a</sup>       |
|                      | 5G4G    | 48 (48,0)             | 53 (53,0)                  |                          |
|                      | 4G4G    | 29 (29,0)             | 27 (27,0)                  |                          |

**Tablica 15.** (nastavak)

| Polimorfizam | Genotip | Moždani udar<br>n (%) | Kontrolna skupina<br>n (%) | P                  |
|--------------|---------|-----------------------|----------------------------|--------------------|
| MTHFR C677T  | CC      | 38 (38,0)             | 43 (43,0)                  | 0,630 <sup>b</sup> |
|              | CT      | 51 (51,0)             | 49 (49,0)                  |                    |
|              | TT      | 11 (11,0)             | 8 (8,0)                    |                    |
| MTHFR A1298C | AA      | 44 (44,0)             | 52 (52,0)                  | 0,322 <sup>a</sup> |
|              | AC      | 48 (48,0)             | 39 (39,0)                  |                    |
|              | CC      | 8 (8,0)               | 9 (9,0)                    |                    |
| ACE I/D      | II      | 21 (21,0)             | 31 (31,0)                  | 0,147 <sup>a</sup> |
|              | ID      | 56 (56,0)             | 44 (44,0)                  |                    |
|              | DD      | 23 (23,0)             | 25 (25,0)                  |                    |
| apoE ε2-4    | ε2/2    | 0 (0,0)               | 1 (1,0)                    | 0,436 <sup>c</sup> |
|              | ε2/3    | 15 (15,0)             | 11 (11,0)                  |                    |
|              | ε2/4    | 3 (3,0)               | 0 (0,0)                    |                    |
|              | ε3/3    | 68 (68,0)             | 74 (74,0)                  |                    |
|              | ε3/4    | 13 (13,0)             | 13 (13,0)                  |                    |
|              | ε4/4    | 0 (0,0)               | 1 (1,0)                    |                    |
| HPA-1        | a/a     | 71 (71,0)             | 71 (71,0)                  | 0,876 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 23 (23,0)             | 27 (27,0)                  |                    |
|              | b/b     | 6 (6,0)               | 2 (2,0)                    |                    |
| HPA-2        | a/a     | 81 (81,0)             | 77 (77,0)                  | 0,602 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 19 (19,0)             | 23 (23,0)                  |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)               | 0 (0,0)                    |                    |
| HPA-3        | a/a     | 42 (42,0)             | 29 (29,0)                  | 0,076 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 41 (41,0)             | 51 (51,0)                  |                    |
|              | b/b     | 17 (17,0)             | 20 (20,0)                  |                    |
| HPA-5        | a/a     | 81 (81,0)             | 82 (82,0)                  | 1,000 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 19 (19,0)             | 16 (16,0)                  |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)               | 2 (2,0)                    |                    |

n predstavlja broj djece s pojedinim genotipom; <sup>a</sup>dominantni model (heterozigoti+homozigoti u odnosu na. homozigote za divlji tip; <sup>b</sup>recesivni model (homozigoti u odnosu na. homozigote za divlji tip+ heterozigote); <sup>c</sup>genotip ε3/3 u odnosu na sve ostale genotipove

Za tri polimorfizma (FV Leiden, FV HR2 i FII G20120A) nisu dokazani homozigoti ni u djece s MU ni u kontrolnoj skupini. Statistički značajna razlika raspodjele učestalosti genotipova između djece s MU i kontrolne skupine pronađena je samo za FV Leiden (**P=0,049**).

**Tablica 16.** Raspodjela učestalosti alela ispitanih polimorfizama u djece s moždanim udarom (N=100) i kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam       | Alel           | Moždani udar<br>n (%)              | Kontrolna skupina<br>n (%)         | P                  |
|--------------------|----------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| FV Leiden (G1691A) | G<br>A         | 189 (94,5)<br>11 (5,5)             | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              | 0,053              |
| FV HR2 (A4070G)    | A<br>G         | 179 (89,5)<br>21 (10,5)            | 179 (89,5)<br>21 (10,5)            | 1,000              |
| FII G20210A        | G<br>A         | 198 (99,0)<br>2 (1,0)              | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              | 1,000              |
| FXIII-A Val34Leu   | Val<br>Leu     | 143 (71,5)<br>57 (28,5)            | 155 (77,5)<br>45 (22,5)            | 0,207              |
| β-FBG -455G>A      | G<br>A         | 142 (71,0)<br>58 (29,0)            | 135 (67,5)<br>65 (32,5)            | 0,516              |
| PAI-1 4G/5G        | 5G<br>4G       | 94 (47,0)<br>106 (53,0)            | 93 (46,5)<br>107 (53,5)            | 1,000              |
| MTHFR C677T        | C<br>T         | 127 (63,5)<br>73 (36,5)            | 135 (66,5)<br>65 (33,5)            | 0,462              |
| MTHFR A1298C       | A<br>C         | 136 (68,0)<br>64 (32,0)            | 143 (71,5)<br>57 (28,5)            | 0,514              |
| ACE I/D            | I<br>D         | 98 (49,0)<br>102 (51,0)            | 106 (52,0)<br>94 (47,0)            | 0,484              |
| apoE ε2-4          | ε2<br>ε3<br>ε4 | 18 (9,0)<br>165 (82,5)<br>17 (8,5) | 13 (6,5)<br>172 (86,0)<br>15 (6,8) | 0,584 <sup>a</sup> |
| HPA-1              | a<br>b         | 165 (82,5)<br>35 (17,5)            | 169 (84,5)<br>31 (15,5)            | 0,686              |
| HPA-2              | a<br>b         | 181 (90,5)<br>19 (9,5)             | 177 (88,5)<br>23 (11,5)            | 0,625              |
| HPA-3              | a<br>b         | 125 (62,5)<br>75 (37,5)            | 109 (54,5)<br>91 (45,5)            | 0,128              |
| HPA-5              | a<br>b         | 181 (90,5)<br>19 (9,5)             | 180 (90,0)<br>20 (10,0)            | 1,000              |

n predstavlja broj djece s pojedinim alelom; <sup>a</sup>aleli ε2+ε4 u odnosu na alel ε3

Dobivene učestalosti genotipova za svaki ispitani polimorfizam u djece s MU i kontrolnoj skupini uspoređene su s očekivanim učestalostima za pojedine genotipove (Hardy-Weinbergova ravnoteža). Rezultati usporedbe hi-kvadrat testom u skupini djece s MU i kontrolnoj skupini prikazani su u Tablici 17.

**Tablica 17.** Rezultati usporedbe dobivenih i očekivanih učestalosti (Hardy-Weinbergove ravnoteže) za ispitane polimorfizme u djece s moždanim udarom i kontrolnoj skupini.

| Polimorfizam         | Moždani udar (N=100) |              | Kontrolna skupina (N=100) |       |
|----------------------|----------------------|--------------|---------------------------|-------|
|                      | $\chi^2$             | P            | $\chi^2$                  | P     |
| FV Leiden (G1691A)   | 0,339                | 0,561        | 0,023                     | 0,879 |
| FV HR2 (A4070G)      | 1,376                | 0,241        | 1,376                     | 0,241 |
| FII G20210A          | 0,010                | 0,920        | 0,023                     | 0,879 |
| FXIII-A Val34Leu     | 0,303                | 0,582        | 0,371                     | 0,542 |
| $\beta$ -FBG -455G>A | 0,469                | 0,493        | 2,637                     | 0,104 |
| PAI-1 4G/5G          | 0,133                | 0,715        | 0,425                     | 0,514 |
| MTHFR C677T          | 1,004                | 0,316        | 1,364                     | 0,243 |
| MTHFRA1298C          | 1,060                | 0,303        | 0,185                     | 0,667 |
| ACE I/D              | 1,451                | 0,228        | 1,365                     | 0,243 |
| apoE $\epsilon$ 2-4  | 9,542                | <b>0,002</b> | 1,856                     | 0,173 |
| HPA-1                | 4,140                | <b>0,042</b> | 0,094                     | 0,759 |
| HPA-2                | 1,019                | 0,293        | 1,689                     | 0,194 |
| HPA-3                | 1,571                | 0,210        | 0,080                     | 0,777 |
| HPA-5                | 1,102                | 0,294        | 1,235                     | 0,267 |

$\chi^2$  -hi-kvadrat

Raspodjela učestalost genotipova svih ispitanih polimorfizama nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini, kao ni u djece s MU osim za HPA-1 (**P=0,042**) i apoE  $\epsilon$ 2-4 (**P=0,002**).

#### 5. 8. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA S MOŽDANIM UDAROM U DJECE

Povezanost pojedinačnih polimorfizama s nastankom MU u djece ispitana je univarijantnom logističkom regresijskom analizom prema dominantnom modelu. Za analizu apoE, dobiveni genotipovi svrstani su u 3 skupine: skupinu apoE2 (genotipovi  $\epsilon$ 2/2 i  $\epsilon$ 2/3),

skupinu apoE3 (genotip  $\epsilon 3/3$ ) i skupinu apoE4 (genotipovi  $\epsilon 2/4$ ,  $\epsilon 3/4$  i  $\epsilon 4/4$ ). Rezultati usporedbe raspodjele genotipova ispitivanih polimorfizama između djece s MU i kontrolne skupine univarijantnom logističkom regresijskom analizom prikazani su u Tablici 18.

**Tablica 18.** Rezultati univarijantne logističke regresijske analize između djece s moždanim udarom i kontrolne skupine prema dominantnom modelu i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam             | Univarijantna logistička regresija |                          |           |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------|
|                          | P                                  | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A)       | <b>0,022</b>                       | <b>4,00 (1,08-14,79)</b> | <b>54</b> |
| FV HR2 (A4070G)          | 1,000                              | 1,00 (0,51-1,97)         | 50        |
| FII G20210A              | 0,653                              | 0,66 (0,11-4,04)         | 50        |
| FXIII-A Val34Leu         | 0,202                              | 1,44 (0,88-2,52)         | 54        |
| $\beta$ -FBG -455G>A     | 0,394                              | 0,78 (0,54-1,37)         | 53        |
| PAI-1 4G/5G              | 0,606                              | 0,84 (0,43-1,65)         | 51        |
| MTHFR C677T              | 0,565                              | 1,18 (0,67-2,07)         | 52        |
| MTHFR A1298C             | 0,258                              | 1,38 (0,79-2,41)         | 52        |
| ACE I/D                  | 0,109                              | 1,69 (0,89-3,21)         | 55        |
| apoE $\epsilon 2-4^{**}$ | 0,558                              | 1,26 (0,58-2,71)         | 51        |
| HPA-1                    | 1,000                              | 1,00 (0,54-1,84)         | 50        |
| HPA-2                    | 0,382                              | 0,73 (0,37-1,47)         | 52        |
| HPA-3                    | 0,054                              | 0,56 (0,31-1,01)         | 56        |
| HPA-5                    | 0,855                              | 1,07 (0,52-2,18)         | 50        |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE  $\epsilon 4$  (nosioci najmanje jednog alela apoE  $\epsilon 4$ )

Dobiveni rezultati ukazuju kako je od ispitivanih polimorfizama samo FV Leiden utvrđen kao rizični čimbenik za nastanak MU u djece te da heterozigoti za FV Leiden imaju 4 puta veći rizik za nastanak MU u djece u odnosu na divlji tip.

## 5.9. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM PREMA SPOLU

Unutar skupine djece s MU i kontrolne skupine napravljena je analiza raspodjele učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama prema spolu, zasebno za dječake i djevojčice. Raspodjela učestalosti genotipova prikazana je u Tablici 19., a raspodjela učestalosti alela u Tablici 20.

**Tablica 19.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama prema spolu u djece s moždanim udarom i u kontrolnoj skupini.

| Polimorfizam          | Genotip | Moždani udar<br>n (%) |                    |                          | Kontrolna skupina<br>n (%) |                    |                    |
|-----------------------|---------|-----------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
|                       |         | Dječaci<br>N=63       | Djevojčice<br>N=37 | P                        | Dječaci<br>N=63            | Djevojčice<br>N=37 | P                  |
| FV Leiden<br>(G1691A) | GG      | 57 (90,5)             | 32 (86,5)          | 0,776 <sup>a</sup>       | 62 (98,4)                  | 35 (94,6)          | 0,553 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 6 (9,5)               | 5 (13,5)           |                          | 1 (1,6)                    | 2 (5,4)            |                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                          | 0 (0,0)                    | 0 (0,0)            |                    |
| FV HR2<br>(A4070G)    | AA      | 50 (79,4)             | 29 (78,4)          | 0,891 <sup>a</sup>       | 53 (84,1)                  | 26 (70,3)          | 0,165 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 13 (20,6)             | 8 (21,6)           |                          | 10 (15,9)                  | 11 (29,7)          |                    |
|                       | GG      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                          | 0 (0,0)                    | 0 (0,0)            |                    |
| FII G20210A           | GG      | 63 (100,0)            | 36 (97,3)          | 0,370 <sup>a</sup>       | 61 (96,8)                  | 36 (97,3)          | 1,000 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 0 (0,0)               | 1 (2,7)            |                          | 2 (3,2)                    | 1 (2,7)            |                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                          | 0 (0,0)                    | 0 (0,0)            |                    |
| FXIII-A<br>Val34Leu   | ValVal  | 24 (38,1)             | 26 (70,3)          | <b>0,004<sup>a</sup></b> | 36 (57,1)                  | 23 (62,2)          | 0,778 <sup>a</sup> |
|                       | ValLeu  | 34 (54,0)             | 9 (24,3)           |                          | 24 (38,1)                  | 13 (35,1)          |                    |
|                       | LeuLeu  | 5 (7,9)               | 2 (5,4)            |                          | 3 (4,8)                    | 1 (2,7)            |                    |
| β-FBG<br>-455G>A      | GG      | 29 (46,0)             | 19 (51,4)          | 0,759 <sup>a</sup>       | 27 (42,9)                  | 15 (40,5)          | 0,987 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 28 (44,5)             | 17 (45,9)          |                          | 31 (49,2)                  | 20 (54,1)          |                    |
|                       | AA      | 6 (9,5)               | 1 (2,7)            |                          | 5 (7,9)                    | 2 (5,4)            |                    |
| PAI-1 4G/5G           | 5G5G    | 15 (23,8)             | 9 (24,3)           | 0,854 <sup>a</sup>       | 16 (25,4)                  | 5 (13,5)           | 0,248 <sup>a</sup> |
|                       | 5G4G    | 30 (47,6)             | 18 (48,6)          |                          | 31 (49,2)                  | 21 (56,8)          |                    |
|                       | 4G4G    | 18 (28,6)             | 10 (27,0)          |                          | 16 (25,4)                  | 11 (29,7)          |                    |
| MTHFR<br>C677T        | CC      | 25 (39,7)             | 13 (35,1)          | 1,000 <sup>b</sup>       | 26 (41,3)                  | 17 (45,9)          | 0,463 <sup>b</sup> |
|                       | CT      | 31 (49,2)             | 20 (54,1)          |                          | 33 (52,4)                  | 16 (43,2)          |                    |
|                       | TT      | 7 (11,1)              | 4 (10,8)           |                          | 4 (6,3)                    | 4 (10,8)           |                    |
| MTHFR<br>A1298C       | AA      | 25 (39,7)             | 19 (51,4)          | 0,725 <sup>a</sup>       | 32 (50,8)                  | 20 (54,1)          | 0,914 <sup>a</sup> |
|                       | AC      | 32 (50,8)             | 16 (43,2)          |                          | 24 (38,1)                  | 15 (40,5)          |                    |
|                       | CC      | 6 (9,5)               | 2 (5,4)            |                          | 7 (11,1)                   | 2 (5,4)            |                    |
| ACE I/D               | II      | 14 (22,2)             | 6 (16,2)           | 0,641 <sup>a</sup>       | 18 (28,6)                  | 13 (35,1)          | 0,645 <sup>a</sup> |
|                       | ID      | 39 (61,9)             | 17 (45,8)          |                          | 29 (46,0)                  | 15 (40,5)          |                    |
|                       | DD      | 10 (15,9)             | 14 (37,8)          |                          | 16 (25,4)                  | 9 (24,3)           |                    |

**Tablica 19.** (nastavak)

| Polimorfizam | Genotip | Moždani udar<br>n (%) |                    |                    | Kontrolna skupina<br>n (%) |                    |                    |
|--------------|---------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
|              |         | Dječaci<br>N=63       | Djevojčice<br>N=37 | P                  | Dječaci<br>N=63            | Djevojčice<br>N=37 | P                  |
| apoE ε2-4    | ε2/2    | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            | 0,238 <sup>c</sup> | 1 (1,6)                    | 0 (0,0)            | 0,597 <sup>c</sup> |
|              | ε2/3    | 10 (15,9)             | 5 (13,5)           |                    | 7 (11,1)                   | 4 (10,8)           |                    |
|              | ε2/4    | 3 (4,8)               | 0 (0,0)            |                    | 0 (0,0)                    | 0 (0,0)            |                    |
|              | ε3/3    | 46 (73,0)             | 22 (59,5)          |                    | 45 (71,4)                  | 29 (78,4)          |                    |
|              | ε3/4    | 4 (6,3)               | 10 (27,0)          |                    | 9 (14,3)                   | 4 (10,8)           |                    |
|              | ε4/4    | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                    | 1 (1,6)                    | 0 (0,0)            |                    |
| HPA-1        | a/a     | 42 (66,7)             | 29 (78,4)          | 0,309 <sup>a</sup> | 47 (74,6)                  | 24 (64,9)          | 0,419 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 18 (28,6)             | 5 (13,5)           |                    | 14 (22,2)                  | 13 (35,1)          |                    |
|              | b/b     | 3 (4,8)               | 3 (8,1)            |                    | 2 (3,2)                    | 0 (0,0)            |                    |
| HPA-2        | a/a     | 55 (87,3)             | 26 (70,3)          | 0,067 <sup>a</sup> | 49 (77,8)                  | 28 (75,7)          | 0,996 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 8 (12,7)              | 11 (29,7)          |                    | 14 (22,2)                  | 9 (24,3)           |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                    | 0 (0,0)                    | 0 (0,0)            |                    |
| HPA-3        | a/a     | 25 (39,7)             | 16 (43,2)          | 0,889 <sup>a</sup> | 10 (18,2)                  | 11 (29,7)          | 0,054 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 28 (44,4)             | 14 (37,8)          |                    | 34 (61,8)                  | 7 (45,9)           |                    |
|              | b/b     | 10 (15,9)             | 7 (18,9)           |                    | 11 (20,0)                  | 9 (24,3)           |                    |
| HPA-5        | a/a     | 49 (77,8)             | 32 (86,5)          | 0,419 <sup>a</sup> | 51 (81,0)                  | 31 (83,8)          | 0,931 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 14 (22,2)             | 5 (13,5)           |                    | 10 (15,8)                  | 6 (16,2)           |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)               | 0 (0,0)            |                    | 2 (3,2)                    | 0 (0,0)            |                    |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica s pojedinim genotipom, <sup>a</sup>dominantni model (heterozigoti+homozigoti u odnosu na. homozigote za divlji tip; <sup>b</sup>recesivni model (homozigoti u odnosu na. homozigote za divlji tip+ heterozigote); <sup>c</sup>genotip ε3/3 u odnosu na sve ostale genotipove

Ispitivanjem raspodjele učestalosti genotipova između dječaka i djevojčica u djece s MU statistički značajna razlika (**P=0,004**) pronađena je samo za FXIII-A Val34Leu, dok se raspodjela učestalosti genotipova nije razlikovala između dječaka i djevojčica u kontrolnoj skupini.

**Tablica 20.** Raspodjela učestalosti alela ispitanih polimorfizama prema spolu u djece s moždanim udarom i u kontrolnoj skupini.

| Polimorfizam          | Alel           | Moždani udar<br>n (%)              |                                   |                    | Kontrolna skupina<br>n (%)        |                                 |                    |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
|                       |                | Dječaci<br>N=63                    | Djevojčice<br>N=37                | P                  | Dječaci<br>N=63                   | Djevojčice<br>N=37              | P                  |
| FV Leiden<br>(G1691A) | G<br>A         | 120 (95,2)<br>6 (4,8)              | 70 (94,6)<br>4 (5,4)              | 1,000              | 125 (99,2)<br>1 (0,8)             | 72 (97,3)<br>2 (2,7)            | 0,556              |
| FV HR2<br>(A4070G)    | A<br>G         | 113 (89,7)<br>13 (10,3)            | 66 (89,2)<br>8 (10,8)             | 0,897              | 116 (92,1)<br>10 (7,9)            | 63 (70,3)<br>11 (29,7)          | 0,192              |
| FII G20210A           | G<br>A         | 126 (100,0)<br>0 (0,0)             | 73 (98,7)<br>1 (2,7)              | 0,370              | 124 (98,4)<br>2 (1,6)             | 73 (98,7)<br>1 (2,7)            | 1,000              |
| FXIII-A<br>Val34Leu   | Val<br>Leu     | 82 (65,1)<br>44 (34,9)             | 61 (82,4)<br>13 (17,5)            | <b>0,014</b>       | 96 (76,2)<br>30 (23,8)            | 59 (79,7)<br>15 (20,3)          | 0,687              |
| β-FBG<br>-455G>A      | G<br>A         | 86 (68,3)<br>40 (31,7)             | 55 (74,3)<br>19 (25,7)            | 0,454              | 85 (67,5)<br>41 (32,5)            | 50 (67,6)<br>24 (32,4)          | 0,888              |
| PAI-1 4G/5G           | 5G<br>4G       | 60 (47,6)<br>66 (52,4)             | 36 (48,6)<br>38 (51,4)            | 0,995              | 63 (50,0)<br>63 (50,0)            | 31 (41,9)<br>43 (58,1)          | 0,336              |
| MTHFR C677T           | C<br>T         | 81 (64,3)<br>45 (35,7)             | 46 (62,2)<br>28 (37,8)            | 0,882              | 85 (67,5)<br>41 (32,5)            | 50 (67,6)<br>24 (32,4)          | 0,888              |
| MTHFR<br>A1298C       | A<br>C         | 82 (65,1)<br>44 (34,9)             | 54 (73,0)<br>20 (27,0)            | 0,187              | 88 (69,8)<br>38 (30,2)            | 55 (74,3)<br>19 (25,7)          | 0,606              |
| ACE I/D               | I<br>D         | 67 (53,2)<br>59 (46,8)             | 29 (39,2)<br>45 (60,8)            | 0,367              | 65 (51,6)<br>61 (48,4)            | 41 (55,4)<br>33 (44,6)          | 0,707              |
| apoE ε2-4             | ε2<br>ε3<br>ε4 | 13 (10,3)<br>106 (84,1)<br>7 (5,6) | 5 (6,8)<br>59 (79,7)<br>10 (13,5) | 0,550 <sup>a</sup> | 9 (7,1)<br>106 (84,1)<br>11 (8,8) | 4 (5,4)<br>66 (89,2)<br>4 (5,4) | 0,432 <sup>a</sup> |
| HPA-1                 | a<br>b         | 102 (81,0)<br>24 (19,0)            | 63 (85,1)<br>11 (14,9)            | 0,576              | 108 (85,7)<br>18 (14,3)           | 61 (82,4)<br>13 (17,6)          | 0,687              |
| HPA-2                 | a<br>b         | 118 (93,7)<br>8 (6,3)              | 63 (85,1)<br>11 (14,9)            | 0,083              | 112 (88,9)<br>14 (11,1)           | 65 (87,8)<br>9 (12,2)           | 0,996              |
| HPA-3                 | a<br>b         | 78 (61,9)<br>48 (38,1)             | 46 (62,2)<br>28 (37,8)            | 0,909              | 54 (49,1)<br>56 (50,9)            | 39 (52,7)<br>35 (47,3)          | 0,741              |
| HPA-5                 | a<br>b         | 112 (88,9)<br>14 (11,1)            | 69 (93,2)<br>5 (6,8)              | 0,447              | 112 (88,9)<br>14 (11,1)           | 68 (91,9)<br>6 (8,1)            | 0,660              |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica s pojedinim alelom, <sup>a</sup>aleli ε2+ε4 u odnosu na alel ε3

Za ispitivane polimorfizme napravljene su i zasebne analize raspodjele učestalosti genotipova i alela prema spolu i to između dječaka s MU i dječaka kontrolne skupine te



između djevojčica s MU i djevojčica kontrolne skupine. U Tablici 21. prikazana je raspodjela učestalosti genotipova, a u Tablici 22. raspodjela učestalosti alela.

