Polimorfizmi gena za trombocitne antigene i P-selektin u cerebrovaskularnim poremećajima dječje i odrasle dobi

Pavić, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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:163:391094

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Pavić

POLIMORFIZMI GENA ZA TROMBOCITNE ANTIGENE I P-SELEKTIN U CEREBROVASKULARNIM POREMEĆAJIMA DJEČJE I ODRASLE DOBI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Marina Pavić

PLATELET ANTIGEN AND P-SELECTIN GENE POLYMORPHISMS IN CEREBROVASCULAR DISORDERS IN CHILDREN AND ADULTS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARINA PAVIĆ

POLIMORFIZMI GENA ZA TROMBOCITNE ANTIGENE I P-SELEKTIN U CEREBROVASKULARNIM POREMEĆAJIMA DJEČJE I ODRASLE DOBI

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području Biomedicina i zdravstvo, polje Medicinska biokemija.

Doktorski rad u cijelosti je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Zadro u sklopu projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Protrombotički čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima u djece" (214212) i „Upala i udio farmakogenetike u razvoju i ishodu akutnih i kroničnih bolesti" (134-1340227-0200).

Najiskrenije zahvaljujem prof. dr. sc. Renati Zadro na pomoći pri izboru teme i svim korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovoga rada.

Zahvaljujem mag. med. biochem. Désirée Coen Herak, voditeljici Laboratorija za koagulaciju KBC Zagreb na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, kao i na stručnim i praktičnim savjetima.

Osobito sam zahvalna dipl. ing. med. biochem. Margareti Radić Antolic i mag. med. biochem. Ivani Horvat na pomoći kod eksperimentalnog rada molekularne dijagnostike, kao i djelatnicima Laboratorija za molekularnu hematologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb.

Zahvaljujem djelatnicima KBC-a „Sestre milosrdnice“, doc. dr. sc. Vanji Bašić Kes, doc. dr. sc. Nadi Vrkić, doc. dr. sc. Ani-Mariji Šimundić i dr. sc. Nori Nikolac na značajnoj pomoći tijekom izvođenja ovog rada.

Hvala mojoj obitelji!

SADRŽAJ

		strana
1.	**UVOD**	**1**
1.1.	Cerebrovaskularni poremećaji	1
1.1.1.	Moždani udar i TIA u dječjoj dobi	3
1.1.2.	Moždani udar i TIA u odrasloj dobi	5
1.2.	Genski čimbenici cerebrovaskularnih poremećaja	8
1.2.1.	Polimorfizmi trombocitnih antigena	10
1.2.1.1.	Polimorfizmi kompleksa GpIIb/IIIa	13
1.2.1.2.	Polimorfizmi kompleksa GpIa/IIa	15
1.2.1.3.	Polimorfizmi kompleksa GpIb/V/IX	17
1.2.2.	Polimorfizmi gena za P-selektin	19
1.2.3.	Točkasta mutacija faktora V zgrušavanja: FV G1691A (FV Leiden)	22
1.2.4.	Točkasta mutacija faktora II zgrušavanja: FII G20210A	23
2.	**RADNA HIPOTEZA**	**25**
3.	**CILJ RADA**	**27**
4.	**MATERIJALI I METODE**	**28**
4.1.	Ispitanici	28
4.1.1.	Uzorkovanje	29
4.2.	Metode određivanja	29
4.2.1.	Izolacija genomske DNA	29
4.2.2.	Određivanje koncentracije i ispitivanje kvalitete izolirane DNA	30
4.2.3.	Analiza DNA metodom PCR-SSP	30
4.2.3.1.	Genotipizacija HPA metodom PCR-SSP	31
4.2.3.2.	Genotipizacija PSEL-a metodom PCR-SSP	33
4.2.4.	Analiza DNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu	36
4.2.4.1.	Genotipizacija HPA metodom PCR-a u stvarnom vremenu	37
4.2.5.	Analiza DNA metodom PCR-RFLP	39
4.2.5.1	Utvrđivanje točkaste mutacije gena za FV G1691A (FV Leiden)	40
4.2.5.2.	Utvrđivanje točkaste mutacije gena za FII zgrušavanja krvi (FII G20210A)	42
4.3.	Statistička analiza	44
5.	**REZULTATI**	**46**
5.1.	Osnovne značajke ispitanika u ispitivanim skupinama i podskupinama	46
5.2.	Standardni čimbenici rizika u odraslih ispitanika	47

		strana
5.3.	Utvrđivanje učestalosti polimorfizama HPA u kontrolnoj skupini	50
5.4.	Utvrđivanje učestalosti polimorfizama PSEL-a u kontrolnoj skupini	55
5.5.	Utvrđivanje učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u kontrolnoj skupini	58
5.6.	Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e	60
5.6.1.	Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e u dječjoj dobi	60
5.6.2.	Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e u odrasloj dobi	65
5.7.	Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e	71
5.7.1.	Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e u dječjoj dobi	71
5.7.2.	Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e u odrasloj dobi	75
5.8.	Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e	79
5.8.1.	Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e u dječjoj dobi	79
5.8.2.	Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e u odrasloj dobi	83
5.9.	Učestalost haplotipova HPA i FV G1691A-PSEL u kontrolnim skupinama i skupinama s CVP-om	86
5.10.	Povezanost standardnih čimbenika rizika i ispitivanih polimorfizama u odraslih s CVP-om	88
5.11.	Regresijski model za procjenu čimbenika rizika CVP-a	90
6.	**RASPRAVA**	**92**
7.	**ZAKLJUČCI**	**106**
8.	**LITERATURA**	**108**
9.	**POPIS KRATICA**	**124**
10.	**SAŽETAK**	**126**
11.	**SUMMARY**	**127**
12.	**ŽIVOTOPIS**	**128**
13.	**POPIS RADOVA**	**129**
14.	**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**	**132**
15.	**BASIC DOCUMENTATION CARD**	**133**

1. UVOD

1.1. Cerebrovaskularni poremećaji

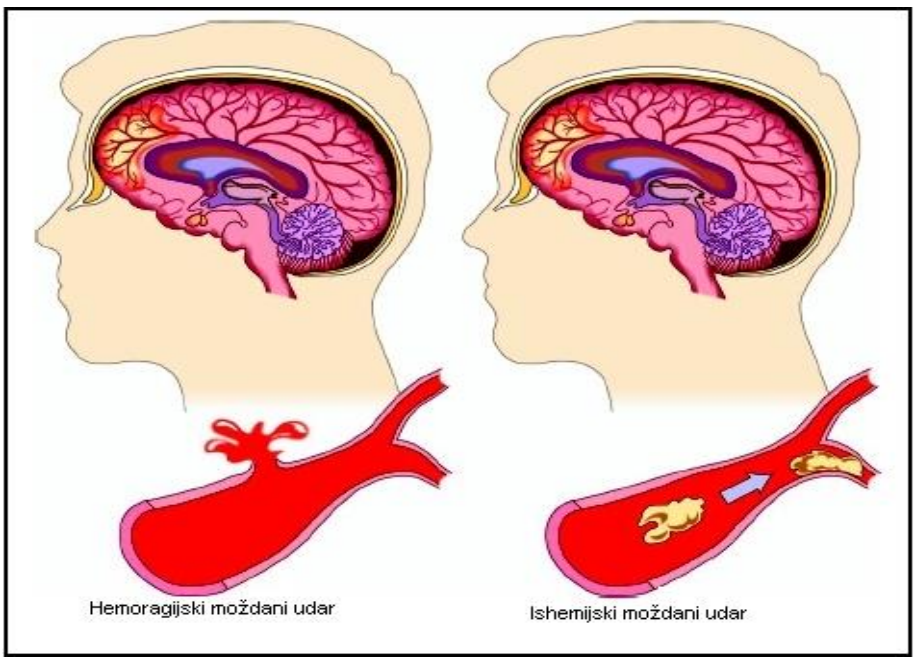
Medicinska terminologija pojmom cerebrovaskularni poremećaji (CVP) označava poremećaje u krvnom protoku arterija i vena koje opskrbljuju mozak, a mogu se podijeliti na ishemijske i hemoragijske pojave. Ishemijske pojave uključuju ishemijski moždani udar i prolazni ishemijski napad (od engl. *transient ischemic attack,* TIA), a hemoragijske pojave uključuju intracerebralnu ili subarahnoidalnu hemoragiju, kao i subduralne ili epiduralne hematome. Prema međunarodnoj klasifikaciji bolesti ICD-10 (od engl. *international classification diseases*) moždani udar (od engl. *cerebrovascular insult,* CVI) nalazi se u skupini cerebrovaskularnih bolesti (I60-I69), a one su sastavni dio bolesti krvožilnog sustava, dok se TIA nalazi u skupini epizodnih i paroksimalnih poremećaja (G40-G47) i sastavni su dio bolesti živčanog sustava.

CVI je karakteriziran iznenadnom neurološkom disfunkcijom koja je posljedica nedovoljne opskrbe moždanog tkiva krvlju. Živčane stanice koje ne dobivaju kisik u zahvaćenom krvožilnom području prestaju djelovati i odumiru ako se odmah ne uspostavi cirkulacija (1,2). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (od engl. *World Health Organization,* WHO) CVI je definiran kao sindrom brzog razvijanja simptoma žarišnog ili globalnog poremećaja moždanih funkcija koje traju 24 sata ili duže ili dovode do smrtnog ishoda bez drugog jasnog uzroka osim znakova oštećenja krvnih žila. Trećini CVI-a prethodi TIA. TIA je krvožilno prouzročena akutna epizoda prolazne žarišne moždane disfunkcije trajanja kraćeg od 24 sata i upozoravajući je znak CVI-a (1,3). Danas raspolažemo pouzdanim podacima da skoro 90% TIA traje kraće od 60 minuta, kao i da se u više od 60% slučajeva simptomi povlače unutar 30 minuta (4). Na temelju navedenih činjenica posljednjih godina predlaže se ponovno određivanje kriterija prema kojima TIA predstavlja kratku epizodu neurološke disfunkcije prouzročene žarišnom ishemijom mozga ili mrežnice, bez znakova oštećenja krvnih žila mozga na slikovnim prikazima, čiji klinički simptomi uobičajeno traju kraće od jednog sata. Naglasak je na duljini trajanja kliničkih znakova i na karakterističnim promjenama u slikovnim prikazima čime se definira CVI (5).