**Tablica 21.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama u dječaka s moždanim udarom (N=63) i kontrolnoj skupini (N=63) te u djevojčica s moždanim udarom (N=37) i kontrolnoj skupini (N=37).

| Polimorfizam          | Genotip | Dječaci<br>n (%) |                      |                    | Djevojčice<br>n (%) |                      |                    |
|-----------------------|---------|------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|                       |         | Moždani<br>udar  | Kontrolna<br>skupina | P                  | Moždani<br>udar     | Kontrolna<br>skupina | P                  |
| FV Leiden<br>(G1691A) | GG      | 57 (90,5)        | 62 (98,4)            | 0,115 <sup>a</sup> | 33 (89,2)           | 35 (94,6)            | 0,674 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 6 (9,5)          | 1 (1,6)              |                    | 4 (10,8)            | 2 (5,4)              |                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)          | 0 (0,0)              |                    | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |
| FV HR2<br>(A4070G)    | AA      | 50 (79,4)        | 53 (84,1)            | 0,645 <sup>a</sup> | 29 (78,4)           | 26 (70,3)            | 0,595 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 13 (20,6)        | 10 (15,9)            |                    | 8 (21,6)            | 11 (29,7)            |                    |
|                       | GG      | 0 (0,0)          | 0 (0,0)              |                    | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |
| FII G20210A           | GG      | 63 (100,0)       | 61 (96,8)            | 1,000 <sup>a</sup> | 36 (97,3)           | 36 (97,3)            | 1,000 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 0 (0,0)          | 2 (3,2)              |                    | 1 (2,7)             | 1 (2,7)              |                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)          | 0 (0,0)              |                    | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |
| FXIII-A<br>Val34Leu   | ValVal  | 24 (38,1)        | 36 (57,1)            | 0,005 <sup>a</sup> | 26 (70,3)           | 23 (62,2)            | 0,623 <sup>a</sup> |
|                       | ValLeu  | 34 (54,0)        | 24 (38,1)            |                    | 9 (24,3)            | 13 (35,1)            |                    |
|                       | LeuLeu  | 5 (7,9)          | 3 (4,8)              |                    | 2 (5,4)             | 1 (2,7)              |                    |
| β-FBG<br>-455G>A      | GG      | 29 (46,0)        | 27 (42,9)            | 0,858 <sup>a</sup> | 19 (51,4)           | 15 (40,5)            | 0,484 <sup>a</sup> |
|                       | GA      | 28 (44,5)        | 31 (49,2)            |                    | 17 (45,9)           | 20 (54,1)            |                    |
|                       | AA      | 6 (9,5)          | 5 (7,9)              |                    | 1 (2,7)             | 2 (5,4)              |                    |
| PAI-1 4G/5G           | 5G5G    | 15 (23,8)        | 16 (25,4)            | 1,000 <sup>a</sup> | 9 (24,3)            | 5 (13,5)             | 0,373 <sup>a</sup> |
|                       | 5G4G    | 30 (47,6)        | 31 (49,2)            |                    | 18 (48,6)           | 21 (56,8)            |                    |
|                       | 4G4G    | 18 (28,6)        | 16 (25,4)            |                    | 10 (27,0)           | 11 (29,7)            |                    |
| MTHFR<br>C677T        | CC      | 25 (39,7)        | 26 (41,3)            | 0,530 <sup>b</sup> | 13 (35,1)           | 17 (45,9)            | 1,000 <sup>a</sup> |
|                       | CT      | 31 (49,2)        | 33 (52,4)            |                    | 20 (54,1)           | 16 (43,2)            |                    |
|                       | TT      | 7 (11,1)         | 4 (6,3)              |                    | 4 (10,8)            | 4 (10,8)             |                    |
| MTHFR<br>A1298C       | AA      | 25 (39,7)        | 32 (50,8)            | 0,283 <sup>a</sup> | 19 (51,4)           | 20 (54,1)            | 0,548 <sup>a</sup> |
|                       | AC      | 32 (50,8)        | 24 (38,1)            |                    | 16 (43,2)           | 15 (40,5)            |                    |
|                       | CC      | 6 (9,5)          | 7 (11,1)             |                    | 2 (5,4)             | 2 (5,4)              |                    |
| ACE I/D               | II      | 14 (22,2)        | 18 (28,6)            | 0,539 <sup>a</sup> | 6 (16,2)            | 13 (35,1)            | 0,111 <sup>a</sup> |
|                       | ID      | 39 (61,9)        | 29 (46,0)            |                    | 17 (45,8)           | 15 (40,5)            |                    |
|                       | DD      | 10 (15,9)        | 16 (25,4)            |                    | 14 (37,8)           | 9 (24,3)             |                    |
| apoE ε2-4             | ε2/2    | 0 (0,0)          | 1 (1,6)              | 1,000 <sup>a</sup> | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              | 0,132 <sup>a</sup> |
|                       | ε2/3    | 10 (15,9)        | 7 (11,1)             |                    | 5 (13,5)            | 4 (10,8)             |                    |
|                       | ε2/4    | 3 (4,8)          | 0 (0,0)              |                    | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |
|                       | ε3/3    | 46 (73,0)        | 45 (71,4)            |                    | 22 (59,5)           | 29 (78,4)            |                    |
|                       | ε3/4    | 4 (6,3)          | 9 (14,3)             |                    | 10 (27,0)           | 4 (10,8)             |                    |
|                       | ε4/4    | 0 (0,0)          | 1 (1,6)              |                    | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |

**Tablica 21.** (nastavak)

| Polimorfizam | Genotip | Dječaci<br>n (%) |                      |                          | Djevojčice<br>n (%) |                      |                    |
|--------------|---------|------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|              |         | Moždani<br>udar  | Kontrolna<br>skupina | P                        | Moždani<br>udar     | Kontrolna<br>skupina | P                  |
| HPA-1        | a/a     | 42 (66,7)        | 47 (74,6)            | 0,434 <sup>a</sup>       | 29 (78,4)           | 24 (64,9)            | 0,302 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 18 (28,6)        | 14 (22,2)            |                          | 5 (13,5)            | 13 (35,1)            |                    |
|              | b/b     | 3 (4,8)          | 2 (3,2)              |                          | 3 (8,1)             | 0 (0,0)              |                    |
| HPA-2        | a/a     | 55 (87,3)        | 49 (77,8)            | 0,241 <sup>a</sup>       | 26 (70,3)           | 28 (75,7)            | 0,793 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 8 (12,7)         | 14 (22,2)            |                          | 11 (29,7)           | 9 (24,3)             |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)          | 0 (0,0)              |                          | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |
| HPA-3        | a/a     | 25 (39,7)        | 10 (18,2)            | <b>0,019<sup>a</sup></b> | 16 (43,2)           | 11 (29,7)            | 0,334 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 28 (44,4)        | 34 (61,8)            |                          | 14 (37,8)           | 7 (45,9)             |                    |
|              | b/b     | 10 (15,9)        | 11 (20,0)            |                          | 7 (18,9)            | 9 (24,3)             |                    |
| HPA-5        | a/a     | 49 (77,8)        | 51 (81,0)            | 0,826 <sup>a</sup>       | 32 (86,5)           | 31 (83,8)            | 1,000 <sup>a</sup> |
|              | a/b     | 14 (22,2)        | 10 (15,8)            |                          | 5 (13,5)            | 6 (16,2)             |                    |
|              | b/b     | 0 (0,0)          | 2 (3,2)              |                          | 0 (0,0)             | 0 (0,0)              |                    |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica s pojedinim genotipom u pojedinoj skupini, <sup>a</sup>dominantni model (heterozigoti+homozigoti u odnosu na homozigote za divlji tip; <sup>b</sup>recesivni model (homozigoti u odnosu na homozigote za divlji tip+ heterozigote); <sup>c</sup>genotip ε3/3 u odnosu na sve ostale genotipove

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama između djevojčica s MU i djevojčica kontrolne skupine. Za razliku od toga statistički značajna razlika pronađena je između raspodjele učestalosti genotipova u dječaka s MU i dječaka kontrolne skupine za 2 polimorfizma: FXIII-A Val34Leu (**P=0,005**) i HPA-3 (**P=0,019**).

**Tablica 22.** Raspodjela učestalost alela ispitanih polimorfizama prema u dječaka s moždanim udarom (N=63) i kontrolnoj skupini (N=63) te u djevojčica s moždanim udarom (N=37) i kontrolnoj skupini (N=37).

| Polimorfizam       | Alel           | Dječaci<br>n (%)                   |                                   |                    | Djevojčice<br>n (%)               |                                 |                    |
|--------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
|                    |                | Moždani<br>udar                    | Kontrolna<br>skupina              | P                  | Moždani<br>udar                   | Kontrolna<br>skupina            | P                  |
| FV Leiden (G1691A) | G<br>A         | 120 (95,2)<br>6 (4,8)              | 125 (99,2)<br>1 (0,8)             | 0,120              | 70 (94,6)<br>4 (5,4)              | 72 (97,3)<br>2 (2,7)            | 0,681              |
| FV HR2 (A4070G)    | A<br>G         | 113 (89,7)<br>13 (10,3)            | 116 (92,1)<br>10 (7,9)            | 0,662              | 66 (89,2)<br>8 (10,8)             | 63 (70,3)<br>11 (29,7)          | 0,623              |
| FII G20210A        | G<br>A         | 126 (100,0)<br>0 (0,0)             | 124 (98,4)<br>2 (1,6)             | 0,498              | 73 (98,7)<br>1 (2,7)              | 73 (98,7)<br>1 (2,7)            | 1,000              |
| FXIII-A Val34Leu   | Val<br>Leu     | 82 (65,1)<br>44 (34,9)             | 96 (76,2)<br>30 (23,8)            | 0,072              | 61 (82,4)<br>13 (17,6)            | 59 (79,7)<br>15 (20,3)          | 0,834              |
| β-FBG -455G>A      | G<br>A         | 86 (68,3)<br>40 (31,7)             | 85 (67,5)<br>41 (32,5)            | 1,000              | 55 (74,3)<br>19 (25,7)            | 50 (67,6)<br>24 (32,4)          | 0,469              |
| PAI-1 4G/5G        | 5G<br>4G       | 60 (47,6)<br>66 (52,4)             | 63 (50,0)<br>63 (50,0)            | 0,801              | 36 (48,6)<br>38 (51,4)            | 31 (41,9)<br>43 (58,1)          | 0,329              |
| MTHFR C677T        | C<br>T         | 81 (64,3)<br>45 (35,7)             | 85 (67,5)<br>41 (32,5)            | 0,690              | 46 (62,2)<br>28 (37,8)            | 50 (67,6)<br>24 (32,4)          | 0,606              |
| MTHFR A1298C       | A<br>C         | 82 (65,1)<br>44 (34,9)             | 88 (69,8)<br>38 (30,2)            | 0,501              | 54 (73,0)<br>20 (27,0)            | 55 (74,3)<br>19 (25,7)          | 1,000              |
| ACE I/D            | I<br>D         | 67 (53,2)<br>59 (46,8)             | 65 (51,6)<br>61 (48,4)            | 0,900              | 29 (39,2)<br>45 (60,8)            | 41 (55,4)<br>33 (44,6)          | 0,007              |
| apoE ε2-4          | ε2<br>ε3<br>ε4 | 13 (10,3)<br>106 (84,1)<br>7 (5,6) | 9 (7,1)<br>106 (84,1)<br>11 (8,8) | 0,863 <sup>a</sup> | 5 (6,8)<br>59 (79,7)<br>10 (13,5) | 4 (5,4)<br>66 (89,2)<br>4 (5,4) | 0,173 <sup>a</sup> |
| HPA-1              | a<br>b         | 102 (81,0)<br>24 (19,0)            | 108 (85,7)<br>18 (14,3)           | 0,398              | 63 (85,1)<br>11 (14,9)            | 61 (82,4)<br>13 (17,6)          | 0,823              |
| HPA-2              | a<br>b         | 118 (93,7)<br>8 (6,3)              | 112 (88,9)<br>14 (11,1)           | 0,264              | 63 (85,1)<br>11 (14,9)            | 65 (87,8)<br>9 (12,2)           | 0,810              |
| HPA-3              | a<br>b         | 78 (61,9)<br>48 (38,1)             | 46 (62,2)<br>28 (37,8)            | 0,065              | 46 (62,2)<br>28 (37,8)            | 39 (52,7)<br>35 (47,3)          | 0,318              |
| HPA-5              | a<br>b         | 112 (88,9)<br>14 (11,1)            | 69 (93,2)<br>5 (6,8)              | 0,841              | 69 (93,2)<br>5 (6,8)              | 68 (91,9)<br>6 (8,1)            | 1,000              |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica s pojedinim alelom u pojedinoj skupini, <sup>a</sup>aleli ε2+ε4 u odnosu na alel ε3

### 5. 9. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA S MOŽDANIM UDAROM U DJECE PREMA SPOLU

Rezultati usporedbe raspodjela genotipova ispitivanih polimorfizama između dječaka i djevojčica s MU te dječaka i djevojčica kontrolne skupine univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijskom analizom prema dominantnom modelu prikazani su u Tablici 23.

**Tablica 23.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize za dječake i djevojčice s moždanim udarom te dječake i djevojčice kontrolne skupine za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija   |                         |    |                   |                   |    |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|----|-------------------|-------------------|----|
|                    | Moždani udar                         |                         |    | Kontrolna skupina |                   |    |
|                    | P                                    | OR (95% CI)             | %* | P                 | OR (95% CI)       | %* |
| FV Leiden (G1691A) | 0,540                                | 0,67 (0,19-2,38)        | 63 | 0,309             | 0,28 (0,02-3,23)  | 64 |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,907                                | 0,94 (0,35-2,54)        | 63 | 0,105             | 0,45 (0,17-1,18)  | 64 |
| FII G20210A        | 0,986                                | /                       | 65 | 0,894             | 1,18 (0,10-13,48) | 63 |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,002</b>                         | <b>3,84 (1,61-9,16)</b> | 65 | 0,622             | 1,23 (0,54-2,83)  | 63 |
| β-FBG -455G>A      | 0,601                                | 1,24 (0,55-2,79)        | 63 | 0,821             | 0,91 (0,40-2,07)  | 63 |
| PAI-1 4G/5G        | 0,801                                | 0,88(0,33-2,34)         | 63 | 0,087             | 0,36 (0,11-1,16)  | 63 |
| MTHFR C677T        | 0,544                                | 0,77 (0,33-1,79)        | 63 | 0,648             | 1,21 (0,53-2,74)  | 63 |
| MTHFR A1298C       | 0,258                                | 1,60 (0,71-3,64)        | 63 | 0,753             | 1,14 (0,50-2,57)  | 63 |
| ACE I/D            | 0,696                                | 0,82 (0,30-2,25)        | 63 | 0,494             | 1,35 (0,57-3,23)  | 63 |
| apoE ε2-4**        | <b>0,047</b>                         | <b>0,34 (0,12-0,98)</b> | 66 | 0,484             | 1,56 (0,45-5,37)  | 63 |
| HPA-1              | 0,216                                | 1,81 (0,71-4,65)        | 63 | 0,302             | 0,63 (0,26-1,52)  | 63 |
| HPA-2              | <b>0,024</b>                         | <b>0,30 (0,10-0,85)</b> | 67 | 0,809             | 0,89 (0,34-2,32)  | 63 |
| HPA-3              | 0,441                                | 1,38 (0,61-3,14)        | 63 | 0,868             | 0,93 (0,37-2,30)  | 63 |
| HPA-5              | 0,288                                | 1,83 (0,60-5,57)        | 63 | 0,722             | 1,22 (0,41-3,57)  | 63 |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija |                         |    |                   |                   |    |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,008</b>                         | <b>3,37 (1,37-8,27)</b> | 69 | /                 | /                 | /  |
| HPA-2              | 0,083                                | 0,37 (0,12-1,14)        | 69 | /                 | /                 | /  |
| apoE ε2-4**        | 0,137                                | 0,42 (0,14-1,31)        | 69 | /                 | /                 | /  |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Univarijantnom logističkom regresijskom analizom nije dobivena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova između dječaka i djevojčica kontrolne skupine, dok je između

dječaka i djevojčica s MU dobivena statistički značajna razlika za 3 polimorfizma: FXIII-A (**P=0,002**), apoε2-4 (za skupinu apoε4, **P=0,047**) i za HPA-2 (**P=0,024**), koji su nakon toga analizirani multivarijantnom logističkom regresijskom analizom. Multivarijantnom analizom dokazan je tri puta veći rizik za nastanak MU u dječaka nosioca alela FXIII-A Leu34 u odnosu na djevojčice (**OR=3,37, 95% CI=1,37-8,27**).

Kako su u istraživanju djeca s MU sparena po spolu s djecom kontrolne skupine, univarijantnom logističkom regresijskom analizom ispitana je i povezanost pojedinačnih polimorfizama i spola s nastankom MU. Rezultati usporedbe raspodjele genotipova za ispitane polimorfizme između dječaka s MU i dječaka kontrolne skupine, te djevojčica s MU i djevojčica kontrolne skupine prema dominantnom modelu prikazani su u Tablici 24.

**Tablica 24.** Rezultati univarijantne logističke regresijske analize za dječake s moždanim udarom i dječake kontrolne skupine te djevojčice s moždanim udarom i djevojčice kontrolne skupine za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija                    |                         |    |                                                             |                   |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|----|-------------------------------------------------------------|-------------------|----|
|                    | Dječaci s moždanim udarom i dječaci kontrolne skupine |                         |    | Djevojčice s moždanim udarom i djevojčice kontrolne skupine |                   |    |
|                    | P                                                     | OR (95% CI)             | %* | P                                                           | OR (95% CI)       | %* |
| FV Leiden (G1691A) | 0,087                                                 | 6,53 (0,76-55,89)       | 54 | 0,310                                                       | 0,66 (0,29-1,48)  | 55 |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,490                                                 | 1,38 (0,55-3,42)        | 52 | 0,248                                                       | 2,73 (0,50-15,10) | 54 |
| FII G20210A        | 0,986                                                 | /                       | 52 | 0,680                                                       | 0,84 (0,37-1,90)  | 54 |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,033</b>                                          | <b>2,17 (1,06-4,42)</b> | 60 | 0,462                                                       | 0,70 (0,26-1,83)  | 54 |
| β-FBG -455G>A      | 0,720                                                 | 0,88 (0,44-1,78)        | 52 | 0,352                                                       | 0,65 (0,26-1,62)  | 55 |
| PAI-1 4G/5G        | 0,836                                                 | 1,09 (0,48-2,45)        | 52 | 0,215                                                       | 0,44 (0,12-1,61)  | 55 |
| MTHFR C677T        | 0,670                                                 | 1,13 (0,65-1,97)        | 50 | 0,345                                                       | 1,57 (0,62-4,00)  | 50 |
| MTHFR A1298C       | 0,211                                                 | 1,57 (0,77-3,18)        | 56 | 0,816                                                       | 1,11 (0,45-2,78)  | 51 |
| ACE I/D            | 0,414                                                 | 1,40 (0,62-3,14)        | 53 | 0,121                                                       | 2,32 (0,80-6,73)  | 58 |
| apoE ε2-4**        | 0,436                                                 | 0,66 (0,23-1,87)        | 52 | 0,084                                                       | 3,06 (0,86-10,84) | 58 |
| HPA-1              | 0,392                                                 | 1,47 (0,68-3,18)        | 54 | 0,201                                                       | 0,51 (0,18-1,43)  | 57 |
| HPA-2              | 0,100                                                 | 0,44 (0,16-1,17)        | 56 | 0,601                                                       | 1,32 (0,47-3,69)  | 53 |
| HPA-3              | 0,258                                                 | 0,65 (0,31-1,37)        | 55 | 0,094                                                       | 0,44 (0,16-1,52)  | 59 |
| HPA-5              | 0,660                                                 | 1,21 (0,51-2,88)        | 52 | 0,744                                                       | 0,81 (0,22-2,92)  | 51 |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Nije dokazana povezanost niti jednog ispitanog polimorfizma s nastankom MU u djevojčica, dok je u dječaka pronađena statistički značajna povezanost polimorfizma FXIII-A Val34Leu s MU (**P=0,033**). Dobiveni rezultati ukazuju na 2,17 puta veći rizik za nastanak MU u dječaka s najmanje jednim alelom FXIII-A Leu34 u odnosu na dječake s genotipom Val34Val.

## 5. 10. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA

Unutar skupine djece s MU i kontrolne skupine napravljena je i analiza raspodjele učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama prema tipu MU (AIMU i HMU) koje su uspoređene s raspodjelom genotipova i alela kontrolne skupine. Rezultati raspodjela učestalosti genotipova prikazani su u Tablici 25., a raspodjela učestalosti alela u Tablici 26.

**Tablica 25.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama u djece s arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam          | Genotip | Moždani udar<br>n (%) |                          |              |                    | Kontrolna skupina<br>n (%) |
|-----------------------|---------|-----------------------|--------------------------|--------------|--------------------|----------------------------|
|                       |         | Arterijski ishemijski | P*                       | Hemoragijski | P*                 |                            |
| FV Leiden<br>(G1691A) | GG      | 63 (86,3)             | <b>0,016<sup>a</sup></b> | 26 (96,3)    | 1,000 <sup>a</sup> | 97 (97,0)                  |
|                       | GA      | 10 (13,7)             |                          | 1 (3,7)      |                    | 3 (3,0)                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)               |                          | 0 (0,0)      |                    | 0 (0,0)                    |
| FV HR2<br>(A4070G)    | AA      | 56 (76,7)             | 0,863 <sup>a</sup>       | 23 (85,2)    | 0,592 <sup>a</sup> | 79 (79,0)                  |
|                       | GA      | 17 (23,3)             |                          | 4 (14,8)     |                    | 21 (21,0)                  |
|                       | GG      | 0 (0,0)               |                          | 0 (0,0)      |                    | 0 (0,0)                    |
| FII G20210A           | GG      | 72 (98,6)             | 0,639 <sup>a</sup>       | 26 (96,3)    | 1,000 <sup>a</sup> | 97 (97,0)                  |
|                       | GA      | 1 (1,4)               |                          | 1 (3,7)      |                    | 3 (3,0)                    |
|                       | AA      | 0 (0,0)               |                          | 0 (0,0)      |                    | 0 (0,0)                    |
| FXIII-A<br>Val34Leu   | ValVal  | 37 (50,7)             | 0,351 <sup>a</sup>       | 14 (51,9)    | 0,655 <sup>a</sup> | 59 (59,0)                  |
|                       | ValLeu  | 31 (42,5)             |                          | 11 (40,7)    |                    | 37 (37,0)                  |
|                       | LeuLeu  | 5 (6,8)               |                          | 2 (7,4)      |                    | 4 (4,0)                    |
| β-FBG<br>-455G>A      | GG      | 36 (49,3)             | 0,423 <sup>a</sup>       | 12 (44,4)    | 0,993 <sup>a</sup> | 42 (42,0)                  |
|                       | GA      | 33 (45,2)             |                          | 12 (44,4)    |                    | 51 (51,0)                  |
|                       | AA      | 4 (5,5)               |                          | 3 (11,1)     |                    | 7 (7,0)                    |

**Tablica 25.** (nastavak)

| Polimorfizam    | Genotip | Moždani udar<br>n (%)    |                          |              |                    | Kontrolna<br>skupina<br>n (%) |
|-----------------|---------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------------|-------------------------------|
|                 |         | Arterijski<br>ishemijski | P*                       | Hemoragijski | P*                 |                               |
| PAI-1 4G/5G     | 5G5G    | 17 (23,3)                | 0,739 <sup>a</sup>       | 6 (22,2)     | 0,988 <sup>a</sup> | 20 (20,0)                     |
|                 | 5G4G    | 37 (50,7)                |                          | 11 (40,7)    |                    | 53 (53,0)                     |
|                 | 4G4G    | 19 (26,0)                |                          | 10 (37,0)    |                    | 27 (27,0)                     |
| MTHFR<br>C677T  | CC      | 29 (39,7)                | 0,337 <sup>b</sup>       | 9 (33,3)     | 0,683 <sup>b</sup> | 41 (41,0)                     |
|                 | CT      | 34 (46,6)                |                          | 17 (63,0)    |                    | 51 (51,0)                     |
|                 | TT      | 10 (13,7)                |                          | 1 (3,7)      |                    | 8 (8,0)                       |
| MTHFR<br>A1298C | AA      | 34 (46,6)                | 0,582 <sup>a</sup>       | 10 (37,0)    | 0,245 <sup>a</sup> | 52 (52,0)                     |
|                 | AC      | 33 (45,2)                |                          | 15 (55,6)    |                    | 39 (39,0)                     |
|                 | CC      | 6 (8,2)                  |                          | 2 (7,4)      |                    | 9 (9,0)                       |
| ACE I/D         | II      | 13 (17,8)                | 0,073 <sup>a</sup>       | 8 (29,6)     | 0,922 <sup>a</sup> | 31 (31,0)                     |
|                 | ID      | 44 (60,3)                |                          | 12 (44,5)    |                    | 44 (44,0)                     |
|                 | DD      | 16 (21,9)                |                          | 7 (25,9)     |                    | 25 (25,0)                     |
| apoE ε2-4       | ε2/2    | 0 (0,0)                  | 0,533 <sup>c</sup>       | 0 (0,0)      | 0,607 <sup>c</sup> | 1 (1,0)                       |
|                 | ε2/3    | 10 (13,7)                |                          | 5 (18,5)     |                    | 11 (11,0)                     |
|                 | ε2/4    | 2 (2,7)                  |                          | 1 (3,7)      |                    | 0 (0,0)                       |
|                 | ε3/3    | 50 (68,5)                |                          | 18 (66,7)    |                    | 74 (74,0)                     |
|                 | ε3/4    | 11 (15,1)                |                          | 3 (11,1)     |                    | 13 (13,0)                     |
|                 | ε4/4    | 0 (0,0)                  |                          | 0 (0,0)      |                    | 1 (1,0)                       |
| HPA-1           | a/a     | 53 (72,6)                | 0,952 <sup>a</sup>       | 18 (66,7)    | 0,842 <sup>a</sup> | 71 (71,0)                     |
|                 | a/b     | 15 (20,5)                |                          | 8 (29,6)     |                    | 27 (27,0)                     |
|                 | b/b     | 5 (6,9)                  |                          | 1 (3,7)      |                    | 2 (2,0)                       |
| HPA-2           | a/a     | 59 (80,8)                | 0,676 <sup>a</sup>       | 22 (81,5)    | 0,795 <sup>a</sup> | 77 (77,0)                     |
|                 | a/b     | 14 (19,2)                |                          | 5 (18,5)     |                    | 23 (23,0)                     |
|                 | b/b     | 0 (0,0)                  |                          | 0 (0,0)      |                    | 0 (0,0)                       |
| HPA-3           | a/a     | 34 (46,6)                | <b>0,027<sup>a</sup></b> | 8 (29,6)     | 0,861 <sup>a</sup> | 29 (29,0)                     |
|                 | a/b     | 27 (37,0)                |                          | 14 (51,9)    |                    | 51 (51,0)                     |
|                 | b/b     | 12 (16,4)                |                          | 5 (18,5)     |                    | 20 (20,0)                     |
| HPA-5           | a/a     | 60 (82,2)                | 0,961 <sup>a</sup>       | 21 (77,8)    | 0,669 <sup>a</sup> | 82 (82,0)                     |
|                 | a/b     | 13 (17,8)                |                          | 6 (22,2)     |                    | 16 (16,0)                     |
|                 | b/b     | 0 (0,0)                  |                          | 0 (0,0)      |                    | 2 (2,0)                       |

n predstavlja broj djece s pojedinim genotipom u pojedinoj skupini \*usporedba s kontrolom skupinom, <sup>a</sup>dominantni model (heterozigoti+homozigoti u odnosu na homozigote za divlji tip; <sup>b</sup>recesivni model (homozigoti u odnosu na homozigote za divlji tip+ heterozigote); <sup>c</sup>genotip ε3ε3 u odnosu na sve ostale genotipove

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama između djece s HMU i kontrolne skupine. Za razliku od toga pronađena je

statistički značajna razlika između raspodjele učestalosti genotipova u djece s AIMU i kontrolne skupine za 2 polimorfizma FV Leiden (**P=0,016**) i HPA-3 (**P=0,027**).

**Tablica 26.** Raspodjela učestalosti alela ispitanih polimorfizama u djece arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam       | Alel           | Moždani udar<br>n (%)              |                          |                                  |                    | Kontrolna skupina<br>n (%)         |
|--------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------------------|
|                    |                | Arterijski ishemijski              | P*                       | Hemoragijski                     | P*                 |                                    |
| FV Leiden (G1691A) | G<br>A         | 136 (93,2)<br>10 (6,8)             | <b>0,018<sup>a</sup></b> | 53 (98,1)<br>1 (1,9)             | 1,000              | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              |
| FV HR2 (A4070G)    | A<br>G         | 129 (88,4)<br>17 (11,6)            | 0,871                    | 50 (92,6)<br>4 (7,4)             | 0,613              | 179 (89,5)<br>21 (10,5)            |
| FII G20210A        | G<br>A         | 145 (99,3)<br>1 (0,7)              | 0,641                    | 53 (98,1)<br>1 (1,9)             | 1,000              | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              |
| FXIII-A Val34Leu   | Val<br>Leu     | 105 (71,9)<br>41 (28,1)            | 0,289                    | 39 (72,2)<br>15 (27,8)           | 0,529              | 155 (77,5)<br>45 (22,5)            |
| β-FBG -455G>A      | G<br>A         | 105 (71,9)<br>41 (28,1)            | 0,446                    | 36 (66,7)<br>18 (33,3)           | 0,962              | 135 (67,5)<br>65 (32,5)            |
| PAI-1 4G/5G        | 5G<br>4G       | 71 (48,6)<br>75 (51,4)             | 0,773                    | 23 (42,6)<br>31 (57,4)           | 0,721              | 93 (46,5)<br>107 (53,5)            |
| MTHFR C677T        | C<br>T         | 92 (63,0)<br>54 (37,0)             | 0,577                    | 35 (64,8)<br>19 (35,2)           | 0,944              | 133 (66,5)<br>67 (33,5)            |
| MTHFR A1298C       | A<br>C         | 101 (69,2)<br>45 (30,8)            | 0,727                    | 35 (64,8)<br>19 (35,2)           | 0,433              | 143 (71,5)<br>57 (28,5)            |
| ACE I/D            | I<br>D         | 70 (48,0)<br>76 (52,0)             | 0,449                    | 28 (51,9)<br>26 (48,1)           | 0,997              | 106 (52,0)<br>94 (47,0)            |
| apoE ε2-4          | ε2<br>ε3<br>ε4 | 12 (8,2)<br>121 (82,9)<br>13 (8,9) | 0,519 <sup>a</sup>       | 6 (11,1)<br>44 (81,5)<br>4 (7,4) | 0,541 <sup>a</sup> | 13 (6,5)<br>172 (86,0)<br>15 (6,8) |
| HPA-1              | a<br>b         | 121 (82,9)<br>25 (17,1)            | 0,797                    | 44 (81,5)<br>10 (18,5)           | 0,744              | 169 (84,5)<br>31 (15,5)            |
| HPA-2              | a<br>b         | 132 (90,4)<br>14 (9,6)             | 0,695                    | 49 (90,7)<br>5 (9,3)             | 0,824              | 177 (88,5)<br>23 (11,5)            |
| HPA-3              | a<br>b         | 95 (65,1)<br>51 (34,9)             | 0,062                    | 30 (55,6)<br>24 (44,4)           | 0,987              | 109 (54,5)<br>91 (45,5)            |
| HPA-5              | a<br>b         | 133 (91,1)<br>13 (8,9)             | 0,875                    | 48 (88,9)<br>6 (11,1)            | 0,989              | 180 (90,0)<br>20 (10,0)            |

n predstavlja broj djece s pojedinim alelom u pojedinoj skupini, \*usporedba s kontrolom skupinom,

<sup>a</sup>aleli ε2+ε4 u odnosu na alel ε3



### 5. 10. 1. POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA PREMA TIPU MOŽDANOG UDARA U DJECE

Povezanost pojedinačnih ispitivanih polimorfizama prema tipu MU, zasebno za AIMU i HMU ispitana je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijskom analizom prema dominantnom modelu, usporedbom s kontrolnom skupinom. Rezultati su prikazani u Tablici 27.