Na osnovu patofiziološkog uzroka nastalog oštećenja, CVI se razvrstava u dvije osnovne skupine (Slika 1):

1. Ishemijski CVI (iCVI) posljedica je začepljenja krvnih žila mozga. Začepljenje krvne žile može nastati ili uslijed stenoze i tromboze ili uslijed njezina začepljenja emboličkim materijalom. Obje situacije smanjuju moždani perfuzijski tlak i dovode do smrti stanica. Unutar određenih granica, protok krvi kroz mozak održava se autoregulacijom moždanih arterija i kolateralnom cirkulacijom. Prema TOAST klasifikaciji (Trial of Org 10172 Acute Stroke Treatment) iCVI je podijeljen u pet osnovnih podskupina u skladu s kliničkim simptomima i uzrocima CVI-a (6):
    a) CVI uslijed tromboze ili embolije velikih krvnih žila
    b) kardioembolijski CVI (embolije porijeklom iz srca)
    c) lakunarni CVI (začepljenje malih krvnih žila)
    d) CVI kao posljedica drugih uzroka
    e) CVI nepoznatog uzroka (kriptogeni)

2. Hemoragijski CVI uključuje intracerebralno i subarahnoidalno krvarenje. Intracerebralno krvarenje nastaje uslijed pucanja arterija na tipičnim mjestima kao posljedica neregulirane hipertenzije ili zbog pucanja arterija krvožilnih tvorbi (angioma, arteriovenske malformacije). Subarahnoidalno krvarenje rezultat je pucanja aneurizmi bazalnih moždanih krvnih žila (1,3).



Slika 1. Hemoragijski CVI (lijevo) u usporedbi s ishemijskim CVI-om (desno). Dostupno na: http: //www. healthchildren.com/. Datum pristupa: 13. 06. 2011.

1.1.1. Moždani udar i TIA u dječjoj dobi

CVI je vrlo složen medicinski problem i ubraja se među deset najčešćih uzroka smrtnosti u djece. U više od polovice bolesnika koji prežive CVI dolazi do mentalne ili motoričke onesposobljenosti, a u trećine uslijedi ponovljeni CVI (7). Prema prvoj populacijskoj studiji iz 1970. godine, učestalost CVI-a iznosila je 2,52/100 000 djece godišnje (8). Primjenom suvremenijih dijagnostičkih postupaka i povećanjem broja preživjele djece s bolestima koje su sklonije razvoju CVI-a, dobivena je i veća učestalost od 1,3 do 13/100 000 djece godišnje (7,9,10). Učestalost CVI-a izrazito je ovisna o dobi u kojoj bolest nastaje i o prisutnim čimbenicima rizika za nastajanje bolesti. Tako je u djece u prve dvije godine života u odnosu na stariju djecu CVI značajno zastupljeniji (11). Učestalost iCVI-a iznosi 0,6 do 7,9/100 000 djece godišnje, a hemoragijskog CVI-a 1,5 do 5,1/100 000 djece godišnje (12). U djece veća je učestalost iCVI-a u muškom spolu u odnosu na ženski, te je učestaliji u crnoj rasi u odnosu na bijelu (9,13). O učestalosti TIA-e ne postoje literaturni podaci, osim da se vrlo rijetko pojavljuje u djece (12).

Etiologija bolesti je vrlo složena i značajno se razlikuje u odnosu na odraslu populaciju. Ponajprije ovisi o vrsti CVP-a, odnosno o tipu i težini oštećenja moždanog tkiva koje se očituje kao ishemijski ili hemoragijski CVI. CVI kao i TIA u dječjoj dobi mogu biti uzrokovani nasljednim i stečenim bolestima. Prema sadašnjim podacima poznato je najmanje stotinu čimbenika rizika za CVI u dječjoj dobi (Tablica 1), ali u više od jedne trećine djece uzrok bolesti i dalje ostaje nepoznat (7,9,12,13,14).

Poznati čimbenici rizika iCVI-a su srčani, hematološki i metabolički poremećaji, te krvožilne bolesti i infekcije. Prema sadašnjim podacima srčani poremećaji predstavljaju najčešći poznati uzrok iCVI-a, osobito urođene i stečene srčane bolesti. Trećina do polovice oboljele djece od iCVI-a su srčani bolesnici (7). Od hematoloških bolesti, anemija srpastih stanica jedna je od najčešćih uzroka iCVI-a osobito u djece crne rase. Prirođeni ili stečeni poremećaji koagulacije, kao i određene metaboličke abnormalnosti predisponirajući su čimbenici rizika za iCVI. Od stečenih uzroka u etiologiji iCVI-a značajno mjesto zauzimaju i uzročnici sistemnih infekcija te gnojnih i seroznih upala mozga i moždanih ovojnica (12).

Hemoragijski CVI u 80% slučajeva javlja se u kortikalnoj regiji, a samo u 10% slučajeva u području bazalnih ganglija. Poznati uzroci hemoragijskog CVI-a su krvožilne malformacije, hematološki poremećaji, trauma, te zloćudne bolesti. Krvožilne malformacije, osobito arteriovenske, predstavljaju jedan od glavnih uzroka krvarenja (7,9,13,14,15).

Tablica 1. Najčešći uzroci CVI-a u dječjoj dobi

Uzroci ishemijskog CVI-a	Uzroci hemoragijskog CVI-a
Srčane bolesti: Urođene srčane bolesti Reumatske srčane bolesti Infektivni endokarditis Komplikacije operacije Hematološki poremećaji: Anemija srpastih stanica Trombocitoza Policitemija Leukemija Nedostatak AT, PC i PS Antifosfolipidna protutijela Infektivni vaskulitis: Piogeni Tuberkuloza Gljivični Humani imunodficijentni virus Neinfektivni vaskulitis: Sistemni eritemski lupus Nodozni poliarteritis Moyamoya sindrom Trauma Tupa cervikalna arterijska trauma Arterijska disekcija Urođene metaboličke bolesti: Homocistinurija Mitohondrijska miopatija Encefalopatija Laktoacidoza Toksični: Metamfetamini Kokain	Krvožilne malformacije: Arteriovenozne malformacije Aneurizme Angiomi Hematološki poremećaji: Leukemija Trombocitopenija Hemofilija Sekundarna koagulopatija (jetra) DIK Trauma Zloćudne bolesti

Kliničko ispoljavanje CVP-a u dječjoj dobi vrlo je raznoliko uslijed složenosti strukture mozga i njegovog krvožilnog sustava a razlikuje se s obzirom na dob, osnovni uzrok bolesti i mjesto napada. Glavna klinička slika iCVI-a je epileptički napad i razvoj hemipareze, a u bolesnika s hemoragijskim CVI-om tipični su simptomi glavobolje i povraćanja (7,12).

Djeca s ozljedama iste težine i lokalizacije imaju bolju prognozu nego odrasli. To je posljedica "plasticiteta" središnjeg živčanog sustava kod djece, odnosno sposobnost mozga u razvoju da preostali zdravi dio mozga preuzme funkciju oštećenoga. Stoga je oporavak puno bolji što je dijete mlađe (16).

1.1.2. Moždani udar i TIA u odrasloj dobi

Učestalost CVI-a u odrasloj dobi značajno je veća nego u djece i iznosi 63,0 do 239,3/100 000 odraslih godišnje (17). Svjetski statistički podaci ukazuju na to da je CVI treći uzrok smrtnosti i vodeći uzrok invaliditeta populacije suvremenog svijeta (18). Prema epidemiološkim podacima za 2008. godinu od CVI-a u Hrvatskoj je umrla 5 031 osoba, što predstavlja 9,6% svih smrtnih ishoda, odnosno CVI je drugi uzrok smrtnosti u našoj populaciji (19). Oko 85% CVI-a čine iCVI, a ostalih 15% uzrokovano je hemoragijom (20).

Najčešći uzrok CVI-a u odraslih je ateroskleroza, a čimbenici rizika koji dovode do kliničke prezentacije ateroskleroze i doprinose razvoju promjena na krvnim žilama, područje su intenzivnog istraživanja. Standardni čimbenici rizika CVI-a u odraslih mogu se podijeliti na nepromjenjive i promjenjive.

Nepromjenjivi čimbenici su oni na koje se ne može utjecati, a to su: dob, spol, rasa i obiteljska anamneza.
Prema literaturnim podacima nakon šezdesete godine života rizik za nastanak CVI-a raste približno 10% sa svakim sljedećim desetljećem starosti. Budući da se prema epidemiološkim studijama hrvatsko pučanstvo ubraja u stariju populaciju, može se očekivati porast učestalosti CVI-a. Poznato je da su muškarci skloniji nastanku CVI-a u generativnoj životnoj dobi, međutim nakon menopauze rizik nastanka CVI-a raste u ženskoj populaciji. Ova prethodna činjenica kao i podatak kako je prosječni vijek žena duži, dovodi do pojave da u starijoj životnoj dobi u apsolutnom broju ima više žena s CVI-om (20,21). Učestalost CVI-a 2 do 3 puta je veća među populacijom crnaca u odnosu na bijelce (22), a u populaciji Japana, zamjetna je značajno veća učestalost intracerebralne hemoragije i lakunarnog CVI-a u odnosu na zemlje zapadne Europe (23). Podaci o CVI-u u obiteljskoj anamnezi i/ili podaci o

preboljelom CVI-u ili TIA-i u osobnoj anamnezi značajno povećavaju sklonost nastanku CVI-a u bolesnika. Prethodna TIA ili CVI vodeći su čimbenici rizika za ponovljeni CVI (20).

Na promjenjive čimbenike rizika može se utjecati, oni su vezani uz stil života, navike, bolesti i patološke promjene. U promjenjive čimbenike CVI-a spadaju pušenje, prekomjeran unos alkohola, hipertenzija, šećerna bolest, dislipidemija, pretilost, bolest karotidnih arterija, fibrilacija atrija, zatajenje srca i drugi oblici bolesti srca (24).

Pušenje cigareta izdvojeno je kao nezavisan čimbenik rizika za nastanak iCVI-a u oba spola (25,26). Rizici izravno ovise o dozi odnosno količini popušenih cigareta, pušači koji puše više od 40 cigareta dnevno imaju dva puta veći rizik oboljenja od CVI-a, u odnosu na pušače koji puše manje od 10 cigareta dnevno (25,26,27). Novija istraživanja pokazala su da je pijenje malih količina alkohola (do dva pića dnevno) povezano sa snižavanjem rizika za nastanak iCVI-a (28,29). Naprotiv, prekomjerno konzumiranje alkoholnih pića povezano je s povećanim rizikom nastanka ishemijskog i hemoragijskog CVI-a (29). Hipertenzija je najznačaniji čimbenik rizika za nastanak CVI-a koja se javlja u više od 60% bolesnika (30). Jedan je od čimbenika na koji se značajno može utjecati terapijskim metodama, odnosno liječenjem povišenog tlaka bitno se smanjuje rizik od nastanka CVI-a (31). Rezultati studije SHEP (engl. *Systolic Hypertension in the Elderly Program*) pokazali su kako liječenje izolirane sistoličke hipertenzije u osoba starijih od 60 godina dovodi do smanjenja učestalosti CVI-a za 36% (32). Šećerna bolest prepoznata je kao nezavisan čimbenik rizika za nastanak iCVI-a u oba spola. Osobe sa šećernom bolesti imaju 1,8 do 6 puta veći rizik oboljenja od iCVI-a (33). U bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti, intenzivna terapija preparatima sulfonilureje i/ili inzulinska terapija, smanjili su mikrovaskularne sistemske komplikacije osnovne bolesti, ali ne i makrovaskularne komplikacije kao što je CVI (34). Iako dosadašnje studije nisu pokazale značajnu povezanost između koncentracije serumskog kolesterola i CVI-a, prema meta-analizama, statini mogu značajno smanjiti rizik od nastanka CVI-a (oko 20%), snižavanjem koncentracije LDL-kolesterola (35,36). Prekomjerna tjelesna težina izolirani je čimbenik rizika ateroskleroze, ali je češće udružena s drugim čimbenicima poput hipertenzije, šećerne bolesti i hiperlipidemije. Tjelesna težina kao čimbenik rizika CVI-a zastupljena je u oba spola (37,38). Fibrilacija atrija i ostale srčane bolesti bitna su podloga za nastanak kardioembolijskog CVI-a. Fibrilacija atrija značajno povisuje učestalost prvog CVI-a, otprilike za pet puta. Otkrivanjem, uklanjanjem ili modificiranjem čimbenika rizika moguće je u značajnoj mjeri smanjiti učestalost moždanog udara što je dokazano u zemljama zapadne

Europe i sjeverne Amerike gdje je zadnjih desetljeća djelovanjem na čimbenike rizika smanjena učestalost obolijevanja od moždanog udara (20).

TIA u odrasloj dobi etiološki odgovora CVI-u. S obzirom da se veliki broj bolesnika s TIA-om ne javlja liječniku, učestalost TIA-e teško je procijeniti. Prema dostupnim podacima iz literature u europskoj populaciji učestalost TIA-e kreće se od 21 do 42/100 000 odraslih godišnje (39), a u američkoj populaciji 83/100 000 odraslih godišnje (40). Kao i kod CVI-a pripadnost nebjelačkoj etničkoj populaciji i muški spol, značajno doprinose učestalosti TIA-e. Starenjem populacije učestalost TIA-e eksponencijalno raste. Medicinski značaj TIA-e je golem, jer bolesnici s TIA-om kao što je spomenuto imaju izrazito povišen rizik od CVI-a i koronarne smrti. Tako se očekuje da će čak 8% bolesnika s TIA-om doživjeti CVI u tijeku sljedećih 30 dana, 10,5% tijekom prvih 90 dana, 5% godišnje u razdoblju od sljedeće 3 godine i još 3% godišnje tijekom svih narednih godina (4).

Klinička slika CVP-a u odraslih je vrlo različita ovisno o zahvaćenoj moždanoj regiji, a najčešći simptomi su: oduzetost ili slabost jedne strane tijela, poremećaj govora, naglo zamagljenje ili gubitak vida na jedno oko, nagla jaka glavobolja uz povraćanje bez jasnog uzroka te iznenadne poteškoće hoda ili gubitak ravnoteže (2). Nakon CVI-a, čak u trećine bolesnika dolazi do smrtnog ishoda, u trećine bolesnika ostaju trajni neurološki deficiti i ovisni su o tuđoj pomoći, a tek trećina ih se oporavi (20).

1.2. Genski čimbenici cerebrovaskularnih poremećaja

Osim standardnih čimbenika rizika na CVP-e osobito u djece i mlađoj dobi odraslih, značajnu ulogu imaju i genski čimbenici. Epidemiološka istraživanja kao i studije na životinjskim modelima pružaju dokaze o značaju tih čimbenika u patogenezi CVI-a. Bak i sur. (41) u istraživanju provedenom na blizancima oboljelim od CVI-a pokazali su da je rizik oboljenja dva puta veći u jednojajčanih blizanaca, u odnosu na dvojajčane. Osim istraživanja blizanaca i obiteljske studije potvrđuju gensku komponentu CVI-a. Framingham studija pokazala je da osobe s CVI-om ili TIA-om u obiteljskoj anamnezi imaju značajno povećanu mogućnost CVP-a u odnosu na potomstvo bez pozitivne anamneze (42). U jednoj velikoj studiji u kojoj je obuhvaćeno više od 30 000 ispitanika pokazano je da čimbenici rizika poput pušenja, šećerne bolesti, hipertenzije, srčane bolesti ne mijenjaju pojavnost CVI-a u osoba koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu (43).

Neuobičajeno veliki broj rijetkih monogenskih poremećaja također mogu uzrokovati CVI različitih patofizioloških mehanizama. Jedan od najboljih primjera je mutacija gena za NOTCH3 koja uzrokuje CADASIL (od engl. *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infartcs and leucoencephalopathy*), stanje koje dovodi do lakunarnog CVI-a i krvožilne demencije. I mnogi drugi monogenski poremećaji povezani su s CVI-om poput MELAS (od engl. *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke*), Fabrijeve bolesti, Moyamoya bolesti, neurofibromatoze tipa 1, Ehlers-Danlosovog sindroma tipa IV, Marfanovog sindroma te ostalih (44).

Genski čimbenici CVP-a nedovoljno su istraženi, a i njihova učestalost značajno se razlikuje u pojedinim populacijama. Dosada nije evidentiran jedan lokus koji bi imao značajan učinak na CVI. Epidemiologija CVP-a je multifaktorijalna i poligenska uslijed velikog broja gen-gen i gen-okolišnih međudjelovanja. Najčešće ispitivani genski kandidati za CVI mogu se podijeliti u pet skupina: sustav renin-angiotenzin, stvaranje dušičnog oksida (NO), metabolizam lipida, metabolizam homocisteina i hemostaza (45,46).

Najviše proučavani gen sustava renin-angiotenzin je gen za angiotenzin konvertirajući enzim (od. engl. *angiotensin converting enzyme*, ACE), osobito insercijski/delecijski polimorfizam prisutan u intronu 16 gena. Brojne neovisne studije pokazale su pozitivnu povezanost ovog polimorfizma s CVI-om (47,48), ali isto tako postoje ispitivanja koja tu povezanost nisu

dokazala (49,50). U ispitivanju povezanosti polimorfizma M235T gena ACE s CVI-om također postoje proturječnosti.

Gen koji kodira endotelnu NO sintazu potencijalni je kandidat CVI-a, jer ima značajnu ulogu u endotelnoj funkciji. Elbaz i sur. (51) kao i Casas i sur. (52) pokazali su povezanost polimorfizma Glu298Asp gena za NO sintazu i ishemijskih zbivanja, dok u drugom ispitivanju ta povezanost nije bila dokazana (53).

U metabolizam lipida uključeni su brojni geni koji kodiraju apolipoproteine, lipoproteinske receptore i enzime. Apolipoprotein E (apo E) posreduje u vezivanju lipidnih čestica na specifične lipoproteinske receptore, te sudjeluje u održavanju i obnavljanju neuronskih membrana. Postoji nekoliko studija u kojima je prisutna povezanost gena za apo E s CVI-om (54,55,56).

Genski defekt homocisteinskog metabolizma može dovesti do snažne hiperhomocisteinemije i ateroskleroze. Genska varijanta metilen tetrahidrofolat reduktaze (C677T) proučavana je u povezanosti s CVI-om, ali u većini ispitivanja nije nađena povezanost, za razliku od meta-analize Casasa i sur. (52) u kojoj je ona potvrđena.

Istraživani su brojni geni koji sudjeluju u hemostazi i protrombotičkim stanjima u bolesnika s CVP-om (FV, FVII, FXIII, protrombin, fibrinogen, PAI-1, polimorfizam trombocitnih glikoproteinskih receptora (GP)), ali dobiveni rezultati također su vrlo proturječni.

U posljednje vrijeme sve veća pozornost posvećuje se i polimorfizmima gena koji kodiraju upalne medijatore, te imaju značajnu ulogu u nastanku ateroskleroze, disfunkciji endotela i samim time mogu doprinijeti razvitku i progresiji CVI-a (polimorfizmi gena za CRP, interleukina 4, E-selektina, P-selektina).

1.2.1. Polimorfizmi trombocitnih antigena

Trombociti su maleni stanični fragmenti bez jezgre, koji imaju značajnu ulogu u održavanju normalne hemostaze, ali isto tako sudjeluju u brojnim patofiziološkim procesima uključujući trombozu, hemoragiju, upalu, tumorski rast i metastaze (57,58).
Na membrani neaktiviranih trombocita nalazi se više od 45 različitih struktura koje su podijeljene u pet osnovnih skupina: adhezijske molekule (integrini, selektini, proteini bogati leucinom, imunoglobulini), imunosne molekule (MHC klase I, Fc receptori, C receptori, regulatori aktivacije komplementa), receptori (receptori za primarne agoniste, inhibirajući receptori, višenamjenski receptori), antigeni krvnih grupa i ostale molekule (59,60). Jedna od osnovnih uloga trombocita u primarnoj hemostazi je adhezija koja je potpomognuta adhezijskim molekulama koje su grupirane u glikoproteinske kompleks/receptore za: kolagen (GPIa/IIa), fibronektin (GPIc/IIa), laminin (GPIc'/IIa), von Willebrandov faktor (GPIb/V/IX) i vitronektin. Kao odgovor na adheziju dolazi do aktivacije trombocita i međudjelovanja trombocit-trombocit preko vezanja kompleksa GPIIb/IIIa na von Willebrandov faktor i fibrinogen u cirkulaciji (58,60,61,62,63).