**Tablica 27.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize između djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom i kontrolne skupine te djece s hemoragijskim moždanim udarom i kontrolne skupine za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Varijabla          | Univarijantna logistička regresija   |                          |           |              |                   |    |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------|--------------|-------------------|----|
|                    | Moždani udar                         |                          |           |              |                   |    |
|                    | Arterijski ishemijski                |                          |           | Hemoragijski |                   |    |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)       | %* |
| Spol               | 0,709                                | 1,13 (0,60-2,12)         | 58        | 0,482        | 0,73 (0,31-1,74)  | 79 |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,016</b>                         | <b>5,13 (1,36-19,38)</b> | <b>62</b> | 0,855        | 1,24 (0,12-12,46) | 79 |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,720                                | 1,14 (0,55-2,36)         | 58        | 0,462        | 0,65 (0,20-2,10)  | 79 |
| FII G20210A        | 0,492                                | 0,45 (0,05-4,41)         | 58        | 0,855        | 1,24 (0,12-12,46) | 79 |
| FXIII-A Val34Leu   | 0,278                                | 1,40 (0,76-2,57)         | 58        | 0,314        | 1,55 (0,66-3,64)  | 79 |
| β-FBG -455G>A      | 0,340                                | 0,74 (0,41-1,37)         | 58        | 0,901        | 1,04 (0,53-2,07)  | 79 |
| PAI-1 4G/5G        | 0,603                                | 0,82 (0,40-1,71)         | 58        | 0,607        | 1,17 (0,64-2,17)  | 79 |
| MTHFR C677T        | 0,666                                | 1,14 (0,62-2,11)         | 58        | 0,899        | 1,05 (0,52-2,10)  | 79 |
| MTHFR A1298C       | 0,481                                | 1,24 (0,68-2,27)         | 58        | 0,340        | 1,37 (0,72-2,61)  | 79 |
| ACE I/D            | 0,052                                | 2,07 (0,99-4,32)         | 58        | 0,891        | 1,07 (0,42-2,70)  | 79 |
| apoE ε2-4**        | 0,496                                | 1,33 (0,58-3,03)         | 58        | 0,914        | 1,07 (0,32-3,56)  | 79 |
| HPA-1              | 0,817                                | 0,92 (0,47-1,81)         | 58        | 0,594        | 1,24 (0,56-2,76)  | 79 |
| HPA-2              | 0,407                                | 0,72 (0,34-1,55)         | 58        | 0,619        | 0,76 (0,26-2,23)  | 79 |
| HPA-3              | <b>0,020</b>                         | <b>0,47 (0,25-0,89)</b>  | <b>61</b> | 0,835        | 0,94 (0,50-1,74)  | 79 |
| HPA-5              | 0,974                                | 0,99 (0,45-2,17)         | 58        | 0,816        | 1,12 (0,44-2,86)  | 79 |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija |                          |           |              |                   |    |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)       | %* |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,025</b>                         | <b>4,72 (1,22-18,27)</b> | <b>62</b> | /            | /                 | /  |
| ACE I/D            | 0,060                                | 2,08 (0,97-4,45)         | 62        | /            | /                 | /  |
| HPA-3              | <b>0,042</b>                         | <b>0,51 (0,26-0,98)</b>  | <b>62</b> | /            | /                 | /  |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Univarijantnom logističkom regresijskom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost niti jednog ispitanog polimorfizma s HMU, dok je statistički značajna povezanost s AIMU utvrđena za 2 polimorfizma: FV Leiden (**P=0,016**) i HPA-3 (**P=0,020**). Nakon multivarijantne logističke regresijske analize u kojoj je osim FV Leiden i HPA-3 uvršten i ACE I/D ( $P=0,052$ ), statistički značajna povezanost s AIMU dobivena je za FV Leiden (**P=0,025**) i HPA-3 (**P=0,042**). Dobiveni rezultati ukazuju kako prisutnost FV Leiden povećava rizik na nastanak AIMU u djece približno 5 puta (**OR=4,72; 95% CI=1,22-18,27**) u odnosu na djecu kod kojih nije dokazan FV Leiden, dok djeca s najmanje 1 alelom HPA-3b imaju 2 puta manji rizik za nastanak AIMU (**OR=0,51; 95% CI=0,26-0,98**).

Nadalje provedena je i usporedba raspodjela učestalosti genotipova između dječaka i djevojčica s AIMU, te između dječaka i djevojčica s HMU. Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize dominantnim modelom prikazani su u Tablici 28. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova pojedinačnih polimorfizama između dječaka i djevojčica s HMU. Za razliku od toga za AIMU je univarijantnom logističkom regresijskom analizom dobivena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova između dječaka i djevojčica za polimorfizme FXIII-A (**P=0,003**), apoE  $\epsilon$ 2-4 (za skupinu apoE  $\epsilon$ 4, **P=0,028**) i HPA-2 (**P=0,028**). Nakon multivarijantne logističke regresijske analize u koju je uz ova 3 polimorfizma uključen i HPA-5 ( $P=0,053$ ), statistički značajna razlika dobivena je samo za FXIII-A (**P=0,006**). S obzirom na dobivene razlike u raspodjeli genotipova ispitivanih polimorfizama između dječaka i djevojčica s AIMU napravljene su zasebne usporedbe raspodjela genotipova između dječaka s AIMU i dječaka kontrolne skupine te djevojčica s AIMU i djevojčica kontrolne skupine. Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize su prikazani u Tablici 29.

**Tablica 28.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize za dječake i djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom te dječake i djevojčice s hemoragijskim moždanim udarom za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija   |                          |           |              |                   |    |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------|--------------|-------------------|----|
|                    | Moždani udar                         |                          |           |              |                   |    |
|                    | Arterijski ishemijski                |                          |           | Hemoragijski |                   |    |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)       | %* |
| FV Leiden (G1691A) | 0,266                                | 0,46 (0,12-1,79)         | 66        | 0,985        | /                 | 56 |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,917                                | 0,94 (0,30-2,94)         | 66        | 0,809        | 0,77 (0,09-6,45)  | 56 |
| FII G20210A        | 0,985                                | /                        | 67        | 0,984        | /                 | 59 |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,003</b>                         | <b>5,28 (1,78-15,68)</b> | 67        | 0,346        | 2,11 (0,45-9,84)  | 59 |
| β-FBG -455G>A      | 0,411                                | 1,50 (0,57-3,98)         | 66        | 0,795        | 0,82 (0,18-3,78)  | 56 |
| PAI-1 4G/5G        | 0,632                                | 0,75 (0,23-2,43)         | 66        | 0,756        | 1,33 (0,22-8,22)  | 56 |
| MTHFR C677T        | 0,639                                | 0,79 (0,29-2,14)         | 66        | 0,722        | 0,75 (0,15-3,65)  | 56 |
| MTHFR A1298C       | 0,246                                | 1,78 (0,67-4,73)         | 66        | 0,656        | 1,43 (0,30-6,88)  | 56 |
| ACE I/D            | 0,323                                | 1,85 (0,55-6,26)         | 66        | 0,052        | 0,10 (0,01-1,02)  | 67 |
| apoE ε2-4**        | <b>0,028</b>                         | <b>0,25 (0,07-0,86)</b>  | <b>70</b> | 0,809        | 0,77 (0,09-6,45)  | 56 |
| HPA-1              | 0,310                                | 1,82 (0,57-5,77)         | 66        | 0,415        | 2,00 (0,38-10,58) | 56 |
| HPA-2              | <b>0,028</b>                         | <b>0,25 (0,07-0,86)</b>  | 70        | 0,444        | 0,46 (0,06-3,35)  | 59 |
| HPA-3              | 0,401                                | 1,52 (0,57-4,01)         | 66        | 0,707        | 1,37 (0,26-7,22)  | 56 |
| HPA-5              | 0,053                                | 8,00 (0,98-65,62)        | 66        | 0,227        | 1,22 (0,41-3,57)  | 63 |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija |                          |           |              |                   |    |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)       | %* |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,006</b>                         | <b>5,38 (1,62-17,92)</b> | 74        | /            | /                 | /  |
| apoE ε2-4**        | 0,112                                | 0,32 (0,08-1,31)         | 74        | /            | /                 | /  |
| HPA-2              | 0,056                                | 0,24 (0,06-1,03)         | 74        | /            | /                 | /  |
| HPA-5              | 0,071                                | 7,81 (0,84-72,51)        | 74        | /            | /                 | /  |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

**Tablica 29.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize za dječake s arterijskim ishemijskim moždanim udarom i dječake kontrolne skupine te djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom i djevojčice kontrolne skupine za genotipove dominantnim modelom i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija                                            |                         |           |                                                                                     |                          |           |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|                    | Dječaci s arterijskim ishemijskim moždanim udarom i dječaci kontrolne skupine |                         |           | Djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom i djevojčice kontrolne skupine |                          |           |
|                    | P                                                                             | OR (95% CI)             | %*        | P                                                                                   | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | 0,076                                                                         | 7,21 (0,81-63,90)       | 60        | 0,094                                                                               | 4,37 (0,78-24,66)        | 65        |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,350                                                                         | 1,58 (0,61-4,09)        | 58        | 0,620                                                                               | 0,75 (0,23-2,37)         | 60        |
| FII G20210A        | 0,986                                                                         | /                       | 57        | 0,778                                                                               | 1,50 (0,09-25,15)        | 60        |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,042</b>                                                                  | <b>2,22 (1,03-4,79)</b> | <b>59</b> | 0,256                                                                               | 0,52 (0,17-1,61)         | 60        |
| β-FBG -455G>A      | 0,754                                                                         | 0,89 (0,42-1,89)        | 57        | 0,234                                                                               | 0,54 (0,19-1,50)         | 60        |
| PAI-1 4G/5G        | 0,962                                                                         | 1,02 (0,43-2,43)        | 57        | 0,320                                                                               | 0,48 (0,12-2,02)         | 61        |
| MTHFR C677T        | 0,967                                                                         | 0,98 (0,46-2,11)        | 57        | 0,437                                                                               | 1,51 (0,53-4,28)         | 60        |
| MTHFR A1298C       | 0,340                                                                         | 1,44 (0,68-3,08)        | 57        | 0,880                                                                               | 0,92 (0,33-2,57)         | 60        |
| ACE I/D            | 0,085                                                                         | 2,34 (0,89-6,18)        | 57        | 0,353                                                                               | 1,72 (0,55-5,36)         | 60        |
| apoE ε2-4**        | 0,408                                                                         | 0,62 (0,20-1,94)        | 57        | <b>0,046</b>                                                                        | <b>3,88 (1,02-14,76)</b> | <b>66</b> |
| HPA-1              | 0,496                                                                         | 1,33 (0,58-3,07)        | 57        | 0,203                                                                               | 0,46 (0,14-1,52)         | 60        |
| HPA-2              | 0,109                                                                         | 0,41 (0,14-1,22)        | 57        | 0,507                                                                               | 1,46 (0,47-4,52)         | 60        |
| HPA-3              | 0,152                                                                         | 0,56 (0,25-1,24)        | 59        | <b>0,049</b>                                                                        | <b>0,34 (0,12-1,00)</b>  | <b>65</b> |
| HPA-5              | 0,451                                                                         | 1,42 (0,57-3,51)        | 57        | 0,168                                                                               | 0,21 (0,02-1,91)         | 60        |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija                                          |                         |           |                                                                                     |                          |           |
|                    | P                                                                             | OR (95% CI)             | %*        | P                                                                                   | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | 0,068                                                                         | 7,86 (0,86-71,89)       | 63        | <b>0,045</b>                                                                        | <b>6,91 (1,05-45,68)</b> | <b>73</b> |
| FXIII-A Val34Leu   | <b>0,037</b>                                                                  | <b>2,31 (1,05-5,08)</b> | <b>63</b> | /                                                                                   | /                        | /         |
| ACE I/D            | 0,159                                                                         | 2,06 (0,75-5,65)        | 63        | /                                                                                   | /                        | /         |
| apoE ε2-4**        | /                                                                             | /                       | /         | <b>0,044</b>                                                                        | <b>4,32 (1,04-17,92)</b> | <b>73</b> |
| HPA-3              | /                                                                             | /                       | /         | 0,078                                                                               | 0,49 (0,22-1,08)         | 73        |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Dobivena je statistički značajna povezanost pojedinačnih polimorfizama s AIMU kako u dječaka tako i u djevojčica u odnosu na kontrolne skupine dječaka i djevojčica. Pri tome dječaci s najmanje jednim alelom FXIII-A Leu34 imaju **2,31** puta (**95% CI=1,05-5,08**) veći rizik za nastanak AIMU u odnosu na dječake koji su homozigoti za divlji tip (Val34Val), dok je u djevojčica koje su nosioci najmanje jednog alela apoE ε4 rizik za nastanak AIMU veći za

više od 4 puta (**OR=4,32; 95% CI=1,04-17,92**), a FV Leiden za približno 7 puta (**OR=6,91; 95% CI=1,05-45,68**) u odnosu na djevojčice koje nisu nosioci tih alela.

## 5. 11. UČESTALOSTI ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA U DJECE S ARTERIJSKIM ISHEMIJSKIM MOŽDANIM UDAROM PREMA DOBI POJAVE MOŽDANOG UDARA

Unutar skupine djece s AIMU napravljena je analiza raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama prema dobi pojave MU, zasebno za PMU i DMU. usporedbom u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati raspodjele učestalosti genotipova prikazani su u Tablici 30., a raspodjele učestalosti alela u Tablici 31.

**Tablica 30.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama u djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35) i s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam       | Genotip | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |                          |            |                    | Kontrolna skupina<br>n (%) |
|--------------------|---------|---------------------------------------------|--------------------------|------------|--------------------|----------------------------|
|                    |         | Perinatalni                                 | P*                       | Dječja dob | P*                 |                            |
| FV Leiden (G1691A) | GG      | 28 (80,0)                                   | <b>0,003<sup>a</sup></b> | 35 (92,1)  | 0,346 <sup>a</sup> | 97 (97,0)                  |
|                    | GA      | 7 (20,0)                                    |                          | 3 (7,9)    |                    | 3 (3,0)                    |
|                    | AA      | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 0 (0,0)                    |
| FV HR2 (A4070G)    | AA      | 28 (80,0)                                   | 0,907 <sup>a</sup>       | 28 (73,7)  | 0,660 <sup>a</sup> | 79 (79,0)                  |
|                    | GA      | 7 (20,0)                                    |                          | 10 (26,3)  |                    | 21 (21,0)                  |
|                    | GG      | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 0 (0,0)                    |
| FII G20210A        | GG      | 35 (100,0)                                  | 0,568 <sup>a</sup>       | 37 (97,4)  | 1,000 <sup>a</sup> | 97 (97,0)                  |
|                    | GA      | 0 (0,0)                                     |                          | 1 (2,6)    |                    | 3 (3,0)                    |
|                    | AA      | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 0 (0,0)                    |
| FXIII-A Val34Leu   | ValVal  | 22 (62,9)                                   | 0,841 <sup>a</sup>       | 15 (39,5)  | 0,062 <sup>a</sup> | 59 (59,0)                  |
|                    | ValLeu  | 11 (31,4)                                   |                          | 20 (52,6)  |                    | 37 (37,0)                  |
|                    | LeuLeu  | 2 (5,7)                                     |                          | 3 (6,8)    |                    | 4 (4,0)                    |
| β-FBG -455G>A      | GG      | 19 (54,2)                                   | 0,289 <sup>a</sup>       | 17 (44,7)  | 0,922 <sup>a</sup> | 42 (42,0)                  |
|                    | GA      | 15 (42,9)                                   |                          | 18 (47,4)  |                    | 51 (51,0)                  |
|                    | AA      | 1 (2,9)                                     |                          | 3 (7,9)    |                    | 7 (7,0)                    |
| PAI-1 4G/5G        | 5G5G    | 7 (20,0)                                    | 0,806 <sup>a</sup>       | 10 (26,3)  | 0,567 <sup>a</sup> | 20 (20,0)                  |
|                    | 5G4G    | 21 (60,0)                                   |                          | 16 (42,1)  |                    | 53 (53,0)                  |
|                    | 4G4G    | 7 (20,0)                                    |                          | 12 (31,6)  |                    | 27 (27,0)                  |

**Tablica 30.** (nastavak)

| Polimorfizam | Genotip | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |                          |            |                    | Kontrolna skupina<br>n (%) |
|--------------|---------|---------------------------------------------|--------------------------|------------|--------------------|----------------------------|
|              |         | Perinatalni                                 | P*                       | Dječja dob | P*                 |                            |
| MTHFR C677T  | CC      | 14 (40,0)                                   | 0,508 <sup>b</sup>       | 15 (39,5)  | 0,299 <sup>b</sup> | 41 (41,0)                  |
|              | CT      | 17 (48,6)                                   |                          | 17 (44,7)  |                    | 51 (51,0)                  |
|              | TT      | 4 (11,4)                                    |                          | 6 (15,8)   |                    | 8 (8,0)                    |
| MTHFR A1298C | AA      | 14 (40,0)                                   | 0,305 <sup>a</sup>       | 20 (52,6)  | 0,901 <sup>a</sup> | 52 (52,0)                  |
|              | AC      | 19 (54,3)                                   |                          | 14 (36,8)  |                    | 39 (39,0)                  |
|              | CC      | 2 (5,7)                                     |                          | 4 (10,5)   |                    | 9 (9,0)                    |
| ACE I/D      | II      | 6 (17,1)                                    | 0,173 <sup>a</sup>       | 7 (18,4)   | 0,206 <sup>a</sup> | 31 (31,0)                  |
|              | ID      | 24 (68,6)                                   |                          | 20 (52,6)  |                    | 44 (44,0)                  |
|              | DD      | 5 (14,3)                                    |                          | 11 (28,9)  |                    | 25 (25,0)                  |
| apoE ε2-4    | ε2/2    | 0 (0,0)                                     | 0,689 <sup>c</sup>       | 0 (0,0)    | 0,658 <sup>b</sup> | 1 (1,0)                    |
|              | ε2/3    | 4 (11,4)                                    |                          | 6 (15,8)   |                    | 11 (11,0)                  |
|              | ε2/4    | 2 (5,7)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 0 (0,0)                    |
|              | ε3/3    | 24 (68,6)                                   |                          | 26 (68,4)  |                    | 74 (74,0)                  |
|              | ε3/4    | 5 (14,3)                                    |                          | 6 (15,8)   |                    | 13 (13,0)                  |
|              | ε4/4    | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 1 (1,0)                    |
| HPA-1        | a/a     | 26 (74,3)                                   | 0,878 <sup>a</sup>       | 27 (71,1)  | 0,838 <sup>a</sup> | 71 (71,0)                  |
|              | a/b     | 7 (20,0)                                    |                          | 8 (21,1)   |                    | 27 (27,0)                  |
|              | b/b     | 2 (5,7)                                     |                          | 3 (7,9)    |                    | 2 (2,0)                    |
| HPA-2        | a/a     | 30 (85,7)                                   | 0,394 <sup>a</sup>       | 29 (76,3)  | 0,888 <sup>a</sup> | 77 (77,0)                  |
|              | a/b     | 5 (14,3)                                    |                          | 9 (23,7)   |                    | 23 (23,0)                  |
|              | b/b     | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 0 (0,0)                    |
| HPA-3        | a/a     | 18 (51,4)                                   | <b>0,028<sup>a</sup></b> | 16 (42,1)  | 0,206 <sup>a</sup> | 29 (29,0)                  |
|              | a/b     | 9 (25,7)                                    |                          | 18 (47,4)  |                    | 51 (51,0)                  |
|              | b/b     | 8 (22,9)                                    |                          | 4 (10,5)   |                    | 20 (20,0)                  |
| HPA-5        | a/a     | 27 (77,1)                                   | 0,544 <sup>a</sup>       | 33 (86,8)  | 0,846 <sup>a</sup> | 82 (82,0)                  |
|              | a/b     | 8 (22,9)                                    |                          | 5 (13,2)   |                    | 16 (16,0)                  |
|              | b/b     | 0 (0,0)                                     |                          | 0 (0,0)    |                    | 2 (2,0)                    |

n predstavlja broj djece s pojedinim genotipom u pojedinoj skupini, \*usporedba s kontrolnom skupinom, <sup>a</sup>dominantni model (heterozigoti+homozigoti u odnosu na homozigote za divlji tip; <sup>b</sup>recesivni model (homozigoti u odnosu na. homozigote za divlji tip+ heterozigote); <sup>c</sup>genotip ε3/3 u odnosu na sve ostale genotipove

Učestalosti genotipova statistički su se razlikovale u djece s PMU u odnosu na kontrolnu skupinu za polimorfizme FV Leiden (**P=0,003**) i HPA-3 (**P=0,028**), dok nije pronađena statistička značajna razlika u učestalosti genotipova u djece s DMU u odnosu na kontrolnu skupinu niti za jedan ispitan polimorfizam.

**Tablica 31.** Raspodjela učestalosti alela ispitanih polimorfizama u djece s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom (N=35) i arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Polimorfizam       | Alel           | Arterijski ishemijski moždani udar<br>n (%) |                          |                                 |       | Kontrolna skupina<br>n (%)         |
|--------------------|----------------|---------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------|------------------------------------|
|                    |                | Perinatalni                                 | P*                       | Dječja dob                      | P*    |                                    |
| FV Leiden (G1691A) | G<br>A         | 63 (90,0)<br>7 (10,0)                       | <b>0,004<sup>a</sup></b> | 73 (96,0)<br>3 (3,9)            | 0,351 | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              |
| FV HR2 (A4070G)    | A<br>G         | 63 (90,0)<br>7 (10,0)                       | 0,913                    | 66 (86,8)<br>10 (13,2)          | 0,681 | 179 (89,5)<br>21 (10,5)            |
| FII G20210A        | G<br>A         | 70 (100,0)<br>0 (0,0)                       | 0,571                    | 75 (98,7)<br>1 (1,3)            | 1,000 | 197 (98,5)<br>3 (1,5)              |
| FXIII-A Val34Leu   | Val<br>Leu     | 55 (78,6)<br>15 (21,4)                      | 0,985                    | 50 (65,8)<br>26 (34,2)          | 0,067 | 155 (77,5)<br>45 (22,5)            |
| β-FBG -455G>A      | G<br>A         | 53 (75,7)<br>17 (24,3)                      | 0,256                    | 52 (68,4)<br>24 (31,6)          | 0,998 | 135 (67,5)<br>65 (32,5)            |
| PAI-1 4G/5G        | 5G<br>4G       | 35 (50,0)<br>35 (50,0)                      | 0,715                    | 36 (47,4)<br>40 (52,6)          | 0,995 | 93 (46,5)<br>107 (53,5)            |
| MTHFR C677T        | C<br>T         | 45 (64,3)<br>25 (35,7)                      | 0,849                    | 47 (61,8)<br>29 (38,2)          | 0,559 | 133 (66,5)<br>67 (33,5)            |
| MTHFR A1298C       | A<br>C         | 47 (67,1)<br>23 (32,9)                      | 0,593                    | 54 (71,1)<br>22 (28,9)          | 0,940 | 143 (71,5)<br>57 (28,5)            |
| ACE I/D            | I<br>D         | 36 (51,4)<br>34 (48,6)                      | 0,930                    | 34 (44,7)<br>42 (55,3)          | 0,275 | 106 (52,0)<br>94 (47,0)            |
| apoE ε2-4          | ε2<br>ε3<br>ε4 | 6 (8,6)<br>57 (81,4)<br>7 (10,0)            | 0,356 <sup>b</sup>       | 6 (7,9)<br>64 (84,2)<br>6 (7,9) | 0,704 | 13 (6,5)<br>172 (86,0)<br>15 (6,8) |
| HPA-1              | a<br>b         | 59 (84,3)<br>11 (15,7)                      | 0,881                    | 62 (81,6)<br>14 (18,4)          | 0,686 | 169 (84,5)<br>31 (15,5)            |
| HPA-2              | a<br>b         | 65 (92,9)<br>5 (7,1)                        | 0,423                    | 67 (88,2)<br>9 (11,8)           | 0,896 | 177 (88,5)<br>23 (11,5)            |
| HPA-3              | a<br>b         | 45 (64,3)<br>25 (35,7)                      | 0,062                    | 50 (65,8)<br>26 (34,2)          | 0,987 | 109 (54,5)<br>91 (45,5)            |
| HPA-5              | a<br>b         | 62 (88,6)<br>8 (11,4)                       | 0,875                    | 71 (93,4)<br>5 (6,6)            | 0,989 | 180 (90,0)<br>20 (10,0)            |

n predstavlja broj djece s pojedinim alelom u pojedinoj skupini, \*usporedba s kontrolom skupinom,

<sup>a</sup>aleli ε2+ε4 u odnosu na alel ε3

**Tablica 32.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize za djecu s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi i kontrolnu skupinu za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Varijabla          | Univarijantna logistička regresija   |                          |           |              |                         |           |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------|--------------|-------------------------|-----------|
|                    | Arterijski ishemijski moždani udar   |                          |           |              |                         |           |
|                    | Perinatalni                          |                          |           | Dječja dob   |                         |           |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)             | %*        |
| Spol               | 0,540                                | 0,78 (0,36-1,71)         | 74        | 0,239        | 1,64 (0,72-3,76)        | 72        |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,004</b>                         | <b>8,08 (1,96-33,32)</b> | <b>77</b> | 0,225        | 2,77 (0,53-14,38)       | 72        |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,900                                | 0,94 (0,36-2,45)         | 74        | 0,505        | 1,34 (0,56-3,20)        | 72        |
| FII G20210A        | 0,986                                | /                        | 74        | 0,908        | 0,87 (0,09-8,67)        | 72        |
| FXIII-A Val34Leu   | 0,688                                | 0,85 (0,38-1,88)         | 74        | <b>0,042</b> | <b>2,21 (1,03-4,73)</b> | <b>72</b> |
| β-FBG 455G>A       | 0,211                                | 0,61 (0,28-1,32)         | 74        | 0,772        | 0,89 (0,42-1,90)        | 72        |
| PAI-1 4G/5G        | 1,000                                | 1,00 (0,38-2,62)         | 74        | 0,428        | 0,70 (0,29-1,68)        | 72        |
| MTHFR C677T        | 0,757                                | 1,13 (0,52-2,48)         | 74        | 0,708        | 1,16 (0,54-2,48)        | 72        |
| MTHFR A1298C       | 0,223                                | 1,62 (0,74-3,55)         | 74        | 0,947        | 0,97 (0,46-2,06)        | 72        |
| ACE I/D            | 0,119                                | 2,17 (0,82-5,76)         | 74        | 0,144        | 1,99 (0,79-5,01)        | 72        |
| apoE ε2-4**        | 0,402                                | 1,54 (0,56-4,19)         | 74        | 0,790        | 1,15 (0,41-3,26)        | 72        |
| HPA-1              | 0,710                                | 0,85 (0,35-2,03)         | 74        | 0,995        | 1,00 (0,44-2,27)        | 72        |
| HPA-2              | 0,278                                | 0,56 (0,19-1,60)         | 74        | 0,807        | 0,89 (0,36-2,21)        | 72        |
| HPA-3              | <b>0,028</b>                         | <b>0,41 (0,19-0,91)</b>  | <b>74</b> | 0,115        | 0,53 (0,25-1,16)        | 72        |
| HPA-5              | 0,521                                | 1,35 (0,53-3,45)         | 74        | 0,497        | 0,69 (0,24-2,01)        | 72        |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija |                          |           |              |                         |           |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)             | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,004</b>                         | <b>8,29 (1,95-35,24)</b> | <b>77</b> | /            | /                       | /         |
| HPA-3              | <b>0,032</b>                         | <b>0,40 (0,18-0,92)</b>  | <b>77</b> | /            | /                       | /         |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize raspodjele ispitivanih polimorfizama dominantnim modelom prikazani u Tablici 32. ukazuju na statističku značajnu povezanost različitih polimorfizama s PMU i DMU. FV Leiden povećava rizik za nastanak PMU u djece 8 puta (**OR=8,29; 95% CI=1,95-35,24**), dok prisutnost najmanje jednog alela HPA-3b smanjuje rizik za približno 2 puta (**OR=0,40; 95% CI=0,18-0,92**). Za razliku od toga nije dokazana povezanost ovih polimorfizama s DMU, ali je u nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 dokazan 2 puta veći rizik za nastanak DMU (**OR=2,21; 95% CI=1,03-4,73**) u odnosu na nosioce genotipa Val34Val.