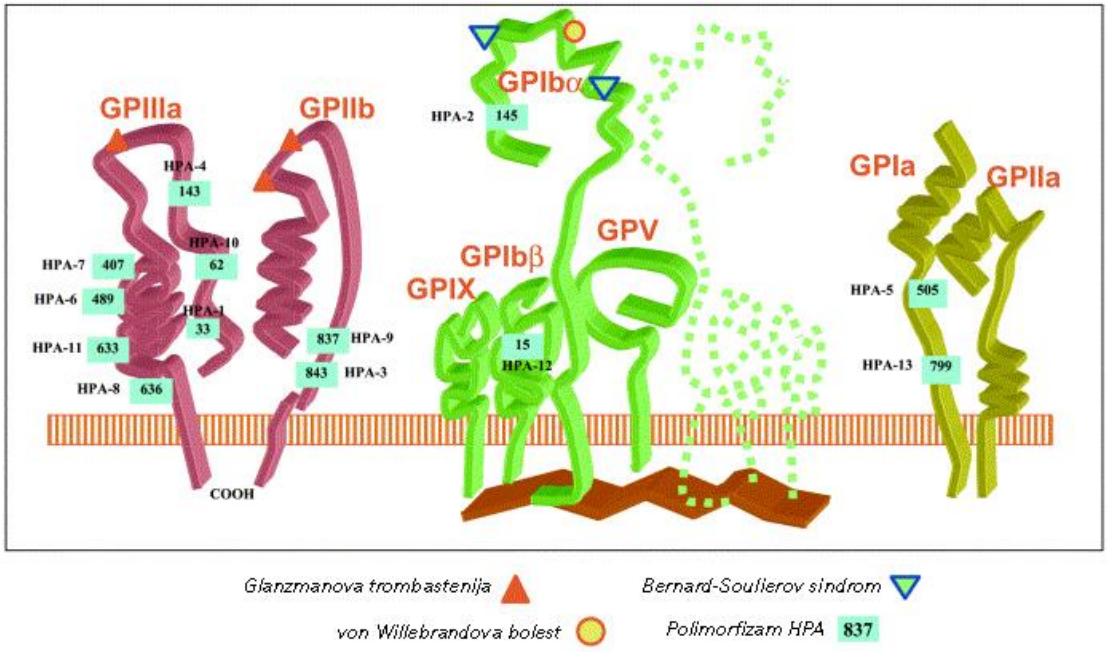
Prije 35 godina pokazano je da nedostatak GPIIb/IIIa na površini trombocita uzrokuje Glanzmannovu trombasteniju, a zatim su otkriveni i mnogi drugi nasljedni poremećaji trombocitnih GP poput mutacije u genima koji kodiraju GPIb/V/IX uzrokujući različite oblike Bernard-Soulierovog sindroma, kao i trombocitni oblik von Willebrandove bolesti (60,63,64).

Određeni trombocitni GP su polimorfni, odnosno u populaciji se javljaju u dva ili više različitih alelnih oblika, a najčešće nastaju kao rezultat zamjene jednog nukleotida u molekuli DNA (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP), odnosno jedne aminokiseline u glikoproteinskoj molekuli. Polimorfni epitopi trombocitnih membranskih GP-a nazvani su ljudski trombocitni antigeni (od engl. *human platelet alloantigen,* HPA). Polimorfizmi trombocitnih GP mogu djelovati na imunološka i funkcionalna svojstva trombocita (59,63).

Većim dijelom ovi polimorfizmi su otkriveni određivanjem aloantitijela koja nastaju u osoba za vrijeme trudnoće, transfuzije krvi ili transplantacije. Prvi trombocitni aloantigen Zw^a opisao je van Loghem davne 1959. godine u bolesnika s kliničkom slikom posttransfuzijske purpure. Od tada su opisana 24 aloantigena. 1989. godine Newman i sur. (59) su utvrdili da

HPA-1a/b (Zw $^{a/b}$) polimorfizam nastaje uslijed zamjene jedne aminokiseline na položaju 196 GPIIIa cDNA.

Povijesno, aloantigenima specifičnim za trombocite dodijeljivani su nazivi prema bolesnicima od kojih su dobivena aloantitijela. Kako bi se izbjegla dotadašnja zbrka u nazivlju, 1990. godine Radna skupina za serološka ispitivanja trombocita načinila je novi sustav označavanja HPA, uvodeći određena pravila (59,64,65). Uvođenjem novog nazivlja HPA antigenima pridruženi su brojevi redoslijedom njihova objavljivanja: šest bialelnih sustava antigena (HPA-1-5 i HPA-15) i određeni broj antigena male učestalosti (HPA-6w-14w i HPA-16w) koji su smješteni na šest trombocitno membranskih GP-a: GPIa, GPIbα, GPIbβ, GPIIb, GPIIIa i GPI-CD109 (Slika 2). Na GPIIa, GPV i GPIX nisu prisutni polimorfizmi. Prema nazivlju HPA, alelni antigeni koji se učestalije pojavljuju označuju se s „a“, a manje učestaliji oznakom „b“ (63). Dosadašnji sustavi HPA opisani kronološkim slijedom, orginalnim imenom, fenotipskom učestalošću u bijelaca i nazivljem GP-a prikazani su u Tablici 2. Za šest bialeličnih sustava HPA postoje pouzdani podaci o alelnoj učestalosti i značajnoj razlici unutar populacija.



Slika 2. Trombocitno specifični kompleksi glikoproteina s pripadajućim polimorfizmima**.** (Prikazana je samo jedna polovica kompleksa GPIb/V/IX. Legenda ukazuje na odgovarajuće polimorfizme i nasljedne bolesti.) Prema: Rožman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. Transpl Immunol 2002;10:165-81.(60).

Tablica 2. Ljudski trombocitni antigeni (HPA)

Sustav	Antigen	Orginalno ime	Učestalost fenotipa	Glikoprotein
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw^a,PI^{A1} Zw^b,PI^{A2}	97,9% 28,8%	GPIIIa
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko^b Ko^a, Sib^a	99,9% 13,2%	GPIbα
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak^a,Lek^a Bak^b	80,9% 69,8%	GPIIb
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk^b,Pen^a Yuk^a,Pen^b	99,9% 0,1%	GPIIIa
HPA-5	HPA-5a HPA-5b HPA-6bw HPA-7bw HPA-8bw HPA-9bw HPA-10bw HPA-11bw HPA-12bw HPA-13bw HPA-14bw	Br^b, Zav^b Br^a, Zav^a Ca^a, Tu^a Mo^a Sr^a Max^a La^a Gro^a Iy^a Sit^a Oe^a	99,0% 19,7% 0,7% 0,2% 0,01% 0,6% 1,6% 0,25% 0,4% 0,25% 0,17%	GPIa GPIIIa GPIIIa GPIIIa GPIIb GPIIIa GPIIIa GPIbβ GPIa GPIIIa
HPA-15	HPA-15a HPA-15b HPA-16bw	Gov^b Gov^a Duv^a	74% 81%	CD109 GPIIIa

Postoje i antigeni bez HPA oznake. Oni su serološki određeni ali njihova genska osnova još nije poznata (Tablica 3).

Tablica 3. Trombocitni antigeni bez oznake HPA

Antigen	Glikoprotein
Va^a	GPIIb/IIIa
Mou^a	Nepoznat

Molekularna osnova 22 antigena je razriješena. U svima njima osim jednoga, razlika je u zamjeni jednog nukleotida, dok kod HPA-14w dolazi do delecije triju nukleotida (59). U Tablici 4 antigeni su poredani prema genskoj osnovi i podacima o poziciji zamjene nukleotida i aminokiselina. Broj alela po genu se razlikuje. Gen ITGB3 koji kodira trombocitni GPIIIa posjeduje najveći broj alela, čak 10, a ostali geni koji kodiraju druge GP posjeduju samo 2 ili 3 alela (59,65).

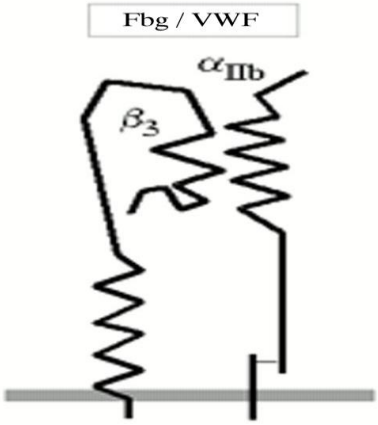
Tablica 4. Polimorfizmi sustava HPA

Antigen	Glikoprotein	Gen	Kromosom	Zamjena nukleotida	Zamjena aminokiseline
HPA-1	GPIIIa	ITGB3	17	176 T>C	Leu33Pro
HPA-2	GPIbα	GP1BA	17	482 C>T	Thr145Met
HPA-3	GPIIb	ITGA2B	17	2621 T>G	Ile843Ser
HPA-4	GPIIIa	ITGB3	17	506 G>A	Arg143Gln
HPA-5	GPIa	ITGA2	5	1600 G>A	Glu505Lys
HPA-6w	GPIIIa	ITGB3	17	1544 G>A	Arg489Gln
HPA-7w	GPIIIa	ITGB3	17	1297 C>G	Pro407Ala
HPA-8w	GPIIIa	ITGB3	17	1984 C>T	Arg636Cys
HPA-9w	GPIIb	ITGA2B	17	2602 G>A	Val837Met
HPA-10w	GPIIIa	ITGB3	17	263 G>A	Arg62Gln
HPA-11w	GPIIIa	ITGB3	17	1976 G>A	Arg633His
HPA-12w	GPIbβ	GP1BB	22	119 G>A	Gly15Glu
HPA-13w	GPIa	ITGA2	5	2483 C>T	Thr799Met
HPA-14w	GPIIIa	ITGB3	17	1909-1911 del AAG	del Lys611
HPA-15w	CD109	CD109	6	2108 C>A	Ser703Tyr
HPA-16w	GPIIIa	ITGB3	17	497 C>T	Thr140Ile

1.2.1.1. Polimorfizmi kompleksa GPIIb/IIIa

Glikoproteinski kompleks IIb/IIIa predstavlja integrinski kompleks koji se sastoji od nekovalentno povezane α_{IIb} i β_3 podjedinice. Najzastupljeniji je receptor na površini trombocita s 50 000 do 80 000 kopija i jedinstveni je biljeg trombocitne stanične linije (Slika 3). Glikoproteinski kompleks IIb/IIIa na aktiviranim trombocitima omogućava prepoznavanje aminokiselinske sekvence Arg-Gly-Asp (RGD) na adhezivnim proteinima (fibrinogenu, vitronektinu, fibronektinu i VWF-u) i njihovo vezivanje (60,61,62,66).

Geni koji kodiraju GPIIb (CD41, α_{IIb}) odnosno GPIIIa (CD61, β_3), ITGA2B i ITGB3, smješteni su na dužem kraku kromosoma 17 unutar segmenta od 260kb. GPIIIa glikolizirani je jednolančani protein koji se sastoji se od 3 domene: veliki vanstanični N-terminalni dio koji je križno povezan s 28 disulfidnih veza, transmembransko područje i kratki citoplazmatski segment. Na GPIIIa nalazi se prepoznavajuće područje RGD. GPIIb sastoji se od vanstaničnog teškog lanca kovalentno povezanog disulfidnom vezom s lakim lancom transmembranskog proteina (60,62,67).



Slika 3. GPIIb/IIIa (integrinski kompleks $\alpha_{IIb}\beta_3$). Prema: Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Kunicki TJ. Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000;222-40. (61).

Na kompleksu GPIIb/IIIa poznato je 10 aloantigena HPA, od kojih je devet posljedica zamjene jednog nukleotida. Rijetki epitop HPA-14, rezultat je delecije triju nukleotida i nastaje najvjerojatnije mutacijom alela HPA-1b. Na GPIIIa nalaze se epitopi HPA-1, HPA-4, HPA-6, HPA-7, HPA-8, HPA-10, HPA-11 i HPA-14, a na GPIIb samo epitopi HPA-3 i HPA-9 (60).

Dimorfizam HPA-1a/b u GPIIIa posljedica je zamjene nukleotida timina u citozin, što rezultira zamjenom aminokiseline leucin u prolin na položaju 33 (Leu33Pro). Učestalost alela HPA-1b je 15% kod bijelaca (68), 8% kod crnaca (69), dok je među Azijatima vrlo rijetka (70). HPA-4a/4b nastaje uslijed polimorfizma Arg143Gln na GPIIIa, u bijelaca homozigotni oblik a/a prisutan je u 99,9% slučajeva. Na GPIIb javlja se polimorfizam Ile843Ser posljedica čega je dimorfizam HPA-3a/3b. Učestalost alela HPA-3b podjednaka je u bijelaca, crnaca i Azijata, te iznosi se oko 40% (68,69,70).

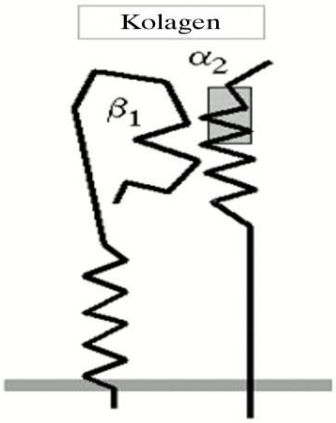
U posljednjih deset godina trombocitni polimorfizmi GP-a dobivaju sve veće značenje kao mogući protrombotički čimbenici rizika, osobito nakon što su Weiss i sur. 1996. godine (71) objavili značajnu povezanost alela Pro33 i akutnog srčanog zbivanja. Dobivena učestalost alela HPA-1b bila je 2,1 puta veća u bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu, a u podgrupi bolesnika mlađih od 60 godina 3,4 puta veća. Podaci o povezanosti ovih genskih čimbenika s iCVI-om daleko su manje istraženi i prikazani u literaturi. Prema studiji iz 2001. godine alel

HPA-1b predstavlja neovisni čimbenik rizika za ishemijski cerebrovaskularni događaj u odraslih (OR = 3,4 (1,5-7,8)) (72). Opsežnije istraživanje koje je obuhvatilo 609 bolesnika s akutnim iCVI-om i 435 kontrola ne nalazi značajnu razliku u genotipskoj raspodjeli HPA-1 između skupina. Izdvajanjem skupine bolesnika mlađih od 50 godina dobivena je povećana učestalost alela HPA-1b u bolesnika s iCVI-om (73). Prema rezultatima Saidi i sur. (74) dobivena je značajna povezanost homozigotnog alela HPA-1b s iCVI-om i prvi put je dokazana povezanost trombocitnog haplotipa (HPA-1b, HPA-2a, HPA-3b, HPA-4a) s iCVI-om. U ostalim ispitivanjima u odraslih povezanost HPA-1b s iCVI-om nije bila dokazana (75,76,77,78). U dosadašnje dvije studije u djece polimorfizam HPA-1 ne povezuje se s CVI-om i TIA-om (79,80). Funkcionalni utjecaj ovog polimorfizma na trombocitnu reaktivnost uglavnom je nepoznat. Naime, Leu33Pro alel nije smješten u funkcionalnom području gena, ali on najvjerojatnije uzrokuje strukturne promjene GPIIb/IIIa receptora koje dovode do različitog vezivanja liganda na receptor (81).

Aloantigen HPA-3 i homozigotni alel b prema studiji Reinera i sur. povezan je s povećanim rizikom od iCVI-a u žena mlađih od 45 godina s dijabetesom ili hipertenzijom (75). Prema ostalim studijama odraslih bez obzira na dobnu strukturu ispitanika, povezanost HPA-3 i CVP-a nije bila prisutna (77,82). Rezultatima našeg objavljenog rada dokazali smo statistički značajnu razliku između polimorfizma HPA-3 kod djece s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu alel HPA-3b predstavlja smanjeni rizik za nastanak arterijskog iCVI-a (80).

1.2.1.2. Polimorfizmi kompleksa GPIa/IIa

Glikoproteinski kompleks Ia/IIa ili VLA-2 (od. engl. *very late antigen*) predstavlja integrinski kompleks koji se sastoji od nekovalentno povezane α_2 i β_1 podjedinice (Slika 4). Na membrani trombocita nalazi se 800 do 2 800 kopija ovog kompleksa. Može se također naći na aktiviranim limfocitima T i nekim drugim stanicama (60,61,62).
GPIa/IIa posreduje u adheziji trombocita na fibrilarne (tip I i III) ili nefibrilarne (tip IV i VI) kolagene uz pomoć magnezija u području domene I.



Slika 4. GPIa/IIa (integrinski kompleks $\alpha_2\beta_1$). Prema: Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Kunicki TJ. Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000;222-40. (61).

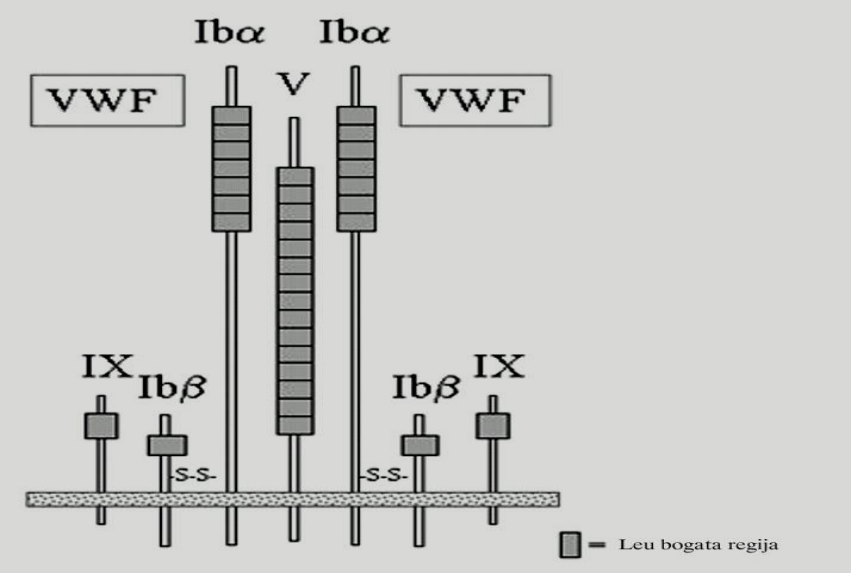
U kompleksu GPIa/IIa samo je GPIa polimorfan. Gen ITGA2 koji kodira GPIa, smješten je na kromosomu 5. GPIa lanac predstavlja jednolančanu molekulu koja sadrži domenu I te tri ponavljajuća područja kalcija. Na kompleksu GPIa/IIa postoje 2 aloantigena, HPA-5 i HPA-13 (60,62).

Dvije zamjene nukleotida na poziciji 807 i 873 gena za GPIa povezane su s različitom gustoćom glikoproteinskog kompleksa na površini trombocita (60,61,66).
Dimorfizam HPA-5a/5b u GPIa posljedica je zamjene gvanina u adenin što rezultira zamjenom aminokiseline glutamin u lizin na položaju 505 (Glu505Lys). O antigeničnosti HPA-5 na drugim stanicama osim trombocita, zasada ne postoje spoznaje. Rjeđa varijanta HPA-5b alela pojavljuje se u oko 11% bijelaca (68), 3% Azijata (70) i 21% crnaca (69).

U dosadašnjim ispitivanjima alel HPA-5b nije bio povezan s iCVI-om u odraslih (75,77). Prema rezultatima naše studije kod djece prisutnost alela HPA-5b povezana je s povećanim rizikom za TIA-u (80).

1.2.1.3. Polimorfizmi kompleksa GPIb/V/IX

Kompleks GPIb/V/IX je heptamer koji sačinjavaju 4 transmembranske jedinice: GPIbα-teški lanac, GPIbβ-laki lanac, GPIX i GPV. GPIbα i GPIbβ kovalentno su povezani disulfidnom vezom i nekovalentno s GPIX i GPV (Slika 5). Sva četiri GP, članovi su obitelji proteina bogatih leucinom koju obilježava prisustvo jedne ili više leucinom bogate sekvence od 24 aminokiseline. GPIbα posjeduje sedam sekvenci bogatih leucinom, GPIbβ i GPIX po jednu, a GPV petnaest.



Slika 5. Kompleks GPIb/V/IX (2GPIbα:2GPIbβ:2GPIX:GPV). Prema: Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Kunicki TJ. Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000;222-40. (61).

Na membrani trombocita nalazi se 25 000 kopija GPIb/IX i 12 000 kopija GPV, a cijeli kompleks funkcionalno je povezan s niskoafinitetnim receptorom FcγRII. GPIb/V/IX služi kao receptor VWF, trombina, FXI, FXII, te P-selektina. Receptor VWF uključen je u početno stanje trombocitne adhezije pri visoko protočnim uvjetima (60,61,62).

Gen GP1BA koji kodira GPIbα smješten je na kromosomu 17, gen GP1BB za GPIbβ na kromosomu 22, a geni GP5 i GP9 za GPV i GPIX smješteni su na kromosomu 3 (60). GPIbα najveća je jedinica ovog kompleksa u kojoj se nalaze različite strukturne i funkcionalne domene. N-terminalna domena sastavljena je od leucinskih sekvenci i sadrži vezno mjesto za

VWF, a potom slijede područje bogato negativno nabijenim aminokiselinama, glikirano područje, transmembransko i na kraju citoplazmatski dio (83).