Nadalje, ispitana je i moguća razlika u raspodjeli genotipova između spolova zasebno za djecu s PMU i DMU, a rezultati su prikazani u Tablici 33.

**Tablica 33.** Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize za dječake i djevojčice s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom te dječake i djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija   |                          |           |              |                          |           |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------|--------------|--------------------------|-----------|
|                    | Arterijski ishemijski moždani udar   |                          |           |              |                          |           |
|                    | Perinatalni                          |                          |           | Dječja dob   |                          |           |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | 0,398                                | 0,49 (0,09-2,60)         | 60        | 0,775        | 0,69 (0,06-8,58)         | 74        |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,117                                | 6,00 (0,64-56,52)        | 57        | 0,057        | 0,22 (0,05-1,05)         | 74        |
| FII G20210A        | 0,985                                | /                        | 67        | 0,981        | /                        | 76        |
| FXIII-A Val34Leu   | 0,078                                | 4,00 (0, 86-18,64)       | 63        | <b>0,029</b> | <b>5,83 (1,20-28,37)</b> | <b>74</b> |
| β-FBG -455G>A      | 0,557                                | 1,50 (0,40-5,81)         | 57        | 0,697        | 1,33 (0,31-5,67)         | 74        |
| PAI-1 4G/5G        | 0,400                                | 0,46 (0,08-2,79)         | 57        | 0,758        | 1,29 (0,26-6,37)         | 74        |
| MTHFR C677T        | 0,487                                | 1,62 (0,41-6,39)         | 57        | 0,156        | 0,29 (0,05-1,61)         | 74        |
| MTHFR A1298C       | 0,487                                | 1,62 (0,41-6, 93)        | 57        | 0,208        | 2,69 (0,58-12,60)        | 74        |
| ACE I/D            | 0,698                                | 1,42 (0,24-8,26)         | 57        | 0,281        | 2,57 (0,88-14,32)        | 74        |
| apoE ε2-4**        | 0,398                                | 0,49 (0,09-2,60)         | 60        | <b>0,027</b> | <b>0,12 (0,02-0,78)</b>  | <b>79</b> |
| HPA-1              | <b>0,048</b>                         | <b>9,33 (1,02-85,70)</b> | <b>63</b> | 0,374        | 0,50 (0,11-2,30)         | 74        |
| HPA-2              | 0,985                                | /                        | 71        | 0,427        | 0,51 (0,10-2,67)         | 74        |
| HPA-3              | 0,245                                | 2,25 (0,57-8,82)         | 60        | 0,875        | 0,89 (0,20-3,87)         | 74        |
| HPA-5              | 0,075                                | 7,54 (0,81-69,91)        | 60        | 0,982        | /                        | 74        |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija |                          |           |              |                          |           |
|                    | P                                    | OR (95% CI)              | %*        | P            | OR (95% CI)              | %*        |
| HPA-1              | <b>0,048</b>                         | <b>9,33 (1,02-85,70)</b> | <b>63</b> | /            | /                        | /         |
| apoE ε2-4**        | /                                    | /                        | /         | <b>0,027</b> | <b>0,12 (0,02-0,78)</b>  | <b>79</b> |
| FXIII-A Val34Leu   | /                                    | /                        | /         | 0,052        | 6,31 (0,98-40,45)        | 82        |
| FV H1299R          | /                                    | /                        | /         | 0,093        | 0,20 (0,02-1,74)         | 82        |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova između spolova dobivene su i za PMU i za DMU, pa je napravljena usporedba raspodjele genotipova između dječaka s PMU i DMU i dječaka iz kontrolne skupine. Rezultati su prikazani u Tablici 34.

**Tablica 34.** Rezultati univarijantne logističke regresijske analize za dječake s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i dječake s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi u odnosu na dječake kontrolne skupine za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija                                                         |                            |    |                                                                                              |                         |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----|
|                    | Dječaci s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i dječaci kontrolne skupine |                            |    | Dječaci s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi i dječaci kontrolne skupine |                         |    |
|                    | P                                                                                          | OR (95% CI)                | %* | P                                                                                            | OR (95% CI)             | %* |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,044</b>                                                                               | <b>10,94 (1,07-112,00)</b> | 78 | 0,210                                                                                        | 4,77 (0,41-54,93)       | 69 |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,170                                                                                      | 2,27 (0,70-7,33)           | 76 | 0,814                                                                                        | 1,15 (0,35-3,75)        | 69 |
| FII G20210A        | 0,983                                                                                      | /                          | 76 | 0,988                                                                                        | /                       | 69 |
| FXIII-A Val34Leu   | 0,576                                                                                      | 1,33 (0,49-3,66)           | 76 | <b>0,014</b>                                                                                 | <b>3,33 (1,28-8,70)</b> | 69 |
| β-FBG -455G>A      | 0,576                                                                                      | 0,75 (0,27-2,06)           | 76 | 1,000                                                                                        | 1,00 (0,41-2,46)        | 69 |
| PAI-1 4G/5G        | 0,972                                                                                      | 1,02 (0,32-3,26)           | 76 | 0,967                                                                                        | 1,02 (0,37-2,85)        | 69 |
| MTHFR C677T        | 0,618                                                                                      | 1,31 (0,46-3,72)           | 76 | 0,647                                                                                        | 0,81 (0,33-1,99)        | 69 |
| MTHFR A1298C       | 0,221                                                                                      | 1,92 (0,68-5,44)           | 76 | 0,701                                                                                        | 1,19 (0,49-2,91)        | 69 |
| ACE I/D            | 0,233                                                                                      | 2,27 (0,59-8,69)           | 76 | 0,150                                                                                        | 2,40 (0,73-7,90)        | 69 |
| apoE ε2-4**        | 0,925                                                                                      | 0,94 (0,23-3,80)           | 76 | 0,268                                                                                        | 0,41 (0,08-2,00)        | 69 |
| HPA-1              | 0,214                                                                                      | 1,96 (0,68-5,65)           | 76 | 0,968                                                                                        | 0,98 (0,35-2,73)        | 69 |
| HPA-2              | 0,981                                                                                      | /                          | 76 | 0,697                                                                                        | 0,76 (0,24-2,37)        | 69 |
| HPA-3              | 0,340                                                                                      | 0,60 (0,21-1,71)           | 76 | 0,184                                                                                        | 0,53 (0,21-1,35)        | 69 |
| HPA-5              | 0,145                                                                                      | 2,29 (0,75-6,97)           | 76 | 0,893                                                                                        | 0,92 (0,29-2,93)        | 69 |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Za dječake je dobivena jaka povezanost između FV Leiden i PMU (**OR=10,94, 95% CI=1,07-112,00**), te između polimorfizma FXIII-A Val34Leu i DMU (**OR=3,33, 95% CI=1,26-6,70**). Provedena je i usporedba raspodjele genotipova između djevojčica s PMU i DMU u odnosu na djevojčice iz kontrolne skupine, a rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize prikazani su u Tablici 35.

**Tablica 35.** Rezultati univarijantne logističke regresijske analize za djevojčice s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi u odnosu na djevojčice iz kontrolne skupine za genotipove i izračunati odjeci rizika (OR) s 95%-nim intervalom pouzdanosti (95% CI).

| Polimorfizam       | Univarijantna logistička regresija                                                                  |                            |           |                                                                                                       |                          |           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|                    | Djevojčice s perinatalnim arterijskim ishemijskim moždanim udarom i djevojčice iz kontrolne skupine |                            |           | Djevojčice s arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi i djevojčice iz kontrolne skupine |                          |           |
|                    | P                                                                                                   | OR (95% CI)                | %*        | P                                                                                                     | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,047</b>                                                                                        | <b>6,36 (1,02-39,58)</b>   | 75        | 0,603                                                                                                 | 1,94 (0,16-23,92)        | 79        |
| FV HR2 (A4070G)    | 0,104                                                                                               | 0,17 (0,02-1,45)           | 71        | 0,237                                                                                                 | 2,36 (0,57-9,84)         | 79        |
| FII G20210A        | 0,987                                                                                               | /                          | 71        | 0,343                                                                                                 | 4,00 (0,23-70,30)        | 79        |
| FXIII-A Val34Leu   | 0,222                                                                                               | 0,41 (0,10-1,71)           | 71        | 0,648                                                                                                 | 0,70 (0,16-3,18)         | 79        |
| β-FBG -455G>A      | 0,207                                                                                               | 0,45 (0,13-1,55)           | 71        | 0,592                                                                                                 | 0,68 (0,17-2,77)         | 79        |
| PAI-1 4G/5G        | 0,797                                                                                               | 0,79 (0,13-4,84)           | 71        | 0,146                                                                                                 | 0,28 (0,05-1,56)         | 79        |
| MTHFR C677T        | 0,962                                                                                               | 0,97 (0,29-3,23)           | 71        | 0,153                                                                                                 | 3,40 (0,63-18,22)        | 79        |
| MTHFR A1298C       | 0,629                                                                                               | 1,34 (0,40-4,48)           | 71        | 0,371                                                                                                 | 0,50 (0,11-2,26)         | 79        |
| ACE I/D            | 0,291                                                                                               | 2,17 (0,52-9,09)           | 71        | 0,761                                                                                                 | 1,26 (0,28-5,73)         | 79        |
| apoE ε2-4**        | 0,163                                                                                               | 3,00 (0,64-14,06)          | 71        | <b>0,041</b>                                                                                          | <b>5,50 (1,07-28,25)</b> | <b>79</b> |
| HPA-1              | 0,063                                                                                               | 0,13 (0,02-1,12)           | 71        | 0,777                                                                                                 | 1,23 (0,29-5,16)         | 79        |
| HPA-2              | 0,509                                                                                               | 1,56 (0,42-5,77)           | 71        | 0,716                                                                                                 | 1,33 (0,28-6,26)         | 79        |
| HPA-3              | <b>0,030</b>                                                                                        | <b>0,25 (0,07-0,87)</b>    | <b>71</b> | 0,435                                                                                                 | 0,56 (0,13-2,39)         | 79        |
| HPA-5              | 0,377                                                                                               | 0,37 (0,04-3,36)           | 76        | 0,982                                                                                                 | /                        | 79        |
| Polimorfizam       | Multivarijantna logistička regresija                                                                |                            |           |                                                                                                       |                          |           |
|                    | P                                                                                                   | OR (95% CI)                | %*        | P                                                                                                     | OR (95% CI)              | %*        |
| FV Leiden (G1691A) | <b>0,013</b>                                                                                        | <b>13,81 (1,72-110,52)</b> | 79        | /                                                                                                     | /                        | /         |
| HPA-1              | 0,057                                                                                               | 0,11 (0,01-1,07)           | 79        | /                                                                                                     | /                        | /         |
| HPA-3              | <b>0,011</b>                                                                                        | <b>0,14 (0,03-0,64)</b>    | 79        | /                                                                                                     | /                        | /         |

\*% točno klasificiranih slučajeva; \*\*skupina apoE ε4 (nosioci najmanje jednog alela apoE ε4)

Dokazana je jaka povezanost FV Leiden s PMU u djevojčica (**OR=13,81; 95% CI=1,72-110,52**) slično kao i u dječaka, ali i zaštitna uloga alela HPA-3b (**OR=0,14; 95% CI=0,03-0,64**). Za razliku od toga djevojčice s najmanje jednim alelom apoE ε4 imaju **5,5** puta veći rizik (**95% CI=1,07-28,25**) za nastanak DMU.

## 5. 12. UČESTALOSTI KOMBINACIJE GENOTIPOVA FV I MTHFR U DJECE S MOŽDANIM UDAROM

Osim određivanja učestalosti pojedinačnih polimorfizama u djece s MU i u kontrolnoj skupini određene su i učestalosti dvije kombinacije genotipova za polimorfizme: FV (FV Leiden i FV HR2), te MTHFR (MTHFR C677T i MTHFR A1298C) kako bi se ispitaio njihov mogući utjecaj na pojavnost MU u djece. Učestalosti kombinacija genotipova određene su i u podskupinama djece s MU prema tipu MU (AIMU i HMU) te prema dobi pojave AIMU (PMU i DMU) i uspoređene s kombinacijama genotipova u kontrolnoj skupini (Tablica 36.).

**Tablica 36.** Raspodjela učestalosti kombinacija genotipova za polimorfizme FV Leiden i FV HR2 te MTHFR C677T i MTHFR A1298C u djece s moždanim udarom (ukupno N=100), arterijskim ishemijskim (ukupno N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27), perinatalnim (N=35) i arterijskim ishemijskim moždanim udarom u dječjoj dobi (N=38) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Kombinacija polimorfizama | Genotip | Moždani udar<br>n (%) |            |          |              |         | Kontrolna skupina<br><br>n (%) |
|---------------------------|---------|-----------------------|------------|----------|--------------|---------|--------------------------------|
|                           |         | Arterijski ishemijski |            |          | Hemoragijski | Ukupno  |                                |
|                           |         | Perinatalni           | Dječja dob | Ukupno   |              |         |                                |
| FV Leiden/<br>FV HR2      | GG/AA   | 23 (66)               | 28 (74)    | 51 (70)  | 22 (81)      | 73 (73) | 76 (76)                        |
|                           | GG/AG   | 5 (14)                | 7 (18)     | 12 (16)  | 4 (15)       | 16 (16) | 21 (21)                        |
|                           | GG/GG   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | GA/AA   | 5 (14)*               | 0 (0)      | 5 (7)    | 1 (4)        | 6 (6)   | 3 (3)                          |
|                           | GA/AG   | 2 (6)                 | 3 (8)**    | 5 (7)*** | 0 (0)        | 5 (5)   | 0 (0)                          |
|                           | GA/GG   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | AA/AA   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | AA/AG   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | AA/GG   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
| MTHFR<br>C677T/<br>A1298C | CC/AA   | 4 (11)                | 4 (11)     | 8 (11)   | 2 (7)        | 10 (10) | 18 (18)                        |
|                           | CC/AC   | 8 (23)                | 7 (18)     | 15 (20)  | 5 (19)       | 20 (20) | 16 (16)                        |
|                           | CC/CC   | 2 (6)                 | 4 (11)     | 6 (8)    | 2 (7)        | 8 (8)   | 9 (9)                          |
|                           | CT/AA   | 6 (17)                | 10 (26)    | 16 (22)  | 7 (26)       | 23 (23) | 26 (26)                        |
|                           | CT/AC   | 11 (31)               | 7 (18)     | 18 (25)  | 10 (37)      | 28 (28) | 23 (23)                        |
|                           | CT/CC   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | TT/AA   | 4 (11)                | 6 (16)     | 10 (14)  | 1 (4)        | 11 (11) | 8 (8)                          |
|                           | TT/AC   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |
|                           | TT/CC   | 0 (0)                 | 0 (0)      | 0 (0)    | 0 (0)        | 0 (0)   | 0 (0)                          |

n predstavlja broj djece s pojedinom kombinacijom genotipova u pojedinoj skupini; \*P=0,028; \*\*P=0,023; \*\*\*P=0,012 prema referentnoj kombinaciji genotipova GG/AA u odnosu na kontrolnu skupinu

S obzirom da za polimorfizme FV Leiden i FV HR2 nisu pronađeni homozigoti ni u skupini djece s MU niti u kontrolnoj skupini, od mogućih 9 kombinacija genotipova pronađene su samo 4 kombinacije genotipova u djece s MU i 3 kombinacije genotipova u kontrolnoj skupini (Tablica 36). Najčešća kombinacija genotipova bila je dvostruki homozigotni oblik za divlji tip GG/AA u djece s MU i u kontrolnoj skupini, kao i u ispitivanim podskupinama. Kombinacija genotipova GA/AG (dvostruki heterozigotni oblik) zabilježena je samo u djece s MU i to u 5/100 slučajeva ( $P=0,074$ ). Svih 5 slučajeva zabilježeno je u djece s AIMU (5/73,  **$P=0,012$** ) i to podjednako u djece s PMU (2/35;  $P=0,071$ ) i s DMU (3/38;  **$P=0,023$** ). U djece s PMU zabilježena je najveća učestalost kombinacije genotipova GA/AA koja se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu ( **$P=0,028$ ;  $OR=5,51$ ; 95%  $CI=1,22-24,82$** ).

S obzirom na kombinacije genotipova za MTHFR pronađeno je 6 kombinacija genotipova i u djece s MU i u kontrolnoj skupini, s tim što nije pronađen niti jedan slučaj kombinacije heterozigotnog oblika MTHFR C677T ili MTHFR A1298C s homozigotnim oblikom jednog ili drugog polimorfizma, kao ni dvostruki homozigotni oblik. Za razliku od kombinacije genotipova za FV kombinacija dvostrukog homozigotnog oblika za divlji tip CC/AA bila je relativno rijetko zastupljena, u samo 18/100 djece iz kontrolne skupine i 10/100 djece s MU. Nasuprot tome dvostruki heterozigotni oblik CT/AC zabilježen je u >20% slučajeva u djece s MU i u kontrolnoj skupini, s tim što je najveća učestalost zabilježena u djece s HMU (10/27), ali nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P=0,386$ ).

Učestalosti kombinacija genotipova FV Leiden i FV HR2, te MTHFR C677T i MTHFR A1298C određene su i zasebno za dječake i djevojčice u djece s MU i u kontrolnoj skupini, kao i u podskupinama djece s MU s obzirom na tip MU (AIMU i HMU). Raspodjela učestalosti kombinacija genotipova u ispitivanim skupinama i podskupinama prikazana je u Tablici 37.

**Tablica 37.** Raspodjela učestalosti kombinacija genotipova za polimorfizme FV Leiden i FV HR2 te MTHFR C677T i MTHFR A1298C prema spolu, u djece s moždanim udarom (ukupno N=100), arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Kombinacija polimorfizama          | Genotip      | Moždani udar<br>n (%) |               |               |               |                |               | Kontrolna skupina<br>n (%) |               |
|------------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|----------------------------|---------------|
|                                    |              | Arterijski ishemijski |               | Hemoragijski  |               | Ukupno         |               |                            |               |
|                                    |              | M<br>N=48             | Ž<br>N=25     | M<br>N=15     | Ž<br>N=12     | M<br>N=63      | Ž<br>N=37     | M<br>N=63                  | Ž<br>N=37     |
| <b>FV Leiden/<br/>FV HR2</b>       | GG/AA        | 35 (73)               | 16 (64)       | 12 (80)       | 10 (83)       | 47 (75)        | 26 (70)       | 52 (83)                    | 24 (65)       |
|                                    | GG/AG        | 8 (17)                | 4 (16)        | 2 (13)        | 2 (17)        | 10 (15)        | 6 (16)        | 10 (15)                    | 11 (30)       |
|                                    | GG/GG        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | GA/AA        | 2 (4)                 | 3 (12)        | 1 (7)         | 0 (0)         | 3 (5)          | 3 (8)         | 1 (2)                      | 2 (5)         |
|                                    | <b>GA/AG</b> | <b>3 (6)</b>          | <b>2 (8)</b>  | <b>0 (0)</b>  | <b>0 (0)</b>  | <b>3 (5)</b>   | <b>2 (5)</b>  | <b>0 (0)</b>               | <b>0 (0)</b>  |
|                                    | GA/GG        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | AA/AA        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | AA/AG        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | AA/GG        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
| <b>MTHFR<br/>C677T/<br/>A1298C</b> | CC/AA        | 4 (8)                 | 4 (16)        | 2 (13)        | 0 (0)         | 6 (10)         | 4 (11)        | 12 (19)                    | 6 (19)        |
|                                    | CC/AC        | <b>11 (23)*</b>       | 4 (16)        | 2 (13)        | 3 (25)        | 13 (21)        | 7 (19)        | 7 (11)                     | 8 (22)        |
|                                    | CC/CC        | 5 (10)                | 1 (4)         | 1 (7)         | 1 (8)         | 6 (10)         | 2 (5)         | 7 (11)                     | 2 (6)         |
|                                    | CT/AA        | 9 (19)                | 7 (28)        | 3 (20)        | 4 (33)        | 12 (19)        | 11 (30)       | 16 (26)                    | 10 (27)       |
|                                    | <b>CT/AC</b> | <b>12 (25)</b>        | <b>6 (24)</b> | <b>7 (47)</b> | <b>3 (25)</b> | <b>19 (30)</b> | <b>9 (24)</b> | <b>17 (27)</b>             | <b>6 (16)</b> |
|                                    | CT/CC        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | TT/AA        | 7 (16)                | 3 (12)        | 0 (0)         | 1 (8)         | 7 (11)         | 4 (11)        | 4 (6)                      | 4 (11)        |
|                                    | TT/AC        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |
|                                    | TT/CC        | 0 (0)                 | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)         | 0 (0)          | 0 (0)         | 0 (0)                      | 0 (0)         |

n predstavlja broj dječaka ili djevojčica s pojedinom kombinacijom genotipova u pojedinoj skupini; M-dječaci; Ž-djevojčice; \*P=0,045 prema referentnoj kombinaciji genotipova MTHFR CC/AA

Kombinacije genotipova za FV Leiden i FV HR2 bile su podjednako zastupljene u oba spola u djece s MU kao i u kontrolnoj skupini, te u podskupinama prema tipu MU. Što se tiče kombinacije genotipova MTHFR C677T i A1298C, statistički značajna razlika dobivena je u dječaka s AIMU za kombinaciju genotipova CC/AC u odnosu na dječake kontrolne skupine (**P=0,045; OR=4,71; 95% CI=1,08-20,63**). Dvostruki heterozigotni oblik zabilježen je u 7/15 dječaka s HMU, te je učestalost bila približno dvaput veća u odnosu na djevojčice s HMU (3/12), kao i u odnosu na dječake s AIMU (12/48) i dječake iz kontrolne skupine (17/63).

### 5. 13. UČESTALOSTI HAPLOTIPOVA POLIMORFIZAMA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM

Osim određivanja učestalosti pojedinačnih polimorfizama u djece s MU i kontrolnoj skupini određene su i učestalosti dva haplotipa:

- **haplotipa HPA-ACE** - sastavljenog od alela 4 polimorfizma HPA-1, -2, -3 i ACE I/D smještenih na kromosomu 17
- **haplotipa FV-MTHFR** - sastavljenog od alela 4 polimorfizma FV Leiden, FV HR2, MTHFR C677T i MTHFR A1298C smještenih na kromosomu 1.

Učestalosti haplotipova određene su i u podskupinama djece s MU prema tipu MU i uspoređene s učestalostima u kontrolnoj skupini. Raspodjela učestalosti haplotipova HPA-ACE u djece s MU, AIMU, HMU i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 38, a raspodjela haplotipova FV-MTHFR u Tablici 39.

**Tablica 38.** Raspodjela učestalosti haplotipova HPA-ACE u djece s moždanim udarom (N=100), arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Haplotip<br>HPA-ACE   | Moždani<br>udar | Kontrolna<br>skupina | P*    | Moždani udar             |       |              |               |
|-----------------------|-----------------|----------------------|-------|--------------------------|-------|--------------|---------------|
|                       |                 |                      |       | Arterijski<br>ishemijski |       | Hemoragijski |               |
|                       |                 |                      |       | Učestalost               | P*    | Učestalost   | P*            |
| <b>HA1</b> (1a2a3aI)  | 0,198           | 0,268                | /     | 0,221                    | /     | 0,118        | /             |
| <b>HA2</b> (1a2a3aD)  | 0,242           | 0,167                | 0,100 | 0,234                    | 0,290 | 0,314        | <b>0,047*</b> |
| <b>HA3</b> (1a2a3bI)  | 0,150           | 0,107                | 0,160 | 0,142                    | 0,380 | 0,177        | 0,052         |
| <b>HA4</b> (1a2a3bD)  | 0,141           | 0,209                | 0,970 | 0,135                    | 0,570 | 0,114        | 0,280         |
| <b>HA5</b> (1a2b3aI)  | 0,053           | 0,015                | 0,097 | 0,047                    | 0,220 | 0,074        | 0,120         |
| <b>HA6</b> (1a2b3aD)  | 0,042           | 0,027                | 0,270 | 0,049                    | 0,300 | 0,000        | 0,390         |
| <b>HA7</b> (1a2b3bI)  | 0,000           | 0,026                | 1,000 | 0,000                    | 1,000 | 0,000        | 1,000         |
| <b>HA8</b> (1a2b3bD)  | 0,000           | 0,026                | 1,000 | 0,000                    | 1,000 | 0,019        | 1,000         |
| <b>HA9</b> (1b2a3aI)  | 0,056           | 0,034                | 0,590 | 0,057                    | 0,850 | 0,050        | 0,710         |
| <b>HA10</b> (1b2a3aD) | 0,035           | 0,013                | 0,340 | 0,042                    | 0,200 | 0,000        | 0,936         |
| <b>HA11</b> (1b2a3bI) | 0,033           | 0,080                | 0,350 | 0,013                    | 0,098 | 0,099        | 0,084         |
| <b>HA12</b> (1b2a3bD) | 0,051           | 0,007                | 0,092 | 0,059                    | 0,094 | 0,036        | 0,349         |
| <b>HA13</b> (1b2b3aI) | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /             |
| <b>HA14</b> (1b2b3aD) | 0,000           | 0,021                | 1,000 | 0,000                    | /     | 0,000        | /             |
| <b>HA15</b> (1b2b3bI) | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /             |
| <b>HA16</b> (1b2b3bD) | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /             |

redoslijed HA: H-aleli HPA-1.-2.-3, A-alel ACE, \*usporedba s kontrolnom skupinom prema referentnom haplotipu HA1 (sva 4 alela divljeg tipa); **P=0,022** za opću povezanost haplotipova s moždanim udarom

Dokazana je statistički značajna razlika raspodjele učestalosti haplotipova između djece s MU i kontrolne skupine (**P=0,022**). U djece s MU pronađeno je 10, a u kontrolnoj skupini 13 haplotipova HPA-ACE (Tablica 38.). Najzastupljeniji haplotip u djece s MU bio je HA2 (HPA-1a2a3a-ACED) i to u obje podskupine djece prema tipu MU (AIMU i HMU), za razliku od kontrolne skupine u kojoj je najzastupljeniji haplotip bio HA1 (HPA-1a2a3a-ACEI). Statistički značajna razlika u učestalosti haplotipova dobivena je samo za haplotip HA2 (HPA-1a2a3a-ACED) i to između djece s HMU i kontrolne skupine (**P=0,047; OR=4,06; 95% CI=1,03-15,98**).