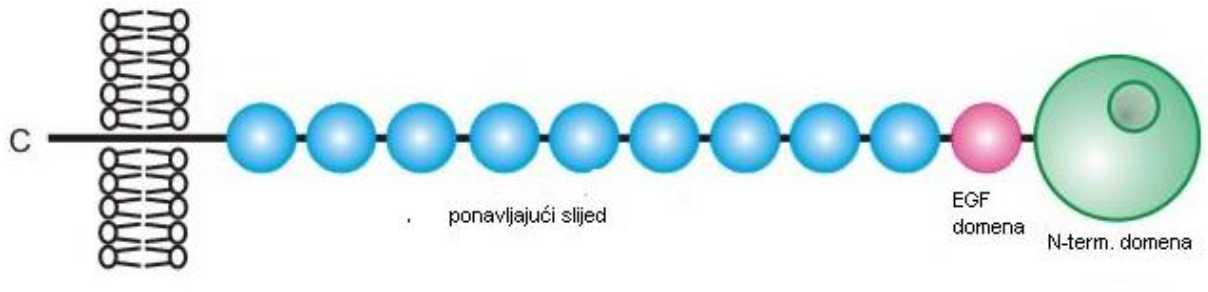
Gen za GPIbα ima dva alelna oblika čiji su rezultat aleli HPA-2a i HPA-2b, odnosno zamjena baze citozina u timin dovodi do promjene aminokiseline treonin u metionin na položaju 145. Rjeđa varijanta HPA-2b pojavljuje se u 6 do 15% bijelaca i Azijata (68,70), te 18% crnaca (69). Drugi polimorfizam GPIbα je VNTR (od engl. *variable number of tandem repeats*). Do ovog polimorfizma dolazi uslijed promjenjivosti broja ponavljanja od 13 aminokiselina u makroglikopeptidnom području glikoproteina. To stvara 4 izoforme A, B, C i D (od najvećeg prema najmanjem, ovisno o veličini). Alel VNTR-C najčešći je u svim populacijama. Ograničene studije su predložile povezanost alela VNTR-B i rizika za arterijsku trombozu. Treći polimorfizam GPIbα u svezi je sa zamjenom nukleotida T/C u neposrednoj blizini 5' netranslatirane sekvence GPIbα tzv. Kozak sekvence, čime se djeluje na površinsko izražavanje receptorskog kompleksa GPIb/IX/V (alel C povećava ekspresiju). Učestalost alela C kreće se oko 10% u bjelačkoj populaciji, a u Japanaca oko 28%. Posljedica ovog polimorfizama na trombocitnu funkciju je proturječna (63).

Na GPIbβ nalazi se HPA-12w polimorfizam. Ostala dva proteina ovog kompleksa, GPV i GPIX, nisu polimorfna (61,66).

U istraživanju polimorfizama HPA-2 u ženske populacije mlađe od 45 godina, ispitano je 78 bolesnika (ishemija i krvarenje) i 346 kontrola, prisutnost genotipa s jednom ili više kopija alela b povezana je s umjereno povećanim rizikom iCVI-a u osoba sa šećernom bolesti ili hipertenzijom (75). Statistički značajna povezanost alela HPA-2b s cerebrovaskularnom bolešću u ispitanika odrasle dobi dobivena je i u studiji Conejera i sur. (OR = 2,40 (1,04-5,63); p=0,0244) (84), ali isto tako postoje ispitivanja koja to nisu potvrdila (72,77). U ispitivanju Sonade i sur. nađena je povezanost HPA-2b s rizikom za TIA-u i lakunarni CVI, ali ne i aterotrombotični CVI (85). Prema istraživanju Ulrichtsa i sur. iz 2003. godine polimorfizam HPA-2 nije imao utjecaja na vezno mjesto za trombin, ali je djelovao na konformacijske promjene leucinskog područja GPIbα i na vezivanje VWF. Rezultatima te studije pokazano je puno jače međudjelovanje VWF s alelom HPA-2a, što je u suprotnosti s oznakom alela HPA-2b kao genskog čimbenika rizika (86). Prema našoj studiji dobili smo da prisutnost alela HPA-2b povećava rizik za TIA-u, kao i migrenu u dječjoj dobi (80).

1.2.2. Polimorfizmi gena za P-selektin

Glikoprotein P-selektin (CD62P) je stanična adhezijska molekula, koja se nalazi na površini aktiviranih stanica, te posreduje u adheziji trombocita i leukocita na aktivirani endotel, kao i u adheziji leukocita na trombocite. P-selektin (PSEL) nalazi se u α granulama trombocita i Weibel-Paladijevim tjelešcima endotelnih stanica i najveći je od poznatih selektina, molekularne težine od 140kDa. Osim PSEL-a, obitelji adhezijskih molekula pripadaju L-selektin (smješten na leukocitima) i E-selektin (smješten na endotelnim stanicama). Na aktiviranim trombocitima nalazi se oko 10 000 molekula PSEL-a. PSEL sadrži N-terminalnu lektinsku domenu, zatim domenu koja pokazuje visoki stupanj homologije s epidermalnim faktorom rasta (od engl. *epidermal growth factor*, EGF), 9 ponavljajućih slijedova, transmembransku domenu i kratku citoplazmatsku domenu (87,88) (Slika 6).



Slika 6. Struktura molekule PSEL-a (N-treminalna domena, EGF-domena, 9 ponavljajućih slijedova, transmembranska domena i citoplazmatski dio). Dostupno na: http: //www. functionalglycomics.org/. Datum pristupa: 13. 06. 2011.

PSEL se veže na odgovarajući glikoproteinski ligand, P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1), koji je po sastavu homodimerični mucin i uglavnom se nalazi na leukocitima. Njegova osnovna uloga je omogućavanje dinamike klizanja odnosno kotrljanja leukocita duž endotela krvne žile, također u manjoj koncentraciji može biti prisutan na trombocitima te sudjeluje u trombocitno-endotelnom međudjelovanju (87,88). Osim liganda PSGL-1 za PSEL na trombocitima, funkciju liganda imaju GPIb i sulfatidi (89).

Gen za selektine nalazi se na kromosomu 1 te sadrži 17 eksona i u blizini je gena za FV. Gen za PSEL je izrazito polimorfan. Do sada su Herrmann i sur. (87) opisali 13 SNP-a koji se nalaze u promotorskoj i kodirajućoj regiji (pet u promotorskoj, osam u kodirajućoj regiji). Bugert i sur. 2004. (88) opisali su još jedan polimorfizam smješten u kodirajućoj regiji. Od 10

SNP-a u kodirajućoj regiji, u samo njih 5 dolazi i do promjene aminokiselinske sekvence. Polimorfizam V168M (Val-Met) smješten je na 5. eksonu, S290N (Ser-Asn) na 7., N562D (Asn-Asp) na 11., V599L (Val-Leu) na 12. i T715P (Thr-Pro) na 13. eksonu i svi se nalaze u ponavljajućim slijedovima polipeptida (Tablica 5) (87,88).

Tablica 5. Polimorfizmi gena za PSEL (debljim slovima su označeni oni polimorfizmi u kojima dolazi do zamjene nukleotida i aminokiselina)

polimorfizam	ekson	Zamjena nukleotida	Zamjena aminokiselina
N87N	3	AAC AAT	Asn Asn
P98P	3	CCG CCA	Pro Pro
V168M	5	**G**TG **A**TG	**Val** **Met**
S290N	7	A**G**T A**A**T	**Ser** **Asn**
C557C	11	TGT TGC	Cys Cys
N562D	11	**A**AC **G**AC	**Asn** **Asp**
N563N	11	AAT AAC	Asn Asn
V599L	12	**G**TG **T**TG	**Val** **Leu**
T715P	13	**A**CT **C**CT	**Thr** **Pro**
T741T	14	ACG ACA	Thr Thr

PSEL ima vrlo značajnu ulogu u procesima upale, hemostaze i tromboze. PSEL i PSGL-1 imaju fiziološku ulogu u upalnom odgovoru, posredujući u kotrljanju leukocita na stimulirani endotel čime se omogućava daljnji korak adhezije/aktivacije i transmigracije leukocita u okolno tkivo, kao i kotrljanja leukocita na vezane trombocite za endotel oštećene krvne žile (89).

S druge strane PSEL ima značajnu ulogu u koagulaciji odnosno trombozi. Prema dosadašnjim istraživanjima postoji PSEL ovisni put stavaranja fibrina. PSEL obično u topivom obliku ili kao mikročestica veže se na PSGL-1 na leukocitima i omogućava „de novo“ sintezu tkivnog faktora (od engl. *tissue factor,* TF) u leukocitima. Mikročestice koje sadrže TF vezan na PSGL-1 oslobađaju se iz leukocita i vežu na trombocite u trombu preko PSEL-a, gdje TF potiče koagulaciju i stvaranje fibrina (89,90,91,92).

PSEL je uključen u trombocitna međudjelovanja, tzv. agregaciju trombocita koja je glavni čimbenik arterijske tromboze. PSEL se veže na trombocitne sulfatide i na taj način stabilizira početno nastale agregate preko tzv. GPIIb-IIIa-fibrinogenskih mostova, odnosno ima funkciju u kasnoj fazi agregacije trombocita (90).

Prva istraživanja polimorfizama PSEL-a uključivala su kardiovaskularne bolesnike. Herman i sur. (87) u velikoj studiji istražili su 13 polimorfizama PSEL-a u 647 muškaraca s infarktom miokarda i 758 kontrola iz četiriju područja Francuske i Sjeverne Irske. Prema dobivenim rezultatima alel PSEL 715P ima zaštitnu ulogu u infarktu miokarda, odnosno značajno je učestaliji u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesne. Slični rezultat zaštitnog učinka alela PSEL 715P dobiven je i u istraživanju provedenom na 696 ispitanika muškog i ženskog spola s infarktom miokarda u Velikoj Britaniji (93). Analizom haplotipa (94), podataka dobivenih radom Hermana i sur. potvrđen je zaštitni učinak alela PSEL 715P, kao i značajan utjecaj prisutnosti dvaju asparagina na poziciji S290N i N562D, odnosno haplotip NNVT (290N, N562, V599, T715) povezan je s povećanim rizikom za infarkt miokarda. Suprotno ovim istraživanjima u 869 bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću zaštitni utjecaj alela PSEL 715P nije potvrđen, ali je bio u svezi s nižom koncentracijom PSEL-a i u kontrolnoj i bolesnoj skupini ispitanika (95). Prema studiji Bugerta i sur. (88) u kojem su ispitani polimorfizmi gena za PSEL (S290N, N562D, V599L, T715P, V168M) na 261 ispitaniku s koronarnom srčanom bolešću nije nađena razlika u učestalosti pojedinih polimorfizama u odnosu na kontrolnu skupinu, osim značajno veće učestalosti alela PSEL 715P u bolesnika s hiperkolesterolemijom.