**Tablica 39.** Raspodjela učestalosti haplotipova FV-MTHFR u djece s moždanim udarom (N=100), arterijskim ishemijskim (N=73) i hemoragijskim moždanim udarom (N=27) te u kontrolnoj skupini (N=100).

| Haplotip<br>FV-MTHFR | Moždani<br>udar | Kontrolna<br>skupina | P*    | Moždani udar             |       |              |       |
|----------------------|-----------------|----------------------|-------|--------------------------|-------|--------------|-------|
|                      |                 |                      |       | Arterijski<br>ishemijski |       | Hemoragijski |       |
|                      |                 |                      |       | Učestalost               | P*    | Učestalost   | P**   |
| <b>FM1</b> (GACA)    | 0,236           | 0,323                | 0,096 | 0,244                    | 0,150 | 0,227        | /     |
| <b>FM2</b> (GACC)    | 0,273           | 0,267                | 0,600 | 0,262                    | 0,550 | 0,329        | 0,260 |
| <b>FM3</b> (GATA)    | 0,351           | 0,290                | /     | 0,338                    | /     | 0,352        | 0,280 |
| <b>FM4</b> (GATC)    | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /     |
| <b>FM5</b> (GGCA)    | 0,056           | 0,060                | 0,580 | 0,056                    | 0,630 | 0,051        | 0,900 |
| <b>FM6</b> (GGCC)    | 0,015           | 0,018                | 0,791 | 0,000                    | 1,000 | 0,023        | 0,680 |
| <b>FM7</b> (GGTA)    | 0,014           | 0,027                | 0,450 | 0,032                    | 0,980 | 0,000        | 1,000 |
| <b>FM8</b> (GGTC)    | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /     |
| <b>FM9</b> (AACA)    | 0,019           | 0,007                | 0,550 | 0,014                    | 0,730 | 0,018        | 0,959 |
| <b>FM10</b> (AACC)   | 0,016           | 0,000                | 0,209 | 0,027                    | 0,071 | 0,000        | /     |
| <b>FM11</b> (AATA)   | 0,000           | 0,008                | 0,663 | 0,000                    | 1,000 | 0,000        | 1,000 |
| <b>FM12</b> (AATC)   | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /     |
| <b>FM13</b> (AGCA)   | 0,005           | 0,000                | 0,842 | 0,008                    | 0,742 | 0,000        | /     |
| <b>FM14</b> (AGCC)   | 0,016           | 0,000                | 0,225 | 0,020                    | 0,161 | 0,000        | /     |
| <b>FM15</b> (AGTA)   | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /     |
| <b>FM16</b> (AGTC)   | 0,000           | 0,000                | /     | 0,000                    | /     | 0,000        | /     |

redosljed FM: F-aleli FV Leiden-FV HR2; M-aleli MTHFR C677T-MTHFR A1298C; \*usporedba s kontrolnom skupinom prema referentnom haplotipu FM3; \*\*usporedba s kontrolnom skupinom prema referentnom haplotipu FM1 (sva 4 alela divljeg tipa); P=0,260 za opću povezanost haplotipova s moždanim udarom

Raspodjela haplotipova nije se statistički značajno razlikovala između djece s MU i kontrolne skupine (P=0,260). Analizom učestalosti haplotipova FV-MTHFR u djece s MU dobiveno je 10, a u kontrolnoj skupini 8 haplotipova (Tablica 39.), od kojih je najčešći bio haplotip FM3 (FV 1691G-FV 4070A-MTHFR 677T-MTHFR 1298A), a u kontrolnoj skupini haplotip FM1 (FV 1691G-FV 4070A-MTHFR 677C-MTHFR 1298A). Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti niti jednog haplotipa između djece s MU i kontrolne skupine, kao ni između djece s AIMU ili HMU i kontrolne skupine.

## 6. RASPRAVA

Iako je MU u djece relativno rijetka bolest u odnosu na odraslu populaciju, povećano zanimanje za utvrđivanjem etioloških čimbenika MU u različitim populacijama rezultiralo je spoznajama o više od 100 utvrđenih nasljednih i stečenih rizičnih čimbenika, koji uključuju srčane bolesti, infekcije, protrombotičke, metaboličke i vaskularne poremećaje (27). Unatoč brojnim istraživanjima etiologija je još uvijek nepoznata u približno 20-30% slučajeva (9, 27, 38, 49, 227, 228). Ovo je istraživanje provedeno kako bi se pokušala dodatno razjasniti etiologija MU u djece ispitivanjem uključenosti i moguće udruženosti dosad utvrđenih kao i nedovoljno istraženih genetičkih rizičnih čimbenika na pojavnost MU u djece.

Za razliku od odraslih, malo je objavljenih epidemioloških i kliničkih podataka o MU u djece u našoj populaciji, pa je u prvom dijelu istraživanja prikazana analiza prikupljenih podataka iz medicinske dokumentacije o dobi, spolu, tipu i anatomske lokalizaciji MU, kliničkim simptomima i utvrđenim rizičnim čimbenicima u djece oboljele od MU u desetogodišnjem razdoblju.

Prema epidemiološkim istraživanjima provedenim u različitim populacijama rizik za nastanak MU nije tijekom djetinjstva jednak u svim dobnim razdobljima. Sva dosadašnja istraživanja ukazuju na najveći rizik u prvoj godini života (23, 34, 36-38, 43, 64, 229), koji se nakon toga postupno smanjuje i prema nekim autorima ponovno povećava u adolescentnoj dobi (34, 35). Analiza prikupljenih podataka o dobi pojave MU u ovom istraživanju ukazala je na dva najrizičnija dobn razdoblja neovisno o tipu MU, i to u prvoj te između pete i desete godine života. Najveći broj slučajeva MU zabilježen je u prvoj godini života, i to u trećini od ukupnog broja djece s HMU te u čak 42% od ukupnog broja slučajeva AIMU. Najmanja pojavnost MU zabilježena je u adolescenata slično kao i u istraživanjima drugih autora (36, 38, 229, 230) i iznosila je samo 12% od ukupnog broja slučajeva, s podjednakim udjelima s obzirom na tip MU (HMU: 11%, AIMU: 12%). Slični rezultati o značajno manjoj pojavnosti IMU u adolescenata u odnosu na preadolescente prikazani su u dva nedavno objavljena multinacionalna istraživanja Golomb i sur. (43) te Mackay i sur. (46) provedenih na velikom broju djece. Prema Golomb i sur. (43) od 1187 djece upisane u multinacionalni registar IPSS samo 15% je bilo adolescenata, dok je prema Mackay i sur. od ukupno 676 djece s AIMU u dječjoj dobi najmanji broj MU (12%) zabilježen u djece starije od 15 godina.

Brojna dosadašnja istraživanja navode češću pojavnost MU u dječaka u odnosu na djevojčice bez obzira na tip MU (9, 23, 34, 43, 49, 64, 231). U ispitivane djece s MU veća

zastupljenost dječaka utvrđena je u različitim populacijama na području Europe: (26, 35, 36, 219, 232-236), Bliskog istoka (237-241), Kine (44, 230, 242), Sjeverne i Južne Amerike (29, 34, 37, 65, 69, 243, 244) te Australije (38), ali su se omjeri dječaka i djevojčica razlikovali i do približno četiri puta i iznosili su od 1,15:1 do 4,0:1 (23). Češća pojavnost MU u dječaka potvrđena je i u međunarodnoj studiji IPSS u kojoj je obrađen dosad najveći broj djece s AIMU iz cijelog svijeta (N=1187), a dobiveni omjer dječaka i djevojčica iznosio je 1,49:1 (43). Samo je u dvije studije zabilježena podjednaka pojavnost MU u dječaka i djevojčica (28, 42). U ovom je kao i u većini drugih istraživanja također utvrđena češća pojavnost MU u dječaka neovisno o tipu i dobi pojave MU, što se slaže s rezultatima naša prethodna dva istraživanja u kojima je bio obrađen manji broj djece (221, 245). Dobiveni omjeri dječaka i djevojčica razlikovali su se za pojedini tip i dob pojave MU, pa je u djece s HMU utvrđen najmanji omjer od 1,25:1, a u djece s DMU najveći omjer od čak 2,8:1. Nadalje, češća pojavnost AIMU u dječaka zabilježena je u svim dobnim skupinama, što se odnosi i na preadolescente (63%), a posebice na adolescente (100%). slično kao i u studiji Golomb i sur. (43) u kojoj je IMU dijagnosticiran u većem broju dječaka u odnosu na djevojčice u preadolescentnoj i u adolescentnoj dobi.

Literaturni podatci o udjelu pojedinog tipa MU u djece navode približno podjednak broj IMU i HMU (29) s neznatno većim udjelom IMU (55%), za razliku od odraslih kod kojih IMU čini čak 80-85% od ukupnog broja slučajeva MU (9, 22). U djece uključene u ovo istraživanje dijagnosticiran je približno tri puta veći broj IMU (73%) u odnosu na HMU (27%). Slični udjel HMU od 28% dobiven je u studijama Aydinli i sur. u turske djece iz Istanbula (246) te Chung i sur. u kineske djece iz Hong Konga (44). U istraživanju Lo i sur. (231) HMU je dijagnosticiran u trećini od ukupno 5178 hospitalizirane djece s MU u SAD-u, dok je u studiji iz Tajvana udjel HMU iznosio čak 60-70% od svih MU (247). Moguća objašnjenja dobivenih razlika najvjerojatnije se mogu pripisati različitim populacijama u kojima su istraživanja provedena, ali i još uvijek relativno malom broju istraživanja u kojima su osim djece s AIMU i/ili SVT bila uključena i djeca s HMU (231).

Dobro je poznato kako se klinički simptomi MU u djece razlikuju ovisno o anatomske lokalizaciji, dobi pojave i uzroku MU (20, 27, 47, 63, 248, 249). Rezultati dosadašnjih istraživanja o anatomske lokalizaciji MU prilično su ujednačeni i ukazuju na mnogo češća jednostrana oštećenja prednje u odnosu na stražnju moždanu cirkulaciju neovisno o dobi pojave MU, koja su najčešće smještena u opskrbnom području srednje moždane arterije (14, 28, 49, 229, 250). Na temelju slikovnih morfoloških pretraga mozga o anatomske lokalizaciji MU u djece uključene u ovo istraživanje može se zaključiti kako značajno prevladavaju

oštećenja u području prednje moždane cirkulacije koja su pronađena u više od 80% svih slučajeva MU i AIMU, te u više od 90% slučajeva PMU. Za razliku od toga stražnja moždana cirkulacija bila je zahvaćena u približno samo 10% djece neovisno o tipu i dobi pojave MU. Dobiveni rezultati slažu se s prethodnim studijama, iako su u njima zabilježeni različiti udjeli oštećenja u području stražnje moždane cirkulacije koji su iznosili između 3,1% i 21,1% (38, 44, 49, 221, 229, 230, 236, 240, 245, 251), dok je dosad najveći udjel od 22% zabilježen u multinacionalnom istraživanju IPSS Mackay i sur. u djece s DMU (46). Nadalje ovo je istraživanje pokazalo mnogobrojnija oštećenja u jednoj hemisferi u 85-95% slučajeva s tim što je u podskupinama prema dobi pojave AIMU pronađena razlika u udjelu zahvaćenosti lijeve i desne hemisfere. Dvaput je više oštećenja lijeve u odnosu na desnu hemisferu pronađeno u PMU što se slaže s rezultatima Golomb i sur. (65) te Lynch i sur. (69), dok je u DMU neznatno veći broj oštećenja bio u desnoj (53%) u odnosu na lijevu hemisferu (47%) slično kao i u studiji Cnossen i sur. (251). Oštećenja su u približno dvije trećine djece (70%) s AIMU bila smještena u opskrbnom području srednje moždane arterije i to podjednako u PMU i u DMU, a dobiveni rezultati podudarni su s prethodno objavljenim rezultatima drugih istraživanja (69, 230, 251).

Prema dosadašnjim spoznajama neki klinički simptomi MU u djece mogu biti jednakomjerno prisutni u HMU i AIMU, kao npr. napadaji koji mogu biti prisutni i do 50% slučajeva (252), ali se u pravilu raspodjela istovjetnih kliničkih simptoma razlikuje ovisno o tipu MU (249). U brojnim se istraživanjima hemipareza navodi kao najčešći klinički simptom AIMU (14, 28, 46, 49, 249, 253-255), koja je u različitim populacijskim studijama bila prisutna u 42-81% slučajeva (13, 38, 49, 69, 230, 241), a u istraživanju Mackay i sur. u 79% slučajeva od 605 djece s AIMU upisane u registar IPSS (46). Za razliku od AIMU glavobolja i povraćanje, se uz smanjeni stupanj svijesti navode kao najčešći klinički simptomi HMU (9, 27, 249, 253, 254, 256). S obzirom na mnogo češća oštećenja prednje moždane cirkulacije u djece s MU u ovom istraživanju, prevladavali su žarišni klinički simptomi koji su povezani sa zahvaćenim područjem oštećenja, pa je najčešće utvrđeni klinički simptom bila hemipareza i to u 50% slučajeva MU. Hemipareza je ujedno bila najčešći simptom u oba tipa MU, ali je bila prisutna u većem broju slučajeva AIMU (55%) u odnosu na HMU (37%). Razlika prema tipu MU zabilježena je s obzirom na lokalizaciju hemipareze pa je desnostrana hemipareza bila češća u djece s AIMU (60%) dok je u djece s HMU hemipareza bila lijevostrana čak u 80% slučajeva. Dobiveni su se rezultati razlikovali u odnosu na istraživanje Aydinli i sur. u kojem su pronađeni podjednaki udjeli lijevostranih i desnostranih hemipareza u djece s HMU i AIMU (246). Glavobolja i povraćanje bili su drugi najčešći simptom u djece s HMU u 22%

slučajeva, dok su napadaji s približno 15% bili jednakomjerno zastupljeni u HMU i AIMU. Napadaji su bili prisutni u četvrtini djece s DMU obuhvaćene ovim istraživanjem i predstavljali su drugi najčešći klinički simptom u DMU, što se slaže i s drugim istraživanjima (13, 230, 241, 246), za razliku od PMU gdje je drugi najčešći simptom bila hipotonija s 20% slučajeva.

Dosadašnje spoznaje ukazuju na različitu zastupljenost brojnih rizičnih čimbenika koji se povezuju s pojavom MU, ovisno o geografskoj rasprostranjenosti i etničkoj populaciji u kojoj je istraživanje provedeno (17, 46). Rizični čimbenici razlikuju se i ovisno o tipu MU, iako su neki od njih istovjetni u HMU i AIMU (64), a prema nedavno provedenoj multinacionalnoj studiji IPSS Mackay i sur. koja pruža dosad najiscrpniji pregled utvrđenih rizičnih čimbenika za nastanak AIMU u djece, pokazana je i razlika ovisno o dobi pojave AIMU (46). Literaturni podatci navode kako su u trenutku nastupa MU rizični čimbenici prisutni u najmanje 50% djece neovisno o tipu MU (22, 64, 227, 257), a prema nekim autorima najmanje jedan rizični čimbenik moguće je utvrditi u približno 75% djece (9, 49, 227, 257). U posljednje vrijeme sve je više dokaza o mogućem postojanju više rizičnih čimbenika koji dodatno povećavaju rizik za pojavu MU (9, 17, 46, 258), te prema nekim studijama mogu biti prisutni i u čak 25% djece s MU (227, 247, 249). U većini djece s MU uključenih u ovo istraživanje pronađen je veći broj različitih dosad utvrđenih rizičnih čimbenika MU od kojih su najčešće bile infekcije, što je slično rezultatima drugih studija (14, 64, 219, 227, 228, 246, 258, 259). U 13% djece pronađeni su višestruki rizični čimbenici, s podjednakim učestalostima u ispitivanim podskupinama prema tipu i dobi pojave MU koje su iznosile između 11% i 14%. Niti jedan rizični čimbenik nije utvrđen u 22% djece s MU, što se slaže s našim prethodnim istraživanjima (221, 245) i s objavljenim podacima drugih autora koji su iznosili između 14,5% i 48% slučajeva (13, 24, 38, 219, 230, 246). Raspodjela učestalosti djece u kojih nisu utvrđeni rizični čimbenici razlikovala se s obzirom na tip i dob pojave MU, pa je najmanja učestalost od 13% zabilježena u djece s DMU, a najveća od čak 37% u djece s HMU. Prema nedavno objavljenoj multinacionalnoj studiji IPSS od 492 djece s DMU niti jedan rizični čimbenik nije utvrđen u samo 52 djece (11%) (46). Za razliku od IMU, dostupni literaturni podatci o rizičnim čimbenicima za nastanak HMU izrazito su oskudni i dosad još nisu sustavno analizirani (260). Prema navodima nekih autora abnormalnosti moždanih krvnih žila prisutne su u 20-90% slučajeva (27, 261, 262) i predstavljaju najčešći rizični čimbenik HMU, što je utvrđeno i u ovom istraživanju u kojem su abnormalnosti moždanih krvnih žila pronađene u trećini djece oboljele od HMU.

Povećani rizik za nastanak tromboze i kliničkih ishemijskih događaja povezuje se s protrombotičkim polimorfizmima u više različitih gena za koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike, koji narušavaju fiziološku ravnotežu između protrombotičkih i antitrombotičkih čimbenika hemostatskog sustava i pomiču ravnotežu u smjeru tromboze. Dokazano je kako protrombotički polimorfizmi izravno utječu na funkciju proteina kojeg kodiraju pojačanom sintezom ili pojačanim djelovanjem prokoagulacijskih čimbenika (fibrinogena, FII, FV i FXIII) ili inhibitora fibrinolize (PAI-1), što rezultira pojačanim stvaranjem trombina i bržim nastajanjem fibrinskog ugruška uz smanjenu fibrinolitičku aktivnost (68, 263). Protrombotičkom stanju doprinose i polimorfizmi u trombocitnim GP receptorima koji uzrokuju pojačanu aktivaciju i agregaciju trombocita, kao i polimorfizmi u genima za metabolizam Hcy koji rezultiraju hiperhomocisteinemijom i posljedičnim oštećenjem endotelnih stanica (263).

Zbog pretpostavke o većoj ulozi genskih čimbenika na rizik pojave MU u mlađoj životnoj dobi bilježi se i povećano zanimanje za ispitivanjem doprinosa nasljednih protrombotičkih čimbenika na pojavu MU u djece (69). U posljednjih desetak godina moguća povezanost različitih nasljednih i stečenih protrombotičkih rizičnih čimbenika s pojavom MU u djece ispitivana je u većem broju populacijskih istraživanja (10, 38, 49, 227, 233, 237, 257, 264-268), a prema nedavno objavljenoj studiji IPSS Mackay i sur. najveća je zastupljenost protrombotičkih rizičnih čimbenika od čak 38% zabilježena u Europi, za razliku od Azije, Australije, Kanade i Južne Amerike gdje su učestalosti iznosile 0-8% (46).

Najčešći nasljedni protrombotički rizični čimbenici koji se povezuju s MU u djece su polimorfizmi u genima za koagulacijske čimbenike II (FII G20210A) i V (FV Leiden) te za metabolizam homocisteina (MTHFR C677T) (10, 49, 69, 228, 267). Vrlo malo je literaturnih podataka o mogućem utjecaju drugih protrombotičkih polimorfizama u genima uključenim u hemostatski sustav koji kodiraju koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike (FV HR2,  $\beta$ -FBG - 455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), trombocitne GP receptore (HPA-1) i metabolizam homocisteina (MTHFR A1298C) (10,49). Nadalje, dobiveni rezultati prethodnih istraživanja ukazuju na razlike u raspodjeli gena kandidata za nastanak MU u pojedinim populacijama, ali i na razlike ovisno o tipu i dobi pojave MU (10, 49, 69).

Rezultati našeg prethodnog istraživanja o povezanosti polimorfizama FV Leiden, FII G20210A, MTHFR C677T i 4 najčešća trombocitna aloantigena (HPA-1, -2, -3 i -5) s pojavom MU u djece utvrdili su povezanost FV Leiden i alela HPA-3b s AIMU (221). Uključivanjem većeg broja djece u ovom su istraživanju osim prethodno navedenih polimorfizama, ispitani i analizirani i dodatni funkcionalni polimorfizmi u genima za

koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike (FV HR2,  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), metabolizam homocisteina (MTHFR A1298C) i intermedijarne rizične čimbenike (ACE I/D i apoE  $\epsilon$ 2-4), ukupno njih 14 u 12 gena. Dosad je višestruki broj polimorfizama u genima uključenim u hemostatski sustav i metabolizam homocisteina ispitan samo u tri studije i to 9 polimorfizama u 7 gena kandidata u 90 grčke djece s AIMU (219), 16 polimorfizama u 7 gena kandidata u 58 indijske djece s nekardioembolijskim AIMU (218) i 10 od ukupno ispitanih 31 polimorfizama, u 8 gena kandidata u 35 kalifornijske novorođenčadi s PMU (220).

Zbog izravnog sudjelovanja u prokoagulacijskom i antikoagulacijskom mehanizmu zgrušavanja krvi FV je iznimno važan protein za održavanje hemostatske ravnoteže (88). Dokazano je kako polimorfizmi FV Leiden i FV HR2 uzrokuju rezistenciju na antikoagulacijsko djelovanje APC-a i usporenu inaktivaciju kofaktorskog proteina protrombinaznog kompleksa FVa. Stoga se FVa duže zadržava u cirkulaciji te podržava pojačanu aktivnost protrombinaznog kompleksa i neprekidno pojačano stvaranje trombina. FV Leiden rezultira usporenom inaktivacijom FVa za 10-20 puta i smanjenim antikoagulacijskim djelovanjem FV u inaktivaciji FVIIIa (98), dok polimorfizam FV HR2 dovodi do promjene uobičajenog omjera izoformi FV<sub>1</sub> i FV<sub>2</sub>, zbog relativnog porasta glikoziliraniye i trombogenije izoforme FV<sub>1</sub> (106). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da od ispitivanih polimorfizama jedino prisutnost FV Leiden povećava rizik za nastanak MU u djece neovisno o tipu MU i to za 4 puta. Povezanost je bila još izraženija u djece s AIMU, a posebice s PMU, te se dobiveni rezultati podudaraju s brojnim istraživanjima u različitim populacijama djece s AIMU (69, 219, 221, 233, 235, 237, 241, 256, 257, 269-271) i s PMU (219, 221, 234, 272-276). Ipak, povezanost FV Leiden s AIMU i PMU nije dokazana u manjem broju populacijskih studija iz Velike Britanije i Škotske (232, 276), Portugala (258), Argentine (244) i Indije (218), te u kalifornijske (220) i estonijske novorođenčadi (277). Utjecaj FV Leiden na pojavu IMU u djece analiziran je i u 3 meta-analize u kojima su dobiveni proturječni rezultati (278-280). Iako u prvoj objavljenj meta-analizi Haywood i sur. 2005. godine (278) nije dokazana statistički značajna povezanost FV Leiden s DMU, dvije nedavno objavljene meta-analize ukazale su da prisutnost FV Leiden podjednako povećava rizik za pojavu AIMU (279) i PMU (280), za približno 3 puta. Nepodudarnost dobivenih rezultata meta-analiza vjerojatno se može objasniti manjim brojem studija i djece analiziranih u meta-analizi Haywood i sur. (278, 281). Za razliku od mnogobrojnih ispitivanja utjecaja FV Leiden na pojavu MU u djece, polimorfizam FV HR2 dosad je ispitan samo u dvije studije (218, 219) koje nisu pokazale povezanost polimorfizma s AIMU, a neočekivano su u

kontrolnim skupinama pronađene veće učestalosti polimorfnog alela FV HR2 4070G u odnosu na skupine djece s MU. U ovom istraživanju također nije dokazana statistički značajna povezanost FV HR2 niti s jednim tipom MU, ali su za razliku od prethodnih studija dobivene učestalosti polimorfnog alela FV HR2 4070G bile podjednake ili malo više u djece s MU u odnosu na kontrolnu skupinu, osim u djece s HMU.

Utvrđeno je kako polimorfizam FII G20210A izaziva pojačani izražaj gena za protrombin što rezultira hiperprotrombinemijom i posljedičnim značajnim porastom stvaranja trombina (82). Ovo ispitivanje nije ukazalo na povezanost polimorfizma FII G20210A s MU u djece u hrvatskoj populaciji, neovisno o tipu i dobi pojave MU. Rezultati potvrđuju naše prethodno dobivene rezultate (221) kao i rezultate većine dosadašnjih studija i meta-analize Haywood i sur. (278) u kojima FII G20210A nije utvrđen kao rizični čimbenik za pojavu DMU (219, 232, 237, 239, 241, 256), niti PMU (220, 234, 273-275, 277). Unatoč tome povezanost FII G20210A s AIMU ipak je dokazana u manjem broju istraživanja u turske (270), njemačke (257) i portugalske (258) djece, kao i u meta-analizama Kenet i sur. (279) i Renaud i sur. (280) u kojima je FII G20210A utvrđen kao blagi rizični čimbenik za pojavu IMU i PMU.

Literaturni podatci o mogućoj ulozi drugih polimorfizama u genima za koagulacijske i fibrinolitičke čimbenike u etiologiji MU u dječjoj populaciji iznimno su rijetki i ograničeni su na samo šest studija u kojima su analizirana tri polimorfizma:  $\beta$ -FBG -455G>A (218-220), FXIII-A Val34Leu (219, 282) i PAI-1 4G/5G (220, 271, 283). Postoje čvrsti dokazi o snažnoj povezanosti povišenih koncentracija fibrinogena, tromboze i kardiovaskularnih bolesti. Osim neosporne činjenice da povišene koncentracije fibrinogena same po sebi utječu na strukturu fibrinskog ugruška, fibrinogen ima značajnu ulogu u nastajanju tromboze sudjelovanjem u važnim hemostatskim procesima kao prethodnik fibrina, medijator agregacije trombocita i važan čimbenik koji značajno utječe na viskoznost plazme (68, 76, 77). Polimorfizam  $\beta$ -FBG -455G>A odgovoran je za pojačanu sintezu genskog produkta što u nosioca polimorfnog alela rezultira hiperfibrinogenemijom (78, 79).