O značaju utjecaja polimorfizama gena za PSEL na CVP-e u odraslih postoji vrlo mali broj radova. Volicki i sur. (96) ispitivali su povezanost četiriju polimorfizama gena za PSEL (S290N, N562D, V599L, T715P) i dva polimorfizma gena za PSGL-1 na ispitanicima s koronarnom srčanom bolešću i i-CVI-om. Rezultati rada ne ukazuju na povezanost polimorfizama gena za PSEL s iCVI-om, dok u ispitanika s koronarnom srčanom bolesti genotip PSEL 290NN i haplotip NNVP (290N, N562, V599, 715P) značajan su prediktor srčane bolesti u bijelaca. U dosadašnja tri istraživanja polimorfizam T715P nije bio povezan s rizikom ili kliničkim karakteristikama iCVI-a ili TIA-e (97,98,99). U bijelaca nosioca alela 715P dobivene su niže koncentracije PSEL-a, u odnosu na alel T715 (99). Pregledom dosadašnje literature ovi polimorfizmi gena za PSEL nisu bili ispitivani u djece s CVP-om.

1.2.3. Točkasta mutacija faktora V zgrušavanja: FV G1691A (FV Leiden)

Faktor V (FV) je glikoprotein molekularne mase 300-kD, a gen koji ga kodira ima 25 eksona i smješten je na dugom kraku kromosoma 1 (100). FV Leiden (FVL) nastaje kao posljedica točkaste mutacije zamjene gvanina adeninom na poziciji 1691 u genu za FV, a što za posljedicu ima zamjenu aminokiseline arginina glutaminom na poziciji 506 koje je ujedno i mjesto cijepanja FV aktiviranim proteinom C (PC). Rezultat ove mutacije je rezistencija na aktivirani PC, čime je onemogućena antikoagulacijska aktivnost PC, povećava se stvaranje trombina i rizik za nastajanje ugruška. Više od 95% rezistencije na aktivirani PC uzrokovano je FVL, a samo mali postotak uzrokovan je stečenom rezistencijom. FVL nasljeđuje se autosomno dominantno i najčešći je uzrok venske tromboze. Učestalost mutacije značajno varira u pojednim etničkim skupinama i rasama i kreće se od 0-15%. Najveća je u pripadnika bijele rase, a rjeđe se nalazi kod Afrikanaca i Azijata. Bolesnici heterozigoti za FVL imaju 3 do 7 puta veći rizik, a homozigoti više od 70 puta veći rizik za nastanak venske tromboze. Udruživanjem FVL s nekim drugim čimbenicima rizika, poput uzimanja oralnih kontraceptiva, trudnoće, nedostatka proteina S, hiperhomocisteinemijom ili starošću, rizik oboljenja može se povećati i nekoliko puta (101).

O utjecaju FVL na CVI postoje vrlo oprečni rezultati. Prema nekim istraživanjima provedenim na dječjoj populaciji postoji povezanost ove mutacije s iCVI-om (102,103,104,105), a prema drugima ona nije utvrđena (106,107,108,109). Rezultati našeg objavljenog rada pokazali su značajnu povezanost FVL s iCVI-om i TIA-om u dječjoj dobi (80).

Istraživanja u odraslih također nisu rezultirala jasnim zaključkom. Rezultati dviju većih studija u odraslih u kojima su praćeni i čimbenici rizika ne nalaze povezanost FVL s povećanim rizikom za iCVI ili TIA-u (110,111). Suprotno tome, određena istraživanja dokazala su povezanost mutacije s iCVI-om, osobito u podskupinama. U podskupini starijih osoba bez osobne ili obiteljski pozitivne anamneze kardiovaskularne bolesti utvrđena je značajna učestalost FVL u usporedbi s kontrolnom skupinom (112), u žena do 60 godina koje puše i imaju mutaciju FVL povećani je rizik za ishemijski cerebrovaskularni događaj (113). Prema jednom ispitivanju FVL učestaliji je u ženskoj populaciji s iCVI-om, što možda ukazuje na međudjelovanje ovog genotipa sa ženskim hormonima (114). Prema rezultatima ispitivanja u hrvatskoj populaciji u osoba mlađih od 65 godina FVL je učestaliji u ispitanika s

prvim iCVI-om (115). U dobivenim podacima meta analize 18 studija iCVI-a u osoba mlađih od 50 godina (116) nalazi se značajna povezanost s FVL. Rezultati meta-analiza Wu i sur. (117), Kim i Becker (118), kao i meta-analize Casas i sur. (52) u kojoj je obrađeno 18 000 slučajeva iCVI-a i 58 000 kontrolnih ispitanika pronašli su također povezanost FVL i iCVI-a. Suprotno njima rezultati dviju meta-analiza (119) na približno 31 000 slučajeva iz 35 studija ne pronalaze povezanost FVL i rizika za iCVI.

1.2.4. Točkasta mutacija faktora II zgrušavanja: FII G20210A

Protrombin je faktor zgrušavanja II (FII) ovisan o vitaminu K, prekursor je trombina koji ima središnju ulogu u stvaranju fibrina i oblikovanju ugruška. Gen za protrombin nalazi se na kromosomu 11. Sastoji se od 14 eksona i 13 introna. Mutacija gena za FII G20210A nastaje uslijed zamjene gvanina s adeninom na poziciji 20210 na 3' dijelu nekodirajuće regije gena, koja bi mogla imati regulacijsku ulogu u ekspresiji gena. Posljedica ove mutacije je povećana aktivnost protrombina koja povećava rizik za nastanak tromboze. Mehanizam povećanja aktivnosti protrombina zasada još nije razjašnjen (120). Učestalost mutacije je 2 do 4% u europskoj populaciji, pri čemu je učestalost veća na jugu nego na sjeveru Europe. U stanovništvu Azije i Afrike zabilježeni su tek rijetki slučajevi. Prisutna je u 6 do 8% bolesnika s venskom trombozom, a čak u 18% bolesnika s obiteljskom anamnezom venske tromboze (121).

Nema mnogo podataka iz literature o povezanosti FII G20210A i iCVI-a. U većini kontrolnih studija dječje populacije nije utvrđena ova povezanost (80,102,103,104,107,108,122), za razliku od istraživanja u kojem je ta povezanost potvrđena (105). Rezultati meta analize arterijskog iCVI-a u dječjoj dobi i njihove povezanosti s protrombotičkim čimbenicima ne ukazuju na povezanost FII G20210A i iCVI-a (123).

Postoji nekoliko studija u kojima je obrađena populacija odraslih i djece zajedno, gdje u jednoj studiji postoji povezanost FII G20210A i iCVI-a (124), dok u druge dvije ta povezanost nije nađena (114,125).

U velikoj studiji u kojoj su ispitivane samo osobe muškoga spola s iCVI-om također nije nađena povezanost s FII G20210A (126), kao niti u istraživanju koje je obuhvaćalo samo ženski spol (127). Prema rezultatima ispitivanja u hrvatskoj populaciji u osoba mlađih od 65 godina FII G20210A učestaliji je u ispitanika s prvim iCVI-om (115). I u konačnici rezultati dviju meta-analiza koje su obrađivale FII G20210A i FVL, rezultirale su značajnom povezanošću FII G20210A i iCVI-a (52,118), za razliku od meta-analize iz 2001. gdje ona nije bila prisutna (117).

2. RADNA HIPOTEZA

Druga polovica dvadesetog stoljeća obilježena je značajnim porastom kroničnih nezaraznih bolesti u svim razvijenim zemljama svijeta. Znakoviti je porast stope smrtnosti od bolesti krvožilnog sustava, osobito CVI-a. CVI je jedan od vodećih uzroka smrtnosti i invalidnosti u nas i u svijetu. Svjedoci smo i činjenice da CVI više ne zahvaća samo starije dobne skupine, zadnjih godina od CVI-a oboljevaju sve češće i bolesnici u najproduktivnijim godinama života, a i u djece CVI dobiva sve veću pozornost, što ga čini velikim kako zdravstvenim tako i ekonomskim problemom.

U odraslih CVI nije uzrokovan samo standardnim čimbenicima rizika poput hipertenzije, šećerne bolesti, pušenja, nego najvjerojatnije i genskim čimbenicima. Također i u djece poznati su čimbenici rizika CVI-a, ali usprkos iscrpnim ispitivanjima, etiološki čimbenik ili udruženi uzročnici ostaju nepoznati u jednoj trećini slučajeva (7,9). Pretpostavlja se da je CVI kompleksna multifaktorijalna i poligenska bolest (44). Sadašnja istraživanja značajno su usmjerena proučavanju protrombotičkih čimbenika rizika kao mogućim uzrocima nastanka CVI-a.

Za odvijanje normalne hemostaze važni su trombociti s membranskim GP-ima i adhezijske molekule PSEL-a. Površina membranskih GP-a neophodna je za adheziju i agregaciju trombocita. Trombociti adheriraju na subendotelne strukture pomoću specifičnih receptora kao što su kolagenski receptor: GPIa/IIa, te receptor za VWF: GPIb/V/IX. Nakon adhezije dolazi do aktivacije trombocita i agregacije križnim povezivanjem trombocita preko fibrinogenskog receptora GPIIb/IIIa. Receptori za VWF, fibrinogen i kolagen su polimorfni. Kompleks receptora GPIIb/IIIa posjeduje dva polimorfna aloantigena, HPA-1 i HPA-3; na GPIb/V/IX smješten je HPA-2 polimorfizam, a na GPIa/IIa je HPA-5 polimorfni sustav (77). Polimorfni GP receptori mogu značajno doprinijeti trombotskim promjenama krvožilnog sustava, odnosno pretpostavka je da tromboembolizam ovisan o trombocitima predstavlja osnovu patogeneze CVI-a. PSEL je adhezijska molekula koja posreduje u međudjelovanju aktiviranih endotelnih stanica ili trombocita s leukocitima, a pokazano je da polimorfizmi PSEL-a imaju značajnu ulogu u arterijskoj i venskoj trombozi i čini se da su povezani s različitim fazama evolucije aterotrombotične bolesti (89,90). Budući da su FV G1691A i FII G20210A dobro ustanovljeni čimbenici rizika venske tromboze (101,121), a gen za FV nalazi

se u blizini gena za PSEL na kromosomu 1 (92), u istraživanje su uključene i ove dvije mutacije.

Hipoteza ovog istraživanja je da postoji razlika u učestalostima polimorfizama gena za HPA (-1, -2, -3 i -5), gena za PSEL (S290N, N562D, V599L i T715P), te FV G1691A i FII G20210A u bolesnika s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Dokazivanjem povezanosti ispitivanih polimorfizama s CVP-om proširile bi se dosadašnje spoznaje o čimbenicima rizika CVP-a i omogućila identifikacija čimbenika na koje se može terapijski djelovati. Budući da se ispitivanja cerebrovaskularnog sustava u odraslih ne mogu preslikati na dječju populaciju uslijed fiziološke razlike u hemostazi (128), učestalosti tromboze i uključenosti pojedinih čimbenika rizika u ovom istraživanju odvojeno će se obraditi podaci u djece i odraslih.