Važnost FXIII u održavanju normalnoga hemostatskog odgovora postala je jasna otkrivanjem ključne uloge FXIII kao regulatora fibrinolize i mehaničke čvrstoće ugruška. FXIII učvršćuje fibrinske polimere i štiti fibrinski ugrušak od prebrze fibrinolitičke razgradnje (117). Polimorfizam FXIII-A Val34Leu koji se nalazi u neposrednoj blizini aktivacijskog mjesta djelovanja trombina, uzrokuje brže otcjepljivanje aktivacijskog peptida i aktivaciju FXIII trombinom što rezultira ubrzanim umreženjem fibrina i većim stupnjem ugradnje inhibitora plazmina u fibrin (119). Fibrinolitički proces regulira i PAI-1 koji je uz inhibitor



plazmina glavni inhibitor fibrinolitičkog sustava. Polimorfizam PAI-1 4G/5G rezultira povišenom plazmatskom koncentracijom PAI-1 u homozigota za alel 4G. Povišene koncentracije PAI-1 mogu narušiti normalan fibrinolitički proces uklanjanja fibrina, čime potiču povećano odlaganje fibrina i posljedično trombotičke događaje zbog smanjene fibrinolitičke aktivnosti (121).

U prethodnim studijama u kojima su ispitivani polimorfizmi  $\beta$ -FBG -455G>A, FXIII-A Val34Leu i PAI-1 4G/5G nije dokazana povezanost niti jednog od ispitanih polimorfizama s AIMU, DMU ili PMU (218-220, 271, 282, 283). Rezultati našeg istraživanja samo se djelomično slažu s prethodno objavljenim rezultatima, pa tako za polimorfizme  $\beta$ -FBG -455G>A i PAI-1 4G/5G nije dokazana povezanost s MU, neovisno o tipu i dobi pojave MU. Za razliku od studija provedenih u grčke djece s AIMU (219) i turske djece s DMU (282) u kojima je dosad ispitivan polimorfizam FXIII-A Val34Leu, pronađena je veća učestalost alela FXIII-A Leu34, te genotipova Val/Leu i Leu/Leu u djece s MU i u podskupinama prema tipu MU u odnosu na kontrolnu skupinu. Unatoč tome, statistički značajna razlika dobivena je samo u nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 u djece s DMU, za koje je utvrđen dvostruko veći rizik za pojavu DMU. Iako je ovo prvo istraživanje u dječjoj populaciji u kojem je polimorfizam FXIII-A Val34Leu utvrđen kao blagi neovisni rizični čimbenik za pojavu MU, u ovom trenutku nije u potpunosti jasno predstavlja li on novi, dosad neutvrđeni rizični čimbenik, ili je karakterističan samo za našu populaciju, pa na temelju naših rezultata smatramo kako bi ga bilo poželjno uključiti u istraživanja i u drugim populacijama djece s MU.

Od polimorfizama koji sudjeluju u metabolizmu Hcy najčešće je ispitivan utjecaj polimorfizma MTHFR C677T na pojavu MU u djece, dok je ispitivanje drugog polimorfizma A1298C u istom genu, kao i oba polimorfizma istovremeno, provedeno samo u nekoliko istraživanja (218, 219, 284-286). Polimorfizmi MTHFR C677T i A1298C rezultiraju sintezom enzima MTHFR sa sniženom ukupnom aktivnosti i do 50%, koja dovodi do porasta Hcy posebice u nedostatku folata (129-131). Hiperhomocisteinemija dovodi do oksidativnog oštećenja endotelnih stanica krvnih žila i promjene koagulacijskih svojstava krvi. Na taj način se zbog smanjenog stvaranja dušičnog oksida i prostaciklina, fiziološka antitrombotička priroda endotela krvnih žila pretvara u trombogeniji fenotip (287, 288).

Za polimorfizam MTHFR C677T koji je jedan od najčešće ispitivanih nasljednih rizičnih čimbenika u djece s MU, dobiveni su proturječni rezultati. Iako su u nekim studijama pronađene dvaput veće učestalosti homozigota (genotipa MTHFR 677TT) u djece s AIMU u usporedbi s učestalostima u općoj populaciji (69, 285, 289, 290), povezanost je dokazana

samo u njemačke (257) i u poljske djece s AIMU (236), te u indijske djece s nekardiogenim DMU (218). I u ovom su istraživanju dobivene približno dvaput veće učestalosti homozigota u djece s AIMU i DMU u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije dokazana povezanost genotipa MTHFR C677TT s MU u našoj populaciji slično kao ni u našem prethodnom istraživanju (221). Dobiveni rezultati slažu se s većim brojem studija u kojima nije dokazan povećan rizik za DMU (219, 232, 237, 241, 269, 270, 258, 284, 291, 292) ni za PMU (220, 234, 237). Unatoč proturječnim i brojnim negativnim rezultatima o povezanosti homozigota s MU u djece, ipak je genotip MTHFR 677TT utvrđen kao blagi rizični čimbenik u sve tri dosad objavljene meta-analize (278, 279, 293). Proturječni rezultati dobiveni su i za povezanost polimorfizma MTHFR A1298C s MU u djece. Od studija u kojima je ispitivan ovaj polimorfizam, povezanost je dokazana u studijama Rook i sur. (285) u kojoj je pronađena dosad najveća učestalost genotipa MTHFR 1298CC od 25%, te Biswas i sur. (218). U ovom istraživanju nije dokazana povezanost ovog polimorfizma s MU u djece neovisno o tipu i dobi pojave, slično kao i u studijama Komitopolou i sur. (219), Morita i sur. (284) te Akar i sur. (286).

Relativno je malo studija i rezultata istraživanja koji su uzeli u obzir standardne rizične čimbenike ateroskleroze povezane s nastankom MU u odraslih kao što su sistemska hipertenzija, poremećaj metabolizma lipida i šećerna bolest (10, 46, 49). Jedna od takvih je nedavno objavljena multinacionalna studija IPSS Mackay i sur. (46) u kojoj su očekivano ovi rizični čimbenici bili rijetko zastupljeni i prisutni u 2% djece s AIMU (12/676, od toga 9 djece s hipertenzijom). Iako se šećerna bolest rijetko povezuje s vaskularnom bolešću u djece, izgleda da postoji povezanost između hipertenzije te poremećaja metabolizma lipida i vaskularopatije (10, 49). Unatoč ovim spoznajama, od polimorfizama koji su ispitivani u ovom istraživanju najmanji se broj objavljenih literaturnih podataka u dječjoj populaciji odnosi na polimorfizme intemedijarnih rizičnih čimbenika. Tako dosad nije objavljena niti jedna studija o utjecaju polimorfizma ACE I/D na rizik pojave MU u djece, dok je utjecaj polimorfizma apoE ε2-4 ispitivan samo u jednoj studiji (294).

Pokazano je kako ACE ima ulogu u aktivaciji i agregaciji trombocita i smanjenoj fibrinolitičkoj aktivnosti što teoretski povećava rizik za trombotički događaj (295). Polimorfizam ACE I/D povezan je sa stupnjem aktivnosti ACE i odgovoran je za približno 50% interindividualnih razlika aktivnosti ACE u plazmi i u tkivu, pa homozigoti za alel D imaju otprilike dvostruko višu aktivnost ACE u odnosu na homozigote za alel I (134). ApoE je utvrđeni genetski biljeg dislipidemije i ateroskleroze s iznimno važnom ulogom u

metabolizmu lipida. Dokazano je kako nosioci alela  $\epsilon 4$  imaju više koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola te niže koncentracije HDL-kolesterola bez obzira na spol (148, 151, 154).

Analiza naših rezultata za polimorfizam ACE I/D ukazala je na veće, ali ne i statistički značajne razlike u učestalostima heterozigota u djece s MU (56%), AIMU (60,3%) i PMU (68,6%) u odnosu na kontrolnu skupinu (44%). Također je utvrđen dvaput veći rizik za pojavu AIMU (OR=2,08; 95% CI=0,97-4,45) u nosioca najmanje jednog alela D, ali vjerojatno zbog malog broja ispitanika nije dobivena statistički značajna povezanost, pa bi bilo poželjno provesti ispitivanje ovog polimorfizma na većem broju ispitanika. Nije dokazana niti povezanost polimorfizma apoE  $\epsilon 2-4$  s MU, neovisno o tipu i dobi pojave MU, slično kao i u ispitivanju Balcerzyk i sur. (294).

Četiri su najčešća aloepitopa HPA (HPA-1, -2, -3 i -5) smještena na najvažnijim trombocitnim GP kompleksima GPIb/IX/V, GPIa/IIa i GPIIb/IIIa, koji su uključeni u sve faze stvaranja ugruška te su nužni za adheziju trombocita na komponente subendotelnog izvanstaničnog matriksa i za međudjelovanje između trombocita koje rezultira agregacijom trombocita (68). Dokazan je utjecaj nekih od aloepitopa HPA na funkcijske osobine trombocita što rezultira pojačanom aktivacijom i agregacijom trombocita različitim agonistima zbog nižeg aktivacijskog praga (HPA-1), čvršćim vezanjem za VWF (HPA-2) ili kolagen (HPA-5) (178, 180-182, 189, 191).

Mali je broj istraživanja u kojima je ispitivan mogući utjecaj pojedinih aloepitopa HPA na pojavu MU u djece. U tri od četiri objavljene studije ispitivanje je bilo ograničeno samo na HPA-1 (218-221), a povezanost HPA-1 s AIMU dokazana je samo u studiji Biswas i sur. (218). Iako je u ovom istraživanju pronađena triput veća učestalost genotipa HPA-1b/b u djece s MU, AIMU i PMU te četiri puta veća učestalost ovog genotipa u djece s DMU u odnosu na kontrolnu skupinu, nije dokazana statistički značajna povezanost polimorfizma HPA-1 s MU neovisno o tipu i dobi pojave, slično kao i u našem prethodnom istraživanju (221). Povezanost s MU nije dokazana niti za polimorfizme HPA-2 i -5, dok su rezultati dobiveni za HPA-3 ukazali na blagi zaštitni učinak alela HPA-3b u AIMU, što potvrđuje naše prethodno dobivene rezultate (221). Ipak je za donošenje zaključaka o utvrđenoj zaštitnoj ulozi alela HPA-3b u djece s AIMU potreban veći broj ispitanika i mogućnost usporedbe sa studijama drugih populacija.

U dosadašnjim istraživanjima nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika u djece s MU uglavnom je analiziran utjecaj pojedinačnih polimorfizama na rizik pojave MU u različitim populacijama. Kako je MU u djece složeni poremećaj s višestrukim rizičnim čimbenicima, unatoč dokazima o povećanim učestalostima nasljednih protrombotičkih

rizičnih čimbenika, pojedinačni polimorfizmi kao blagi rizični čimbenici, vjerojatno ne mogu u potpunosti objasniti pojavu MU u djece (14, 281). Dosadašnji, iako relativno oskudni literaturni podatci, ukazuju na istovremenu prisutnost dva ili više nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika u određenom broju djece koji mnogostruko povećavaju rizik pojave MU (218, 237, 257, 278, 286, 296), što je potvrđeno i u meta-analizi Kenet i sur. (279). Od opisanih kombinacija polimorfizama povezanih s pojavom MU najčešće su kombinacije FV Leiden s manjkom PC (233), povišenom koncentracijom Lp (a) i genotipom MTHFR 677TT (257) ili s polimorfizmom MTHFR A1298C (286), te interakcije između polimorfizama HPA-1 i MTHFR C677T (218). Ovo je dosad prvo istraživanje u kojem je za kombinaciju polimorfizama FV Leiden i FV HR2 dobivena statistički značajna razlika za AIMU i DMU, iako nije bilo moguće utvrditi i stupanj povezanosti (OR) jer u kontrolnoj skupini nije pronađen niti jedan slučaj dvostrukoga heterozigotnog oblika. Za kombinaciju genotipova GA (FV Leiden) i AA (divlji tip FV HR2) utvrđen je 5,51 puta povećan rizik za PMU, ali je rizik bio manji od rizika utvrđenog samo za genotip GA (FV Leiden). Dobiveni rezultati razlikovali su se od studije Komitopolou i sur. (219) u kojoj nije pronađen niti jedan slučaj dvostrukoga heterozigotnog oblika ni u djece s AIMU niti u kontrolnoj skupini, ali je za kombinaciju genotipova GA (FV Leiden) i AA (divlji tip FV HR2) utvrđen 5,76 puta veći rizik za pojavu AIMU, s tim što je dobiveni rizik, za razliku od našeg istraživanja, bio veći od rizika utvrđenog za genotip GA (FV Leiden). Rezultati Komitopolou i sur. (219) su neočekivani s obzirom da se očekuje veći utjecaj prisutnosti kombinacije dva protrombotička polimorfizma u istom genu, što je i dokazano u dosadašnjim istraživanjima u odraslih s venskom trombozom, kod kojih je dokazan 3 puta veći rizik u dvostrukih heterozigota u odnosu na utvrđeni rizik samo za prisutnost FV Leiden (106, 113, 297).

Literaturni podatci navode kako je smanjena aktivnost MTHFR izraženija u slučaju istodobne pojave polimorfizama MTHFR C677T i MTHFR A1298C, kao i utjecaj na porast koncentracije Hcy u odnosu na utjecaj kod prisutnosti samo jednog polimorfizma, pa dvostruki heterozigoti imaju značajno više koncentracije Hcy u odnosu na heterozigote za samo jedan polimorfizam (130, 131, 219). U sve tri dosadašnje studije (218, 219, 284) u kojima je ispitivan mogući utjecaj kombinacije polimorfizama MTHFR C677T i MTHFR A1298C na pojavu AIMU u djece, nije dokazana statistički značajna povezanost niti jedne kombinacije genotipova s MU. Slični rezultati dobiveni su i za našu populaciju, iako su u djece s MU i u svim ispitivanim podskupinama prema tipu i dobi pojave MU dobivene manje učestalosti kombinacije genotipova 677CC/1298AA (oba divlja tipa), te povećane učestalosti dvostrukih heterozigota u odnosu na kontrolnu skupinu, osim u DMU.

Nakon provedene analize moguće povezanosti haplotipova HPA-ACE i FV-MTHFR s MU u djece, samo je u nosioca haplotipa HA2 (HPA-1a2a3a-ACED) utvrđen četiri puta veći rizik za pojavu HMU, koji je ujedno predstavljao jedini utvrđeni nasljedni rizični čimbenik za HMU u ovom istraživanju.

Uzroci češće pojavnosti MU u dječaka koja je potvrđena i u ovom istraživanju, nisu još uvijek u potpunosti razjašnjeni. Veći broj ozljeda glave i vrata u dječaka kao posljedica sportskih i ostalih tjelesnih aktivnosti smatrali su se jednim od mogućih uzroka spolne razlike u pojavnosti MU, ali ni nakon isključivanja takvih slučajeva nije uočena značajna promjena u pojavnosti MU u dječaka (43, 49). Pretpostavka o mogućoj ulozi hormonskih razlika koja se temelji na prije svega dobro poznatim činjenicama o višim koncentracijama estrogena u adolescentnoj dobi u djevojčica (23, 49), ali i mogućem utjecaju koncentracije endogenog testosterona (294) samo je djelomično objasnila dokazanu spolnu razliku u pojavnosti MU u djece. Iako Sofronas i sur. (49) navode kao mogući uzrok gensku sklonost, prema dostupnoj literaturi samo je u studiji Zak i sur. (236) ispitan utjecaj nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika na pojavnost MU ovisno o spolu, te je utvrđen 2,53 puta veći rizik za pojavu DMU u dječaka nosioca najmanje jednog alela MTHFR 677T. Spoznaje o dosad još uvijek nerazjašnjenom češćem pojavnosti MU u dječaka, a s obzirom da su djeca uključena u ovo istraživanje bila podudarna po dobi i spolu, potakle su nas na ispitivanje mogućeg utjecaja pojedinačnih ili kombinacije polimorfizama na pojavnost MU ovisno o spolu. Analiza raspodjele genotipova i alela pojedinačnih polimorfizama između dječaka i djevojčica u djece s MU i u kontrolnoj skupini ukazala je na statistički značajnu razliku samo u djece s MU. Stoga je provedena i dodatna analiza raspodjela genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u podskupinama djece s MU prema spolu (zasebno za dječake i djevojčice) usporedbom sa spolno-specifičnim kontrolnim skupinama, koja je ukazala na povezanost spolno-specifičnih polimorfizama s pojavom AIMU. Dobiveni rezultati nisu potvrdili rezultate Zak i sur. (236), ali je dokazan blago povećani rizik za pojavu AIMU u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 te umjereno povećani rizik za kombinaciju genotipova MTHFR 677CC/1298AC, dok je u djevojčica umjereno povećan rizik utvrđen za polimorfizam apoE ε2-4, koji je bio još izraženiji za FV Leiden. Povezanost spolno-specifičnih polimorfizama pronađena je i u podskupinama prema dobi pojave MU. Tako je utvrđena izrazito jaka povezanost između FV Leiden i PMU, koja je bila podjednako izražena u oba spola (dječaci: OR=10,94; 95% CI=1,07-112,00; djevojčice: OR=13,80; 95% CI=1,72-110,52), dok je značajna zaštitna uloga alela HPA-3b utvrđena samo u djevojčica. Umjereno povećani rizik za pojavu DMU utvrđen je u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 i u

djevojčica nosioca najmanje jednog alela apoE  $\epsilon$ 4. Iako povezanost spolno-specifičnih polimorfizama s DMU nije bila toliko izražena, dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj potpuno različitih polimorfizama na pojavu DMU od onih utvrđenih za PMU.

Na temelju dobivenih i obrađenih rezultata ispitivanih polimorfizama u ovom istraživanju može se zaključiti kako pojedinačni polimorfizmi nemaju značajnu ulogu u etiologiji HMU u djece, dok samo haplotip HPA-ACE predstavlja umjereno povećani rizik. Za razliku od HMU, dokazan je utjecaj 4 pojedinačna polimorfizama (FV Leiden, FXIII-A Val34Leu, HPA-3 i apoE  $\epsilon$ 2-4) i dvostrukoga heterozigotnog oblika za kombinaciju polimorfizama FV Leiden i FV HR2 na pojavu AIMU. Od dosad utvrđenih nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika u našoj je populaciji dokazana samo povezanost prisutnosti FV Leiden s pojavom AIMU, ali je utvrđena povezanost alela FXIII-A Leu34 i zaštitna uloga alela HPA-3b neovisno o spolu, te FXIII-A Val34Leu i kombinacija genotipova MTHFR 677CC/1298AC u dječaka kao i alela apoE  $\epsilon$ 4 u djevojčica. Rezultati istraživanja ukazali su i na razliku u utvrđenim nasljednim protrombotičkim rizičnim čimbenicima za PMU (jaka povezanost FV Leiden neovisno o spolu i zaštitna uloga alela HPA-3b u djevojčica) i DMU (zaštitna uloga alela HPA-3b neovisno o spolu, alela FXIII-A Leu34 u dječaka, te alela apoE  $\epsilon$ 4 u djevojčica).

U zaključku ovo je istraživanje ukazalo na povezanost pojedinih dosad nedovoljno istraženih pojedinačnih i kombinacija polimorfizama s etiologijom MU u djece u Hrvatskoj, te predstavlja prvo istraživanje u kojem je utvrđen utjecaj različitih polimorfizama na pojavu MU u djece ovisno o spolu, što upotpunjuje i proširuje dosadašnje spoznaje o utjecaju nasljednih protrombotičkih rizičnih čimbenika i upućuje na daljnja istraživanja i u drugim populacijama.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Utvrđena je češća pojavnost MU u dječaka i u svim ispitivanim podskupinama prema tipu i dobi pojave MU, s tim što je razlika bila statistički značajna u djece s MU, AIMU i DMU. Najveći omjer dječaka u odnosu na djevojčice nađen je u DMU, dok je najmanji omjer nađen u HMU.
2. Najveći rizik za nastanak MU utvrđen je u djece mlađe od jedne godine bez obzira na spol, a najmanji rizik u adolescentnoj dobi podjednako za dječake i djevojčice. Dva su dobna razdoblja utvrđena kao najrizičnija za nastanak MU u djece, i to u prvoj godini života te između 5. i 10. godine života.
3. Zabilježen je 2,7 puta veći broj arterijskih ishemijskih u odnosu na hemoragijske MU.
4. Rezultati genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s MU ukazali su na:
  - a) prisutnost FV Leiden kao jedinog utvrđenoga rizičnog čimbenika za nastanak MU u djece,
  - b) statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova i alela između dječaka i djevojčica s MU samo za FXIII-A Val34Leu,
  - c) statistički značajnu razliku u raspodjeli (učestalosti) genotipova između dječaka s MU i dječaka kontrolne skupine za polimorfizme FXIII-A Val34Leu i HPA-3, dok između djevojčica s MU i djevojčica kontrolne skupine nije pronađena statistički značajna razlika niti za jedan ispitani polimorfizam,
  - d) povećan rizik za nastanak MU u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 u odnosu na dječake s genotipom FXIII-A Val34Val.
5. Rezultati genotipizacije pojedinačnih polimorfizama u djece s MU prema tipu MU ukazali su na:
  - a) statistički značajnu povezanost polimorfizama FV Leiden i HPA-3 s AIMU,
  - b) povećan rizik za nastanak AIMU u djece nosioca FV Leiden te smanjeni rizik u nosioca najmanje 1 alela HPA-3b,
  - c) statistički značajnu povezanost polimorfizma FXIII-A Val34Leu s AIMU u dječaka te apoE ε2-4 i FV Leiden u djevojčica,

- d) povećan rizik za nastanak AIMU u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 i u djevojčica koje su nosioci FV Leiden ili najmanje jednog alela apoE  $\epsilon$ 4.
6. Rezultati genotipizacije pojedinačnih polimorfizama s MU u djece prema dobi pojave MU ukazali su na:
- a) izrazito povećan rizik za nastanak PMU u nosioca FV Leiden i smanjeni rizik u nosioca najmanje jednog alela HPA-3b,
  - b) jaku povezanost između FV Leiden i PMU bez obzira na spol,
  - c) povećan rizik za nastanak DMU u nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34,
  - d) povećan rizik za nastanak DMU u dječaka nosioca najmanje jednog alela FXIII-A Leu34 i u djevojčica nosioca najmanje jednog alela apoE  $\epsilon$ 4,
  - e) smanjeni rizik za nastanak DMU u djevojčica nosioca najmanje jednog alela HPA-3b.
7. Utvrđena je statistički značajna učestalost dvostrukoga heterozigotnog oblika kombinacije polimorfizama FV Leiden i FV HR2 (GA/AG) u djece s AIMU i DMU, u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj nije dokazan niti jedan slučaj s ovom kombinacijom.
8. Dobivena statistički značajna razlika u učestalosti kombinacije genotipova FV Leiden i FV HR2 GA/AA u djece s PMU povećava rizik za nastanak PMU za 5,51 puta.
9. Dobivena statistički značajna razlika u učestalosti kombinacije genotipova MTHFR C677T i MTHFR A1298C CC/AC u dječaka s AIMU u odnosu na dječake iz kontrolne skupine povećava rizik za nastanak AIMU za 4,71 puta.
10. Dobivena statistički značajna razlika u učestalosti haplotipa HA2 (HPA-1a2a3a-ACED) između djece s HMU i kontrolne skupine povećava rizik za nastanak HMU za 4,06 puta.



## POPIS LITERATURE

1. Fullerton HJ, Chetkovich DM, Wu YW, Smith WS, Johnston SC. Deaths from stroke in US children, 1979 to 1998. *Neurology* 2002; 59: 34-9.
2. Lynch JK, Hirtz DG, deVeber G, Nelson KB. Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop on perinatal and childhood stroke. *Pediatrics* 2002; 109: 116-23.
3. deVeber GA, MacGregor D, Curtis R, Mayank S. Neurologic outcome in survivors of childhood arterial ischemic stroke and sinovenous thrombosis. *J Child Neurol* 2000; 15: 316-24.
4. Ganesan V, Hogan A, Shack N, Gordon A, Isaacs E, Kirkham FJ. Outcome after ischaemic stroke in childhood. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42: 455-61.
5. Steinlin J, Roellin K, Schroth G. Long-term follow-up after stroke in childhood. *Eur J Pediatr* 2004; 163: 245-50.
6. Fullerton HJ, Wu YW, Sidney S, Johnston SC. Risk of recurrent childhood arterial ischemic stroke in a population-based cohort. The importance of cerebrovascular imaging *Paediatrics* 2007; 119: 495-501.
7. Mallick AA, Ganesan V, O'Callaghan FJ. Mortality from childhood stroke in England and Wales, 1921–2000. *Arch Dis Child* 2010; 95: 12-9.
8. WHO MONICA Project, Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41: 105-14.
9. Roach ES, Golomb MR, Adams R, Biller J, Daniels S, deVeber G, Ferriero D, Jones BV, Kirkham FJ, Scott RM, Smith ER; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Disease in the Young. 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.
10. Kirkham FJ. Is there a genetic basis for pediatric stroke? *Curr Opin Pediatr* 2003; 15: 547-58.
11. Mackay MT, Gordon A. Stroke in children. *Aust Fam Physician* 2007; 36: 896-902.
12. Rivkin MJ, Volpe JJ. Strokes in children. *Pediatr Rev* 1996; 17: 265-78.
13. Del Balzo F, Spalice A, Ruggieri M, Greco F, Properzi E, Iannetti P. Stroke in children:

- inherited and acquired factors and age-related variations in the presentation of 48 paediatric patients. *Acta Paediatr* 2009; 98: 1130-6.
14. Amlie-Lefond C, Sébire G, Fullerton HJ. Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2008; 7: 425-35.
  15. Barišić N, Bašnec A, Bešenski N. Cerebrovaskularne bolesti U: Pedijatrijska neurologija. ur. Barišić N. Medicinska naklada Zagreb 2009; 535-63.
  16. Raju TN, Nelson KB, Ferriero D, Lynch JK; NICHD-NINDS Perinatal Stroke Workshop Participants: 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.
  17. Dlamini N, Kirkham FJ. Stroke and cerebrovascular disorders. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 751-61.
  18. Pavlakis SG, Kingsley PB, Bialer MG. Stroke in children: genetic and metabolic issues. *J Child Neurology* 2000; 15: 308-15.
  19. Seidman C, Kirkham F, Pavlakis S. Pediatric stroke: current developments. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19: 657-62.
  20. deVeber G, Stroke and child's brain: an overview of epidemiology, syndromes and risk factors. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 133-8.
  21. Jordan LC, Hillis AE. Hemorrhagic stroke in children. *Pediatr Neurol* 2007; 36: 73-80.
  22. Jordan LC. Stroke in childhood. *The Neurologist* 2006; 12: 94-102.
  23. Mallick AA, O'Callaghan FJK. The epidemiology of childhood stroke. *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14: 197-205.
  24. Schoenberg BS, Mellinger JF, Schoenberg DG. Cerebrovascular disease in infants and children: a study of incidence, clinical features, and survival. *Neurology* 1978; 28: 763-8.
  25. Earley CJ, Kittner SJ, Feaser BR, Gardner J, Epstein A, Wozniak MA, et al. Stroke in children and sickle-cell disease: Baltimore–Washington Cooperative Young Stroke Study. *Neurology* 1998; 51: 169-76.
  26. Giroud M, Lemesle M, Gouyon JB, Nivelon JL, Milan C, Dumas R. Cerebrovascular disease in children under 16 years of age in the city of Dijon, France: a study of incidence and clinical features from 1985 to 1993. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1343-8.
  27. Lynch JK. Cerebrovascular disorders in children. *Curr Neurosci Rep* 2004; 4: 129-38.
  28. Satoh S, Shirane R, Yoshimoto T. Clinical survey of ischemic cerebrovascular disease in children in a district of Japan. *Stroke* 1991; 22: 586-9.

29. Broderick J, Talbot GT, Prenger E, Leach A, Brott T. Stroke in children within a major metropolitan area: the surprising importance of intracerebral hemorrhage. *J Child Neurol* 1993; 8: 250-5.
30. deVeber G, Andrew M, Adams C, Bjornson B, Booth F, Buckley DJ, Camfield CS, David M, Humphreys P, Langevin P, MacDonald EA, Gillett J, Meaney B, Shevell M, Sinclair DB, Yager J. Canadian Pediatric Ischemic Stroke Study Group. Cerebral sinovenous thrombosis in children. *N Engl J Med*. 2001; 345: 417- 23.
31. Wu YW, Lynch JK, Nelson KB. Perinatal arterial stroke: understanding mechanisms and outcomes. *Semin Neurol* 2005; 25: 424-34.
32. Laugesaar R, Kolk A, Tomberg T, Metsvaht T, Lintrop M, Varendi H, Talvik T. Acutely and retrospectively diagnosed perinatal stroke: a population-based study. *Stroke* 2007; 38: 2234-40.
33. Lee J, Croen LA, Backstrand KH, Yoshida CK, Henning LH, Lindan C, Ferriero DM, Fullerton HJ, Barkovich AJ, Wu YW. Maternal and infant characteristics associated with perinatal arterial stroke in the infant. *JAMA* 2005; 293: 723-9.
34. Fullerton HJ, Wu YW, Zhao S, Johnston SC. Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities. *Neurology* 2003; 61: 189-94.
35. Kirkham FJ, Williams AN, Aylett S, Ganesan V. Cerebrovascular disease/stroke and like illness. U: British Paediatric Surveillance Unit, 17th annual report. London: Royal College of Paediatrics and Child Health; 2003. p. 10-2.
36. Steinlin M, Pfister I, Pavlovic J, Everts R, Boltshauser E, Capone Mori A, et al. 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.
37. deVeber G. The Canadian Pediatric Ischemic Stroke Study Group: Canadian Paediatric Ischemic Stroke Registry: analysis of children with arterial ischemic stroke [abstract]. *Ann Neurol* 2000; 48: 514.
38. Barnes C, Newall F, Furmedge J, Mackay M, Monagle P. Arterial ischaemic stroke in children. *J Paediatr Child Health* 2004; 40: 384-7.
39. Fullerton HJ, Wu YW, Sidney S, Johnston SC. Recurrent hemorrhagic stroke in children: a population-based cohort study. *Stroke* 2007; 38: 2658-62.
40. Demarin V. Najnovije spoznaje u prevenciji, dijagnostici i liječenju moždanog udara u starijih osoba. *Medicus* 2005; 14: 219-28.
41. Kleindorfer D, Khoury J, Kissela B, Alwell K, Woo D, Miller R, Schneider A, Moomaw C, Broderick JP. Temporal trends in the incidence and case fatality of stroke

- in children and adolescents. *J Child Neurol* 2006; 21: 415-8.
42. Zahuranec DB, Brown DL, Lisabeth LD, Morgenstern LB. Is it time for a large, collaborative study of pediatric stroke? *Stroke* 2005; 36:1825-9.
  43. Golomb MR, Fullerton HJ, Nowak-Göttl U, deVeber G.; for the International Pediatric Stroke Study Group. Male predominance in childhood ischemic stroke, findings from the International Pediatric Stroke Study. *Stroke* 2009; 40: 52-7.
  44. Chung B, Wong V. Pediatric stroke among Hong Kong Chinese subjects. *Pediatrics* 2004; 114: e206-12.
  45. Đuranović V, Mejaški-Bošnjak V, Marušić-Della Marina B, Lujć L, Leniček J. Cerebrovaskularne bolesti u djece. *Medix* 2004; 56/57: 133-7.
  46. Mackay MT, Wiznitzer M, Benedict SL, Lee KJ, deVeber GA, Ganesan V; International Pediatric Stroke Study Group. Arterial ischemic stroke risk factors: the International Pediatric Stroke Study. *Ann Neurol* 2011; 69: 130-40.
  47. Lopez-Vicente M, Ortega-Gutierrez S, Amlie-Lefond C, Torbey MT. Diagnosis and management of pediatric arterial ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2010; 19: 175-83.
  48. Lanni G, Catalucci A, Conti L, Di Sibio A, Paonessa A, Gallucci M. Pediatric stroke: clinical findings and radiological approach. *Stroke Res Treat* 2011; 2011: 172168.
  49. Sofronas M, Ichord RN, Fullerton HJ, Lynch JK, Massicotte MP, Willan AR, deVeber G. Pediatric stroke initiatives and preliminary studies. What is known and what is needed? *Pediatr Neurol* 2006; 34: 439-45.
  50. Ciccone S, Cappella M, Borgna-Pignatti C. Ischemic stroke in infants and children: practical management in emergency. *Stroke Res Treatment* 2011; 2011: 736965.
  51. Chalmers EA. Perinatal stroke-risk factors and management. *Br J Haematol* 2005; 130: 333-43.
  52. Salonen R, Lichtenstein P, Bellocco R, Petersson G, Cnattingius S. Increased risk of circulatory diseases in late pregnancy and puerperium. *Epidemiology* 2001; 12: 456-60.
  53. Nelson KB. Perinatal ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38 (Suppl. 2): 742-5.
  54. Cnossen MH, van Ommen CH, Appel LM. Etiology and treatment of perinatal stroke; a role for prothrombotic coagulation factors? *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14: 311-7.
  55. Chabrier S, Husson B, Dinomais M, Landrieu P, Nuygen The Tich S. New insights (and new interrogations) in perinatal arterial ischemic stroke. *Thromb Res* 2011; 127: 13-22.
  56. Govaert P, Matthys E, Zecic A, Roelens F, Oostra A, Vanzielegheem B. Perinatal cortical infarction within middle cerebral artery trunks. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;

- 82: F59-63.
57. Nelson KB. Thrombophilias, perinatal stroke, and cerebral palsy. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 875-84.
  58. Kadojić D. Novi pristup klasifikaciji moždanog udara. *Liječn Vjes* 2008; 130 (Supl. 6): 6-7.
  59. Vargek-Solter V, Demarin V, Šerić V. Akutno zbrinjavanje moždanog udara, *Medix* 2001; 37/38: 58-60.
  60. Thaller N. Anatomska i funkcionalna organizacija moždanog krvotoka. U: *Moždani krvotok-klinički pristup*. ur. Demarin V. 1. izd. Naprijed 1994 Zagreb; 1-10.
  61. <http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/826578>, pristupljeno 26. 01. 2012.
  62. Presečki Ž, Benjak V, Barišić N. Neurološke bolesti novorođenačke dobi: krvarenja i hipoksično-ishemična encefalopatija U: *Pedijatrijska neurologija*. ur. Barišić N. Medicinska naklada Zagreb 2009; 170-94.
  63. Lynch JK, Han CJ. Pediatric stroke: what do we know and what do we need to know? *Semin Neurol* 2005; 25: 410–23.
  64. Pappachan J, Kirkham FJ. Cerebrovascular disease and stroke. *Arch Dis Child* 2008; 93: 890-8.
  65. Golomb MR, MacGregor DL, Domi T, Armstrong DC, McCrindle BW, Mayank S, deVeber GA. Presumed pre- or perinatal arterial ischemic stroke: risk factors and outcomes: *Ann Neurol* 2001; 50: 163-8.
  66. Kirton A, deVeber G. Advances in perinatal ischemic stroke. *Pediatr Neurol* 2009; 40: 205-14.
  67. Barišić N. Hitna stanja u pedijatrijskoj neurologiji U: *Pedijatrijska neurologija*. ur. Barišić N. Medicinska naklada Zagreb 2009; 1011-32.
  68. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:216-29.
  69. Lynch JK, Han CJ, Nee LE, Nelson KB. Prothrombotic factors in children with stroke or porencephaly. *Pediatrics* 2005; 116: 447-53.
  70. de Moerloose P, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 356–66.
  71. Ajjan RA, Ariëns RAS. Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state. *Blood Rev* 2009; 23: 67–78.
  72. Kant JA, Fornace AJ Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied

- by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2344-8.
73. de Moerloose P, Boehlen F, Neerman-Arbez M. Fibrinogen and the risk of thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 7-17.
  74. Grant PJ, Humphries SE. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 505-32.
  75. Koch W. Fibrinogen genes and myocardial infarction, a haplotype analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 758-63.
  76. Vischetti M, Zito F, Donati MB, Iacoviello L. Analysis of gene environment interaction in coronary heart disease: fibrinogen polymorphisms as an example. *Ital Heart J* 2002; 1: 18-23.
  77. Laffan MA. Fibrinogen polymorphism and disease. *Eur Heart J* 2001; 22: 2224-6.
  78. Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta DM. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001; 38: 1199-203.
  79. Martiskainen M, Pohjasvaara T, Mikkelsen J, Mäntylä R, Kunnas T, Laippala P, Ilveskoski E, Kaste M, Karhunen PJ, Erkinjuntti T. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke. *Stroke* 2003; 34: 886-91.
  80. Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Stadlmüller J, Walther R, Rettig R. The apolipoprotein E and beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2880-4.
  81. Nishiuma S, Kario K, Yakushijin K, Maeda M, Murai R, Matsuo T, Ikeda U, Shimada K, Matsuo M. Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 373-9.
  82. 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.
  83. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 2001; 28: 389-92.
  84. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism: pooled analysis of 8 case-control

- studies including 2310 cases and 3204 controls: Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 809-16.
85. Dahlbäck B. Advances in the understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008; 112: 19-27.
  86. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 706-8.
  87. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1430-3.
  88. Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms *Thromb Haemost* 2007; 98: 530-42.
  89. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Blood* 2003; 101: 20-30.
  90. Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1393-9.
  91. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, et al. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets *Blood* 1982; 60: 59-63.
  92. Rosing J, Bakker HM, Thomassen MC, Hemker HC, Tans G. Characterization of two forms of human factor Va with different cofactor activities. *J Biol Chem* 1993; 268: 21130-6.
  93. Kim SW, Ortel TL, Quinn-Allen MA, Yoo L, Worfolk L, Zhai X, Lentz BR, Kane WH. Partial glycosylation at asparagine-2181 of the second C-type domain of human factor V modulates assembly of the prothrombinase complex. *Biochemistry* 1999; 38: 11448-54.
  94. 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.
  95. Kalafatis M. Coagulation factor V: a plethora of anticoagulant molecules. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 141-8.
  96. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood* 1999; 93: 2552

-8.

97. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–7.
98. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, Schwarz HP, Rosing J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; 270: 21158-66.
99. 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.
100. Bertina RM. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 601–9.
101. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
102. Cramer TJ, Gale AJ. The anticoagulant function of coagulation factor V. *Thromb Haemost* 2012; 107: 15-21.
103. Steen M, Norstrom EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH, Tuddenham EG, Dahlbäck B. Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004; 103: 3381-7.
104. Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M, Castaman G, Redaelli R, Mariani G, Marchetti G, Bernardi F. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996; 75: 45-8.
105. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 1997; 90: 1552-7.
106. Castoldi, E, Rosing J, Girelli D, Hoekema L, Lunghi B, Mingozzi F, Ferraresi P, Friso S, Corrocher R, Tans G, Bernardi F. Mutations in the R2 FV gene affect the ratio between the two FV isoforms in plasma. *Thromb Haemost* 2000; 83: 362-5.
107. Hoekema L, Castoldi E, Tans G, Girelli D, Gemmati D, Bernardi F, Rosing J. Functional properties of factor V and factor Va encoded by the R2-gene. *Thromb Haemost* 2001; 85: 75-81.
108. Faioni EM, Castaman G, Asti D, Lussana F, Rodeghiero F. Association of factor V deficiency with factor V HR2. *Haematologica* 2004; 89: 195-200.



109. 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.
110. De Visser MCH, Guasch JF, Kamphuisen PW, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83: 577-82.
111. Kostka H, Siegert G, Schwartz T. Frequency of polymorphisms in the B-domain of factor V gene in APC-resistant patients. *Thromb Res* 2000; 99: 539-47.
112. Akar N, Akar E, Yilmaz E. Factor V (His1299 Arg) in Turkish patients with venous thromboembolism. *Am J Hematol* 2000; 63: 102-7.
113. Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Finazzi G, Mannucci PM. Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden). *Blood* 1999; 94: 3062-6.
114. 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.
115. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; 94: 271-305.
116. Kohler HP, Grant PJ. The role of factor XIIIVal34Leu in cardiovascular disease. *QJM* 1999; 92: 67-72.
117. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Shemirani AH, Katona E. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36:18-33.
118. Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vahtera E, Hämäläinen E, Peltonen L, Palotie A. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994; 84: 517-25.
119. Kohler HP. Role of blood coagulation factor XIII in vascular diseases. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 31-4.
120. Muszbek L. Deficiency causing mutations and common polymorphisms in the factor XIII-A gene. *Thromb Haemost* 2000; 84: 524-7.
121. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1792-801.
122. Strandberg L, Lawrence D, Ny T. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem* 1988; 176: 609-16.

123. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsiara CG, Kapsimali V, Travlou A, Vaiopoulos G. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 497-504.
124. Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 18: 75-87.
125. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
126. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 872-84.
127. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90: 1-11.
128. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 1422-28.
129. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
130. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-51.
131. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.
132. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JCM. ACE polymorphisms. *Circ Res* 2006; 98: 1123-33.
133. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotova R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 774-80.
134. Rigat B, Hubert C, Alhens-Gelas F, Cambieri F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.
135. Nawaz SK, Hasnain S. Pleotropni učinci polimorfizma ACE. *Biochemia Med* 2009; 19: 36-49.
136. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analysis of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 484-92.

137. Sharma P. Meta-analyses of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 227-30.
138. Maeda Y, Ikeda U, Ebata H, Hojo Y, Seino Y, Hayashi Y, Kuroki S, Shimada K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive individuals with parental history of stroke. *Stroke* 1996; 27: 1521-3.
139. Zee RYL, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpaintner K. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/ deletion polymorphism and risk of stroke. *Circulation* 1999; 99: 340-3.
140. Rall Jr SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171-8.
141. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 62-74.
142. Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. *Indian J Med Res* 2010; 132: 363-78.
143. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-30.
144. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* 2009; 50: S156-61.
145. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
146. Mahley RW. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 500-37.
147. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE genotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-54.
148. Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41: 1060-86.
149. Cacabelos R. Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2005; 27 (Suppl. A): 1-573.
150. Scott J, Knott TJ, Shaw DJ, et al. Localization of genes encoding apolipoprotein CI, CII, and E to the p13->cen region of human chromosome 19. *Hum Genet* 1985; 71: 144-6.
151. Ribalta J, Vallvé JC, Girona J, Masana L. Apolipoprotein and apolipoprotein receptor genes, blood lipids and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 177-87.

152. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S183–8.
153. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 445-54.
154. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 487-95.
155. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1988, 8: 1-21.
156. Kolovou G, Damaskos D, Anagnostopoulou K, Cokkinos DV. Apolipoprotein E gene polymorphism and gender. *Ann Clin Lab Sci* 2009; 39: 120-33.
157. Hoffmann MM, Scharnagl H, Köster W, Winkler K, Wieland H, März W. Apolipoprotein E1 Baden (Arg(180)-->Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* 2001; 303: 41-8.
158. Boerwinkle E, Visvikis S, Welsh D, Steinmetz J, Hanash SM, Sing CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, beta-lipoprotein and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 1987; 27: 567-82.
159. Utermann G, Jaeschke M, Menzel J. Familial hyperlipoproteinemia type III. Deficiency of a specific apolipoprotein (apo EIII) in the very low density lipoproteins. *FEBS Lett* 1975; 56: 352-5.
160. Hixson JE, for the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) research group. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1237-44.
161. Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetti E, Bovenzi M, Baralle F. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 91-4.
162. Utermann G, Hardewig A, Zimmer F. Apo E phenotypes in patients with myocardial infarction. *Hum Genet* 1984; 65: 237-41.
163. Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease: the Framingham

- Offspring Study. JAMA 1994; 272: 1666-71.
164. Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 265-9.
  165. Pedro-Botet J, Sentì M, Nogues X, Rubiès-Prat J, Roquer J, D'Olhaberriague L, Olivé J. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke: role of lipoprotein(a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke* 1992; 23: 1556-62.
  166. Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Fenelon G, Mary R, Fermania J. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease: a case-control study. *Stroke* 1993; 24: 661-4.
  167. Luthra K, Prasad K, Kumar P, Dwivedi M, Pandey RM, Das N. Apolipoprotein E gene polymorphism in cerebrovascular disease. A case control study. *Clin Genet* 2002; 62: 39-44.
  168. Pezzini A, Grassi M, Zotto ED, Bazzoli E, Archetti S, Assanelli D, Akkawi NM, Albertini A, Padovani A. Synergistic effect of apolipoprotein E polymorphisms and cigarette smoking on risks of ischemic stroke in young adults. *Stroke* 2004; 35: 438-42.
  169. Wang B, Zhao H, Zhou L, Dai X, Wang D, Caoe J, Niu W. Association of genetic variation in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor with ischemic stroke in northern Han Chinese. *J Neurol Sci* 2009; 276: 118-22.
  170. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfus Apher Sci* 2003; 28: 227-36.
  171. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003; 85: 240-5.
  172. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion* 2011; 51: 558-69.
  173. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, Campbell K, Sutherland DR, Metcalfe P, Horsfall W, Ouwehand WH. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99: 1692-8.
  174. Finnson KW, Tam BY, Liu K, Marcoux A, Lepage P, Roy S, Bizet AA, Philip A. Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *FASEB J* 2006; 20: 1525-7.

175. [http://www.abrf.org/Other/ABRFMeetings/ABRF2011/RG%20Presentations/BCurtis\\_R2-2.pdf](http://www.abrf.org/Other/ABRFMeetings/ABRF2011/RG%20Presentations/BCurtis_R2-2.pdf), pristupljeno 02.08.2012.
176. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83: 1778-81.
177. Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ. The impact of three-dimensional structure on the expression of PlA alloantigens on human integrin beta 3. *Blood* 1995; 86: 234-42.
178. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendric C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GPIIIa Pl(A) polymorphism display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013-8.
179. Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray P. The Pl (A2) polymorphism of integrin  $\beta 3$  enhances outside in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105: 793-802.
180. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PlA2 polymorphism. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1142-7.
181. Bray PF. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 284-9.
182. Naran NH, Chetty N, Crowther NJ. The prevalence of the platelet glycoprotein IIIa Pl<sup>A1/A2</sup> polymorphism in three South African ethnic groups and its effect on platelet function. *Thromb Res* 2008; 123: 316-23.
183. Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A2 in subjects with PlA2 polymorphism of  $\beta 3$  subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 2000; 110: 911-8.
184. Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet* 1997; 349: 370-1.
185. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak<sup>a</sup>/Bak<sup>b</sup> alloantigen system. *Blood* 1990; 75: 2343-2348.

186. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000; 222-40.
187. Kuijpers RW, Faber NM, Cuypers HT, Ouwehand WH, von dem Borne AE. NH<sub>2</sub>-terminal globular domain of the human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine145/threonine145 amino acid polymorphism which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89: 381-4.
188. Zhang Y, Wang Y, Wang Y, Cui C, Huang P, Li X, Liu S, Lendon C, Guo N. Platelet glycoprotein polymorphisms: risk, in vivo expression and severity of atherothrombotic stroke in Chinese. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 99-104.
189. Ulrichts H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, Vauterin S, Kroll H, Santoso S, Deckmyn H. Von Willebrand factor but not  $\alpha$ -thrombin binding to platelet glycoprotein Iba is influenced by the HPA-2 polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1302-7.
190. Rožman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant Immunology* 2002; 10: 165-81.
191. Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 14-20.
192. Deckmyn H, Ulrichts H, Van De Walle G, Vanhoorelbeke K. Platelet antigens and their function. *Vox Sang* 2004; 87 (Suppl 2): 105-11.
193. Peterson ET, Sutherland R, Robinson DL, Chasteen L, Gersh M, Overhauser J, Deaven LL, Moyzis RK, Grady L. An integrated physical map for the short arm of human chromosome 5. *Genome Res* 1999; 9: 1250-67.
194. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C and Newman PJ. The human platelet alloantigens Br(a) and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest* 1993; 92: 2427-32.
195. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-4.
196. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bbeta 448 polymorphism with

- myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 1424-31.
197. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-8.
  198. Garg UC, Arnett DK, Folsom AR, Province MA, Williams RR, Eckfeldt JH. Lack of association between platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor PIA polymorphism and coronary artery disease or carotid intima-media thickness. *Thromb Res* 1998; 89: 85-9.
  199. Zhu MM, Weedon J, Clark LT. Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1000-5.
  200. Aleksic N, Juneja H, Folsom AR, Ahn C, Boerwinkle E, Chambless LE, Wu KK. Platelet PIA2 allele and incidence of coronary heart disease: results from the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2000; 102: 1901-5.
  201. Di Castelnuovo A, De Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 626-33.
  202. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999; 94: 46-51.
  203. Szolnoki Z, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Bene J, Havasi V, Komlósi K, Melegh B. Increased prevalence of platelet glycoprotein IIb/IIIa PLA2 allele in ischaemic stroke associated with large vessel pathology. *Thromb Res* 2003; 109: 265-9.
  204. Slowik A, Dziedzic T, Turaj W, Pera J, Glodzik-Sobanska L, Szermer P, Malecki MT, Figlewicz DA, Szczudlik A. A2 Allele of GpIIIa gene is a risk factor for stroke caused by large-vessel disease in males. *Stroke* 2004; 35: 1589-93.
  205. 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.
  206. 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 (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 1997; 28: 1392-5.



207. Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, Ou CY, Bray PF, Goldschmidt- Clermont PJ, Croft JB, Brown VK, Stern BJ, Feeser BR, Buchholz DW, Earley CJ, Macko RF, McCarter RJ, Sloan MA, Stolley PD, Wityk RJ, Wozniak MA, Price TR, Kittner SJ. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risk: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke* 1998; 29: 581-5.
208. Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT, Pearce RM, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 2000; 31: 1628-33.
209. van Goor ML, Gómez García E, Brouwers GJ, Leebeek FW, Koudstaal PJ, Dippel DW. PLA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa in young patients with cryptogenic TIA or ischemic stroke. *Thromb Res* 2002; 108: 63-5.
210. Iniesta JA, Gonzalez-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. Platelet GP IIIa polymorphism HPA-1 (PIA) protects against subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004; 35: 2282-6.
211. Sonoda A, Murata M, Ikeda U, Fukuuchi Y, Watanabe K. Stroke and platelet glycoprotein 1b $\alpha$  polymorphisms. *Thromb Haemost* 2001; 85: 573-4.
212. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92: 2771-6.
213. Baker RI, Eikelboom J, Lofthouse E, Staples N, Afshar-Kharghan V, López JA, Shen Y, Berndt MC, Hankey G. Platelet glycoprotein Ibalph Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. *Blood* 2001; 98: 36-40.
214. Gao XG, Huo Y, Liu XZ, Teng Z.P. Gene polymorphism of platelet glycoprotein I balph in Chinese patients with large- and small-artery subtypes of ischemic stroke. *Eur Neurol* 2005; 54: 73-7.
215. Maguire JM, Thakkinstian A, Sturm J, Levi C, Lincz L, Parsons M, Whyte S, Attia J. Polymorphisms in platelet glycoprotein 1b $\alpha$  and factor VII and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Stroke* 2008; 39: 1710-6.
216. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after acute ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 2606-11.
217. 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.

218. Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, Behari M, Saxena R. Prothrombotic polymorphisms, mutations, and their association with pediatric non-cardioembolic stroke in Asian-Indian patients. *Ann Hematol* 2009; 88:473-8.
219. 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.
220. Miller SP, Wu YW, Lee J, Lammer EJ, Iovannisci DM, Glidden DV, Bonifacio SL, Collins A, Shaw GM, Barkovich AJ, Ferriero DM. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls. *Stroke* 2006; 37: 2678-83.
221. Coen Herak D, Radic Antolic M, Lenicek Krleza J, Pavic M, Dodig S, Duranovic V, Basnec Brkic A, Zadro R. Inherited prothrombotic risk factors in children with stroke, transient ischemic attack and migraine. *Pediatrics* 2009; 123: e653-60.
222. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
223. Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 1996; 71: 121-5.
224. Court lab-HW calculator. Court MH dostupno na <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls> pristupljeno 05.12. 2011.
225. <http://www.bios.unc.edu/~dlin/hapstat/download/pristupljeno> 18.01.2012.
226. Sébire G, Fullerton H, Riou E, deVeber G. Toward the definition of cerebral arteriopathies of childhood. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16: 617-22.
227. Ganesan V, Prengler M, McShane MA, Wade AM, Kirkham FJ. Investigation of risk factors in children with arterial ischemic stroke. *Ann Neurol* 2003; 53: 167-73.
228. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Salvagno GL, Targher G, Guidi GC. Inherited and acquired risk factors for arterial ischemic stroke in childhood. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 27: 239-48.
229. deVeber G, Roach ES., Riela Ar, Wiznitzer M. Stroke in children: recognition, treatment, and future directions. *Semin Pediatr Neurol* 2000; 7: 309-17.
230. Shi KL, Wang JJ, Li JW, Jiang LQ, Mix E, Fang F, Wu HS, Jin X, Jing H, Zou LP. Arterial ischemic stroke: experience in Chinese children. *Pediatr Neurol* 2008; 38: 186-90.

231. Lo W, Stephens J, Fernandez S. Pediatric stroke in the United States and the impact of risk factors. *J Child Neurol* 2009; 24: 194-203.
232. McColl MD, Chalmers EA, Thomas A, Sproul A, Healey C, Rafferty I, McWilliam R, Eunson P. Factor V Leiden, prothrombin 20210G→A and the MTHFR C677T mutations in childhood stroke. *Thromb Haemost* 1999; 81: 690-4.
233. Heller C, Becker S, Scharrer I, Kreuz W. Prothrombotic risk factors in childhood stroke and venous thrombosis *Eur J Pediatr* 1999; 158 (Suppl. 3): S117-21.
234. Günther G, Junker R, Sträter R, Schobess R, Kurnik K, Heller C, Kosch A, Nowak-Göttl U; Childhood Stroke Study Group. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates: role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. *Stroke* 2000; 31: 2437-41.
235. Duran R, Biner B, Demir M, Celtik C, Karasalioglu S. Factor V Leiden mutation and other thrombophilia markers in childhood ischemic stroke. *Clin Appl Thromb Haemost* 2005; 11: 83-8.
236. Zak I, Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Emich-Widera E, Marszal E, Wendorff J, Jachowicz-Jeszka J. The T allele of the 677C>T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an increased risk of ischemic stroke in Polish children. *J Child Neurol* 2009; 24: 1262-7.
237. Kenet G, Sadetzki S, Murad H, Martinowitz U, Rosenberg N, Gitel S, Rechavi G, Inbal A. Factor V Leiden and antiphospholipid antibodies are significant risk factors for ischemic stroke in children. *Stroke* 2000, 31: 1283-8.
238. Salih MA, Abdel-Gader AG, Al-Jarallah AA, Kentab AY, Alorainy IA, Hassan HH, Al-Nasser MN. Perinatal stroke in Saudi children. Clinical features and risk factors. *Saudi Med J* 2006; 27 (Suppl.1): S35-40.
239. Al-Rajeh S, Larbi EB, Bademosi O, Awada A, Yousef A, al-Freihi H, Miniawi H. Stroke register: experience from the eastern province of Saudi Arabia. *Cerebrovasc Dis* 1998; 8: 86-9.
240. Ghandehari K, Izadi-Mood Z. Incidence and etiology of pediatric stroke in Southern Khorasan. *ARYA Atherosclerosis J* 2007; 3: 29-33.
241. Muwakkit SA, Majdalani M, Hourani R, Mahfouz RA, Otrock ZK, Bilalian C, Chan AK, Abboud M, Mikati MA. Inherited thrombophilia in childhood arterial stroke: data from Lebanon. *Pediatr Neurol* 2011; 45: 155-8.

242. Lee YY, Lin KL, Wang HS, Chou ML, Hung PC, Hsieh MY, Lin JJ, Wong AM. Risk factors and outcomes of childhood ischemic stroke in Taiwan. *Brain Dev* 2008; 30: 14-9.
243. 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* 2007; 37: 99-107.
244. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Pieroni G, Torres AF, Mardaraz C, Frontroth JP. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation in children with cerebral thromboembolism. *Am J Hematol* 2003; 73: 81-6.
245. Lenicek Krleza J, Duranovic V, Lujic L, Coen Herak D, Mejaski-Bosnjak V, Nakic M, Zadro R. The burden of paediatric stroke and cerebrovascular disorders in Croatia. *Int J Stroke* 2009; 4: 390-4.
246. Aydinli N, Tatli B, Calışkan M, Ozmen M, Citak A, Unuvar A, Baykal T, Omeroglu RE, Aydin K, Sencer S, Sencer A, Kiriş T. Stroke in childhood: experience in Istanbul Turkey. *J Trop Pediatr* 2006; 52: 158-62.
247. Chen PC, Chien KL, Chang CW, Su TC, Jeng JS, Lee YT, Sung FC. More hemorrhagic and severe events cause higher hospitalization care cost for childhood stroke in Taiwan. *J Pediatr* 2008; 152: 388-93.
248. Goodman S, Pavlakis S. Pediatric and newborn stroke. *Curr Treat Options Neurol* 2008; 10: 431-9.
249. Tsze DS, Valente JH. Pediatric stroke: a review. *Emerg Med Int* 2011; 2011: 734506.
250. Cárdenas JF, Rho JM, Kirton A. Pediatric stroke. *Childs Nerv Syst* 2011; 27: 1375-90.
251. Cnossen MH, Aarsen FK, Akker SLJ, Danen R, Appel IM, Steyerberg EW, Catsman-Berrevoets CE. Paediatric arterial ischaemic stroke: functional outcome and risk factors. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: 394-9.
252. Younkin DP. Diagnosis and treatment of ischemic pediatric stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002; 2: 18-24.
253. Earley CJ, Kittner SJ, Feaser BR, Gardner J, Epstein A, Wozniak MA, Wityk R, Stern BJ, Price TR, Macko RF, Johnson C, Sloan MA, Buchholz D. Stroke in children and sickle-cell disease: Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. *Neurology* 1998; 51: 169-76.
254. Eeg-Olofsson O, Ringheim Y. Stroke in children. Clinical characteristics and prognosis. *Acta Ped Scand* 1983; 72: 391-5.

255. Zenz W, Bodo Z, Plotho J, Streif W, Male C, Bernert G, Rauter L, Ebetsberger G, Kaltenbrunner K, Kurnik P, Lischka A, Paky F, Ploier R, Höfler G, Mannhalter C, Muntean W. Factor V Leiden and prothrombin gene G 20210 A variant in children with ischemic stroke. *Thromb Haemost* 1998; 80: 763-6.
256. Dusser A, Goutières F, Aicardi J. Ischemic strokes in children. *J Child Neurol* 1986; 1: 131-6.
257. Nowak-Göttl U, Sträter R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, von Eckardstein A. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94: 3678-82.
258. Barreirinho S, Ferro A, Santos M, Costa E, Pinto-Basto J, Sousa A, Sequeiros J, Maciel P, Barbot C, Barbot J. Inherited and acquired risk factors and their combined effects in pediatric stroke. *Pediatr Neurol* 2003; 28: 134-8.
259. Pavlakis SG, Levinson K. Arterial ischemic stroke. Common risk factors in newborns and children. *Stroke* 2009; 40 (Suppl 3): S79-81.
260. Jordan LC, Hillis AE. Challenges in the diagnosis and treatment of pediatric stroke. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7: 199-208.
261. Beslow LA, et al. Predictors of outcome in childhood intracerebral hemorrhage: a prospective consecutive cohort study. *Stroke* 2010; 41: 313-8.
262. Lanthier S, Carmant L, David M, Larbrisseau A, de Veber G. Stroke in children: the coexistence of multiple risk factors predicts poor outcome. *Neurology*. 2000; 54: 371-8.
263. Kottke-Marchant K. Genetic polymorphisms associated with venous and arterial thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 295-304.
264. Kirkham FJ, Hogan AM. Risk factors for arterial ischemic stroke in childhood. *CNS Spectr* 2004; 9: 451-64.
265. deVeber G. Arterial ischemic strokes in infants and children. An overview of current approaches. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 567-73.
266. Nowak-Göttl U, Günther G, Kurnik K, Sträter R, Kirkham F. Arterial ischemic stroke in neonates, infants and children: an overview of underlying conditions, imaging methods, and treatment modalities. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 405-14.
267. Barnes C, deVeber G. Prothrombotic abnormalities in childhood ischaemic stroke. *Thromb Res* 2006; 118: 67-74.
268. Nelson KB, Lynch JK. Stroke in newborn infants. *Lancet Neurol* 2004; 3: 150-8.

269. Hagstrom JN, Walter J, Bluebond-Langner R, Amatriek JC, Manno CS, High KA. Prevalence of the factor V Leiden mutation in children and neonates with thromboembolic disease. *J Pediatr* 1998; 133: 777-81.
270. Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi T, Orsal A. Factor V1691 G-A, prothrombin 20210 G-A, and methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T variants in Turkish children with cerebral infarct. *J Child Neurol* 1999; 14: 749-51.
271. Akar N, Akar E, Yilmaz E, Deda G. Plasminogen activator Inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish children with cerebral infarct and effect on factor V 1691A mutation. *J Child Neurol* 2001; 16: 294-5.
272. Mercuri E, Cowan F, Gupte G, Manning R, Laffan M, Rutherford M, Edwards AD, Dubowitz L, Roberts I. Prothrombotic disorders and abnormal neurodevelopmental outcome in infants with neonatal cerebral infarction. *Pediatrics* 2001; 107: 1400-4.
273. Debus OM, Kosch A, Sträter R, Rossi R, Nowak-Göttl U. The factor V G1691A mutation is a risk for porencephaly: a case-control study. *Ann Neurol* 2004; 56: 287-90.
274. 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.
275. Kurnik K, Kosch A, Sträter R, Schobess R, Heller C, Nowak-Göttl U, for the Childhood Stroke Study Group. Recurrent thromboembolism in infants and children suffering from symptomatic neonatal arterial stroke – a prospective follow-up study. *Stroke* 2003; 34: 2887-93.
276. Ganesan V, McShane R, Liesner J, Cookson J, Hann I, Kirkham FJ. Inherited prothrombotic states in ischaemic stroke in childhood *J Neurol Neurosurg* 1998; 65: 508-11.
277. Laugesaar R, Kahre T, Kolk A, Uustalu U, Kool P, Talvik T. Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A [corrected] mutation and paediatric ischaemic stroke: a case-control study and two meta-analyses. *Acta Paediatr* 2010; 99: 1168-74.
278. Haywood S, Liesner R, Pindora S, Ganesan V. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke: a systematic review. *Arch Dis Child* 2005; 90: 402-5.
279. Kenet G, Lutkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, Chabrier S, Chan A, deVeber G, Fiedler B, Fullerton HJ, Goldenberg NA, Grabowski E, Günther G, Heller C, Holzhauer S, Iorio A, Journeycake J, Junker R, Kirkham FJ, Kurnik K, Lynch JK, Male C, Manco-Johnson M, Mesters R, Monagle P, van Ommen CH, Raffini L, Rostásy K, Simioni P, Sträter RD, Young G, Nowak-Göttl U. Impact of thrombophilia

- on arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in children: a systematic review & meta analysis of observational studies. *Circulation* 2010; 121: 1838-47.
280. Renaud C, Tardy-Poncet B, Presles E, Chabrier S; AVCnn group. 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.
  281. Zadro R, Coen Herak D. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke. *Biochem Med* 2012; 22: 298-310.
  282. Akar N, Dönmez B, Deda G. FXIII gene Val34Leu polymorphism in Turkish children with cerebral infarct. *J Child Neurol* 2007; 22: 222-4.
  283. Nowak-Göttl U, Sträter R, Kosch A, von Eckardstein A, Schobbes R, Luigs P, Nabel P, Vielhaber H, Kurnik K, Junker R. The plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 promoter 4G/4G genotype is not associated with ischemic stroke in a population of German children. Childhood Stroke Study Group. *Eur J Haematol* 2001; 66: 57-62.
  284. Morita DC, Donaldson A, Butterfield RJ, Benedict SL, Bale JF Jr. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and childhood stroke. *Pediatr Neurol* 2009; 41: 247-9.
  285. Rook JL, Nugent DJ, Young G. Pediatric stroke and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 590-3.
  286. Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res* 2001; 102: 115-20.
  287. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14853-8.
  288. Hering-Hanit R, Friedman Z, Schlesinger I, Ellis M. Evidence for activation of the coagulation system in migraine with aura. *Cephalalgia* 2001; 21: 137-9.
  289. Prengler M, Sturt N, Krywawych S, Surtees R, Liesner R, Kirkham F. Homozygous thermolabile variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a potential risk factor for hyperhomocysteinaemia, CVD, and stroke in childhood. *Dev Med Child Neurol* 2001; 43: 220-5.
  290. Cardo E, Monros E, Colome C, Artuch R, Campistol J, Pineda M, Vilaseca MA. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. *J Child Neurol* 2000; 15: 295-8.

291. Sirachainan N, Sasanakul W, visudtibihan A, Tapanapruksakul P, Charoenkwan P, Kadegasem P, Udomsubpayakul U, Chuansumrit A. The effect of polymorphisms of MTHFR C677T, A1298C, MS A2756G, and CBS 844ins68 bp on plasma total homocysteine level and the risk of ischemic stroke in Thai children. *Thromb Res* 2008; 122: 33-7.
292. Djordjevic V, Stankovic M, Brankovic-Sreckovic V, Rakicevic L, Radojkovic D. Genetic risk factors for arterial ischemic stroke in children: a possible MTHFR and eNOS gene-gene interplay? *J Child Neurol* 2009; 24: 823-7.
293. Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Pienczk-Reklawowicz K, Reclanowicz D, Emich-Widera, Pilarska E. The TT genotype of methylentetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism increases the susceptibility to pediatric ischemic stroke: meta-analysis of the 822 cases and 1,552 controls. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 7957-63.
294. Balcerzyk A, Zak I, Niemiec P, Kopyta I, Emich-Widera E, Iwanicki T. *APOE* gene  $\epsilon$  polymorphism does not determine predisposition to ischemic stroke in children. *Pediatr Neurol* 2010; 43: 25-8.
295. Brown NJ, Vaughan DE. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med* 2000; 45: 419-29.
296. Nestoridi E, Buonanno FS, Jones RM, Krishnamoorthy K, Grant PE, van Cott EM, Grabowski EF. Arterial ischemic stroke in childhood: the role of plasma-phase risk factors. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 139-44.
297. Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Aleksic N, Heckbert SR, Boland LL, Tsai AW, Yanez ND, Rosamond WD. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood* 2002; 99: 2720-5.
298. Normann S, de Veber G, Fobker M, Langer C, Kenet G, Bernard TJ, Fiedler B, Sträter R, Goldenberg NA, Nowak-Göttl U. Role of endogenous testosterone concentration in pediatric stroke. *Ann Neurol* 2009; 66: 754-8.



## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 08.04.1963. u Zadru, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu upisala sam 1981. godine i diplomirala 1985. na smjeru medicinska biokemija. Poslijediplomski studij iz medicinske biokemije upisala sam 1988. godine, a 2005. godine razlikovnu godinu doktorskog studija iz medicinske biokemije.

Pripravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici "Sestre Milosrdnice" gdje sam ujedno položila stručni ispit 1987. Od 1989.-2001. radila sam u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za traumatologiju u Zagrebu. Specijalistički ispit položila sam 1999. U okviru specijalističkog staža 1997. bila na usavršavanju 2 mjeseca u koagulacijskom laboratoriju Angelo Bianchi Bonomi Centra za hemofiliju i trombozu Interne klinike Ospedale Maggiore u Milanu pod vodstvom prof. dr. Pier Mannuccio Mannucia. Od 2001. voditelj sam laboratorija za koagulaciju Zavoda za hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb.

Autor sam ili koautor 18 stručnih ili znanstvenih radova, od čega je 9 citirano u bazi podataka Current Contents, 15 poglavlja u priručnicima za trajno usavršavanje te 100 kongresnih sažetaka. Sudjelovala samna brojnim stručnim skupovima u zemlji i inozemstvu, od toga kao pozvani predavač na 5 međunarodnih znanstvenih i 14 domaćih stručnih ili znanstvenih skupova, te održala 15 predavanja na tečajevima za trajno usavršavanje medicinskih biokemičara. Dobitnica sam godišnje nagrade Hrvatskog društva medicinskih biokemičara za znanstveni rad u 2009. godini.

Sudjelujem u nastavi kao predavač na Zdravstvenom veleučilištu u okviru stručnog studija "Laboratorijska medicina" (kolegij: Transfuzijska medicina) te na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu na poslijediplomskom specijalističkom studiju "Medicinska biokemija i laboratorijska medicina" (kolegij: Novosti u laboratorijskoj hematologiji i imunohematologiji), te poslijediplomskom doktorskome studiju "Farmaceutske i medicinsko-biokemijske znanosti", modul "Medicinsko-biokemijske znanosti" (kolegij: Novosti u laboratorijskoj dijagnostici poremećaja zgrušavanja).

Član sam Hrvatskog društva medicinskih biokemičara od 1985., Hrvatske komore medicinskih biokemičara od 1995., Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (ISTH) od 2000., Mediteranske lige protiv tromboembolijskih bolesti (MLTD) od 2010., te Svjetskog društva hemofilije (WFH) od 2010.

## POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA:

1. Časl MT, **Coen D**, Šimić D. Serum amyloid A protein in the prediction of postburn complications and fatal outcome in patients with severe burns. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 31-5.
2. **Coen D**, Zadro R, Honović L, Banfić LJ, 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.
3. Car D, Cvjetko M, Car Z, Šnur I, Buljat G, Torbica V, **Coen D**. Thromboembolism after injury – dimensions of the problem and risk factors. *Neurol Croat* 2001; 50 (Suppl.3): 97-104.
4. Vogrinc Ž, Trbojević-Čepe M, **Coen D**, Vitale K, Stavljenić Rukavina A. Apo H dependent autoantibodies and apo H protein polymorphism in selected patients showing lupus anticoagulant activity. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 17-21.
5. Đuranović V, Mejaški-Bošnjak V, Lujčić L, Leniček Krleža J, **Coen Herak D**, Krakar G, Lončarević D, Gojmerac T. Doplerska metoda dijagnostike bolesnika s ishemijskim moždanim udarom. *Paediatr Croat* 2007; 51:213-20.
6. Milos M, **Herak D**, Kuric L, Horvat I, Zadro R. Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer - HemosIL reagents. *Int J Lab Hematol*. 2009; 31: 26-35.
7. **Coen Herak D**, Radic AntolicM, Lenicek Krleza J, Pavic M Dodig S, Duranovic V, Basnec Brkic A, Zadro R. Inherited prothrombotic risk factors in children with stroke, transient ischemic attack, or migraine. *Pediatrics* 2009; 123: e653-60.
8. **Coen Herak D**, Milos M, Zadro R. Evaluation of the Innovance D-DIMER analytical performance. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 945-51.
9. Lenicek Krleza J, Duranovic V, Lujic L, **Coen Herak D**, Mejaski-Bosnjak V, Nakic M, Zadro R. The burden of pediatric stroke and cerebrovascular disorders in Croatia. *Int J Stroke* 2009; 4: 390-4.
10. Milos M, **Coen Herak D**, Zadro R. Discrepancies between APTT results determined with different evaluation modes on automated coagulation analyzers. *Int J Lab Hematol* 2010; 32: 33-39.
11. 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.

12. Lenicek Krleza J, Jakovljevic G, Bronic A, **Coen Herak D**, Bonevski A, Stepan-Giljevic J, Roic G. Contraception - related deep venous thrombosis and pulmonary embolism in a 17-year-old girl heterozygous for FV Leiden, prothrombin G20210A mutation, MTHFR C677T and homozygous for PAI 1 mutation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2010; 37: 24-9.
13. **Coen Herak D**. Inherited coagulation disorders in children with arterial ischemic stroke and transient ischemic attack. *Clin Biochem* 2011; 44: 512-3.
14. **Coen Herak D**. Izazovi laboratorijske dijagnostike hemostatskih poremećaja u djece. *Pediatr Croat* 2012; 56 (Supl 1): 176-81.
15. **Coen Herak D**. Laboratory monitoring of new anticoagulants. *Neurol Croat* 2012; 61 (Suppl. 2): 157-60.
16. Zadro R, **Coen Herak D**. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke. *Biochem Med* 2012; 22: 298-310.

#### **POPIS OBJAVLJENIH STRUČNIH RADOVA:**

1. Gojun M, **Coen D**, Dragun Z, Brkljačić V, Zadro R. Evaluation of Sysmex CA-6000<sup>TM</sup>-Dade Reagent System. *Sysmex J Int* 1998; 8: 9-14.
2. Milos M, **Coen D**, Zadro R. Reliability of prothrombin and activated partial thromboplastin time determination on CoaguChek Pro DM. *Point of Care* 2004, 3:135-9.

#### **PRIRUČNICI ZA TRAJNO USAVRŠAVANJE:**

1. **Coen D**. Protrombinski kompleks U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Zagreb 1997; 10-3.
2. **Coen D**. Vrijednost određivanja protrombinskog fragmenta F1+2 u praćenju oralne antikoagulacijske terapije. U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Zagreb 1997; 32-4.
3. **Coen D**. Fiziologija hemostaze U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Zagreb 1997; 1-3.
4. **Coen D**. Laboratorijska dijagnostika trombofilija U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Zagreb 1997; 19-24.

5. **Coen D.** Protrombinski kompleks U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Split 1998; 10-3.
6. **Coen D.** Vrijednost određivanja protrombinskog fragmenta F1+2 u praćenju oralne antikoagulacijske terapije. U: Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. U: Stavljenić Rukavina A, Zadro R. Priručnik Laboratorijska dijagnostika poremećaja zgrušavanja. Split 1998; 38-41.
7. **Coen D.** Laboratorijski testovi u dijagnostici anemija. U: Zadro R, Stavljenić Rukavina A. Priručnik Laboratorijska dijagnostika anemija. Zagreb 1998; 6-13.
8. **Coen D.** Laboratorijski testovi u dijagnostici anemija. U: Zadro R, Stavljenić Rukavina A. Priručnik Laboratorijska dijagnostika anemija. Zagreb 1998; 6-13.
9. **Coen D.** Algoritmi u dijagnostici poremećaja zgrušavanja. U: Čvorišćec D, Zadro R. Priručnik Algoritmi za racionalnu laboratorijsku dijagnostiku. Zagreb 2001; 11-5.
10. **Coen Herak D.** Pretrage uz bolesnika: primjena u koagulaciji. U: Rogić D, Stavljenić-Rukavina A. Laboratorijske pretrage uz bolesnika. Zagreb: Medicinska naklada, 2005; 73-82.
11. **Coen Herak D.** Trombociti i sustav zgrušavanja-interakcije. U: Zadro R, Trombociti. Zagreb: Medicinska naklada, 2008, 7-14.
12. **Coen Herak D.** Nove mogućnosti analize funkcije trombocita-pretrage uz bolesnika. U: Zadro R, Trombociti. Zagreb: Medicinska naklada, ožujak 2008, 45-50.
13. **Coen Herak D.** Uloga trombocita u alergijskoj upali. U: Zrinski Topić R, Alergije-novosti u dijagnostici i terapiji. Zagreb: Medicinska naklada, prosinac 2009, 9-14.
14. **Coen Herak D.** Diseminirana intravaskularna koagulacija. U: Zadro R, Koagulacija. Zagreb: Medicinska naklada, travanj 2010, 45-54.
15. **Coen Herak D.** Harmonizacija u području koagulacije. U: Flegar Meštrić Z i Honović L. Harmonizacija medicinsko-biokemijskih pretraga-2011. Zagreb: Medicinska naklada, travanj 2011, 55-61.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

### POLIMORFIZMI U GENIMA ZA KOAGULACIJSKE ČIMBENIKE I ENZIME METABOLIZMA HOMOCISTEINA U DJECE S MOŽDANIM UDAROM

**Désirée Coen Herak**

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

#### SAŽETAK

Moždani udar (MU) u djece heterogeni je poremećaj s višestrukom etiologijom, koja je još uvijek nepoznata u približno 30% slučajeva. Genetički čimbenici nisu do kraja karakterizirani, a raspodjela gena kandidata za nastanak MU različita je u pojedinim populacijama. U istraživanje je bilo uključeno 100 djece starosne dobi do 18 godina s potvrđenim MU i 100 zdrave djece podudarne po dobi i spolu djeci s MU. Napravljena je genotipizacija 14 polimorfizama u 12 gena kandidata koji kodiraju proteine uključene u sustav zgrušavanja i fibrinolize (FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -fibrinogen -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), ljudskih trombocitnih antigena (HPA-1, -2, -3 i -5), metabolizma homocisteina (MTHFR C677T, MTHFR A1298C) i intermedijernih rizičnih čimbenika (ACE I/D i ApoE  $\epsilon$ 2-4). Utvrđena je češća pojavnost MU u dječaka, koja je uočena i u svim ispitivanim podskupinama. Najveći rizik za nastanak MU zabilježen je u prvoj godini života, kao i 2,7 puta veći broj arterijskih ishemijskih MU (AIMU) u odnosu na hemoragijski MU (HMU). Rezultati genotipizacije potvrdili su prije opisanu povezanost FV Leiden s nastankom (pojavom) MU. Dokazana je i povezanost 4 polimorfizma (FV Leiden, FXIII-A Val34Leu, HPA-3 i apoE  $\epsilon$ 2-4) s AIMU i to različitih polimorfizama u pojedinim podskupinama prema spolu i dobi pojave AIMU, kao i povezanost kombinacija genotipova polimorfizama MTHFR C677T i MTHFR A1298 (CC/AC) i dvostrukog heterozigotnog oblika (GA/AG) polimorfizama FV Leiden i FV HR2 s AIMU, te kombinacije genotipova GA/AA s perinatalnim AIMU. Utvrđeno je i umjereno povećan rizik za pojavu HMU u nosioca haplotipa HA2 (HPA-1a2a3a-ACED). Ovo istraživanje ukazalo je na povezanost pojedinih dosad nedovoljno istraženih polimorfizama kao i kombinacija polimorfizama s etiologijom MU u djece u Hrvatskoj, što upotpunjuje i proširuje dosadašnje spoznaje o etiološkim rizičnim čimbenicima.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 147 stranica, 26 slika, 39 tablica, 298 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: moždani udar, djeca, genski polimorfizmi, koagulacijski čimbenici, metabolizam homocisteina

Mentor: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tihana Žanić Grubišić**, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
**Akademkinja Vida Demarin**  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćan: 20. veljače 2013.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

### POLYMORPHISMS IN COAGULATION FACTOR GENES AND ENZYMES OF HOMOCYSTEINE METABOLISM IN CHILDREN WITH STROKE

**Désirée Coen Herak**

**Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia**

#### SUMMARY

Although stroke in children is a relatively rare and heterogeneous disorder with a wide range of identified risk factors, the etiology of stroke is still undetermined in up to 30% of children. Taking into consideration that genetic risk factors are incompletely characterized at present and the frequency of genetic factors may vary among different populations, a genotype analysis was performed of 14 polymorphisms in 12 candidate genes encoding proteins of the coagulation and fibrinolysis systems (FV Leiden, FV HR2, FII G20210A,  $\beta$ -fibrinogen -455G>A, FXIII-A Val34Leu, PAI-1 4G/5G), human platelet alloantigens (HPA-1, -2, -3 and -5), homocysteine metabolism (MTHFR C677T, MTHFR A1298C) and intermediate risk factors (ACE I/D and apoE  $\epsilon$ 2-4) was performed. The subject group comprised 100 children with a confirmed diagnosis of stroke aged  $\leq 18$  years and 100 age- and sex-matched control subjects. Obtained results were also analyzed in gender-specific stroke group and subgroups according to the type of stroke: arterial ischemic (AIS) and hemorrhagic stroke (HS), and according to the time of stroke onset (perinatal and childhood AIS). The predominance of boys was found among (in) children with stroke and in all tested subgroups. The greatest risk for stroke was identified in the first year of life, and AIS was found 2.7 times more frequently than HS. This case-control study has confirmed the association between FV Leiden and stroke that was also observed in numerous studies so far, but it has also shown that other previously not reported polymorphisms (FXIII-A Val34Leu, HPA-3 and the combination of FV Leiden and FV HR2 polymorphisms) can be related to AIS in Croatian population. Analysis performed in gender-specific stroke subgroups revealed the association of different polymorphisms in boys (FXII-A Val34Leu, HPA-3 and combination of MTHFR polymorphisms) and girls (apoE  $\epsilon$ 4 allele). The strongest association (with  $OR > 10.0$ ) was found between FV Leiden and perinatal AIS for both genders whereas the lowest risk for perinatal AIS was observed in girls who were carriers of at least one HPA-3b allele. Obtained results have at least partially elucidated the role (impact) of new evaluated polymorphisms in the etiology of stroke in children and their impact according to gender, type of stroke and time of stroke onset.

Thesis is deposited in the Central library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and University Library.

Thesis includes: 147 pages, 26 figures, 39 tables, 298 references, original is in Croatian language.

Key words: pediatric stroke, children, genetic polymorphisms, coagulation factors, homocystein metabolism

Supervisor: **Renata Zadro, Ph.D.**, *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*

Reviewers: **Tihana Žanić Grubišić, Ph.D.**, *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*  
**Vida Demarin, Fellow of Croatian Academy of Sciences and Arts**  
**Karmela Barišić, Ph.D.**, *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*

This thesis accepted: February, 20, 2013