Kako je ovo prvo istraživanje HPA u hrvatskoj populaciji, dobiveni podaci mogu se upotrijebiti za bolje razumijevanje i liječenje imuno-posredovanih trombocitnih poremećaja u našoj populaciji.

3. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja u kontrolnim skupinama i skupinama s CVP-om bili su:

- odrediti i usporediti učestalosti polimorfizama HPA u kontrolnoj skupini hrvatske populacije u odnosu na europsku
- odrediti postojanje i učestalost svakog pojedinog genskog čimbenika rizika (HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A) u kontrolnim skupinama i skupinama s CVP-om, kao i podskupinama (iCVI, TIA)
- usporediti svaki pojedini genski čimbenik rizika u skupinama s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) s istim u odgovarajućoj kontrolnoj skupini, kao i njihovu eventualnu povezanost unutar skupine, odnosno podskupine
- utvrditi postoji li razlika u učestalosti pojedinih genskih čimbenika rizika u kontrolnim skupinama i skupinama s CVP-om, kao i podskupinama (iCVI, TIA) s obzirom na spol i dobne skupine (djeca u odnosu na odrasle)
- odrediti učestalosti standardnih čimbenika rizika u odraslih (kontrolna skupina, skupina s CVP-om) te ispitati njihovu povezanost s učestalostima pojedinih genskih čimbenika rizika
- načiniti regresijsku analizu u odraslih ispitanika s obzirom na ispitivane standardne i genske čimbenike rizika

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Skupine s CVP-om sačinjava ukupno 300 djece (starosti od 30 dana do 18 godina) i odraslih bolesnika. U skupini djece s CVP-om nalazi se 100 bolesnika (64 s iCVI-om i 36 s TIA-om), a skupinu odraslih s CVP-om sačinjava 200 bolesnika (126 s CVI-om i 74 s TIA-om). Djeca su liječena na Neuropedijatrijskom odjelu Klinike za dječje bolesti Zagreb, a odrasli na Neurološkom odjelu Klinike za neurologiju Kliničke bolnice Sestara milosrdnica Zagreb u vremenskom razdoblju od 1999. do 2010. godine.

Dijagnoza je postavljena na osnovu iscrpno uzetog neurološkog statusa koji uključuje kompjutoriziranu tomografiju mozga, nuklearnu magnetsku rezonancu mozga, doppler krvnih žila mozga i elektroencefalogram. Iz istraživanja su bila isključena djeca i odrasli bez kompletne neurološke obrade, bolesnici s hemoragijskim CVI-om, kao i bolesnici kod kojih su nedostajali neki od podataka ispitivanih standardnih i genskih čimbenika rizika.

Kontrolne skupine čini ukupno 200 djece i odraslih podudarne životne dobi i spola ispitivanim skupinama s CVP-om u djece i odraslih. U kontrolnoj skupini djece nalazi se 100 ispitanika koji su laboratorijski kontrolirani neposredno prije operativnog zahvata tonzila, uz anamnestičke podatke i fizikalni pregled kojim su isključeni neurološki i tromboembolijski poremećaji. Uzorci su prikupljeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti u Zagrebu, te u Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Dječje bolnice Srebrnjak. U kontrolnoj skupini odraslih uključeno je 100 ispitanika koji su tijekom redovne kontrole bili podvrgnuti laboratorijskoj obradi kod kojih na temelju anamnestičkih podataka nisu ustanovljeni neurološki i tromboembolijski poremećaji, a prikupljeni su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, te u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za traumatologiju.

Za sve odrasle ispitanike (kontrolna skupina, skupina s CVP-om) prikupljeni su podaci o pojavnosti bolesti u obitelji, te standardnih čimbenika rizika CVP-a (dob, spol, hipertenzija, šećerna bolest, hiperkolesterolemija, hipertrigliceridemija, srčane bolesti, pušenje,

alkoholizam i tjelesna težina). Hipertenzija je dijagnosticirana ako je krvni tlak veći ili jednak 140/90 mmHg ili je osoba na antihipertenzivnoj terapiji (129). Šećerna bolest je dijagnosticirana od liječnika obiteljske medicine ili bolnički kao dijetalno kontrolirana bolest, šećerna bolest ovisna o oralnim hipoglikemicima ili inzulin ovisna šećerna bolest (130). Hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija određena je temeljem laboratorijske obrade (preporučene vrijednosti: kolesterol M, Ž < 5,0 mmol/L; trigliceridi M, Ž < 1,7 mmol/L). Srčane tegobe klasificirane su kao poremećaj ritma, preboljeli infarkt miokarda, stabilna i nestabilna angina pektoris. S obzirom na pušenje ispitanici su klasificirani na pušače, nepušače i one koji su prestali pušiti. Uživanje alkohola klasificirano je u više kategorija: ne pije, povremeno pije do 2 dcl crnog vina, pije svaki dan u manjim količinama do 2 dcl crnog vina i pije u većim količinama svaki dan. Tjelesna težina klasificirana je temeljem indeksa tjelesne mase (od engl. *body mass index,* BMI) u 4 skupine: pothranjenost (manje od 18,5 kg/m^2), normalna tjelesna težina (18,5 do 25 kg/m^2), prekomjerna tjelesna težina (26 do 30 kg/m^2) i adipozitet (više od 30 kg/m^2).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za traumatologiju Zagreb.

4.1.1. Uzorkovanje

Uzorci krvi za izolaciju DNA uzeti su na antikoagulant K_3EDTA i puna krv zamrznuta je na -20 °C do postupka izolacije. Laboratorijska obrada uzoraka krvi učinjena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2. Metode određivanja

4.2.1. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA iz pune krvi izvedena je metodom isoljavanja koju su opisali Miller i sur. (131). Metoda se temelji na liziranju leukocita iz periferne krvi, te isoljavanja kojim se uklanjaju stanični proteini, RNA i druge molekule. Nakon toga slijedi taloženje DNA alkoholom i otapanje u puferu. Izolirani uzorak DNA čuva se na +4 °C do izrade analize.

4.2.2. Određivanje koncentracije i ispitivanje kvalitete izolirane DNA

Koncentracija DNA (C_{DNA}) određuje se spektrofotometrijski na osnovi optičke gustoće (OD) razrijeđene otopine DNA s TE-puferom u omjeru 1:100 na valnoj duljini od 260 nm. Koncentracija DNA se izračuna prema formuli:

C_{DNA} (μg/mL) = OD_{260} x razrjeđenje x F

F = faktor (1 OD_{260} = 50 μg/mL)

Kvaliteta izolirane DNA provjerava se elektroforezom na 0,3%-tnom agaroznom gelu s etidijevim bromidom koji se interkalira u dvostruku uzvojnicu DNA i fluorescira pod UV svjetlom što omogućava detekciju vrpce DNA kamerom GBOX (Syngene, USA) .

4.2.3. Analiza DNA metodom PCR-SSP

Analiza DNA metodom PCR-SSP, lančanom reakcijom polimeraze s ishodnicama specifičnog slijeda (od engl. *polymerase chain reaction with sequence specific primer*) korištena je za utvrđivanje polimorfizama HPA (132) i gena za PSEL (88).

PCR-SSP predstavlja alel specifični PCR za brzu analizu poznatih mutacija u genomskoj DNA. Za otkrivanje svakog alela oblikovana su dva seta ishodnica, a PCR se izvodi u dvije paralelne reakcije. Svaki set sadrži alel-specifičnu ishodnicu i zajedničku ishodnicu. U prvoj reakciji 5' ishodnica komplementarna je divljem-tipu sekvence, a u drugoj reakciji 5' ishodnica komplementarna je mutaciji odnosno polimorfizmu sekvence. Do sinteze novog lanca dolazi samo kada su ishodnica i ciljana sekvenca kompletno podudarne, te se samo jedan alel mutirane i/ili divljeg tipa DNA umnoži. Detekcija se vrši elektroforezom u agaroznom gelu.

4.2.3.1. Genotipizacija HPA metodom PCR-SSP

Reagensi:

1. 10XPCR pufer II (Applied Biosystems,USA)

KCl (500 mM)
Tris-HCl (100 mM), pH 8,3

2. AmpliTaq Gold DNA polimeraza (Applied Biosystems, USA)

AmpliTaq Gold polimeraza (250 U) 5IJ/μL

3. Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) (Applied Biosystems, USA)

(dATP, dCTP, dGTP,dTTP), otopina 10 mM

4. HPA specifične ishodnice (MWG-Biotech AG, Njemačka)100 pmol/L

HPA-1a-I	5'- ACT TAC AGG CCC TGC CTC T-3'
HPA-1b-I	5'- ACT TAC AGG CCC TGC CTC C-3'
HPA-1-II zajednički	5'- GTG CAA TCC TCT GGG GAC T-3'
HPA-2a-I	5'- CCC CCA GGG CTC CTG AC-3'
HPA-2b-I	5'- CCC CCA GGG CTC CTG AT-3'
HPA-2-II zajednički	5'- GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG-3'
HPA-3a-II	5'- GGG GGA GGG GCT GGG GA-3'
HPA-3b-II	5'- GGG GGA GGG GCT GGG GC-3'
HPA-3-I zajednički	5'- GGC CCT GGG ACT GTG AAT G-3'
HPA-5a-I	5'- AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG-3'
HPA-5b-I	5'- AGG AAG AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA-3'
HPA-5-II zajednički	5'- CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA-3'

5. Unutarnja pozitivna kontrola (MWG-Biotech AG, Njemačka)100 pmol/L

CRP-I	5'- CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG-3'
CRP-II	5'- GGA TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA-3'

6. otopina $MgCl_2$ (Applied Biosystems, USA) 25mM

7. sterilna destilirana H_20

Postupak:

Za svakog ispitanika priprema se 8 smjesa različitih ishodnica potrebnih za umnažanje HPA-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -5a, -5b, prema protokolu prikazanom u Tablici 6. Ishodnice koje su odabrane u ovom radu kao i ishodnice pozitivne interne kontrole opisane su u radu Klűtera i sur. (133). U protokolu smo unijeli određene izmjene u odnosu na izvorni protokol (132), smanjivši koncentracije Mg^{2+} i dNTP, čime smo umanjili nespecifične reakcije. U svim reakcijskim smjesama radili smo s identičnom koncentracijom Mg^{2+}, a prema izvornom protokolu ona je bila veća za HPA-5.

Tablica 6. Protokol izrade reakcijske smjese za genotipizaciju HPA metodom PCR-SSP

Reagens	**Volumen (μL)**	**Koncentracija u 20 μL**
10XPCR pufer II	2,0	1X
$MgCl_2$	1,2	1,5 mM
dNTP	0,8	0,2 mM
CRP I (1:10)	0,1	0,05 μM
CRP II (1:10)	0,1	0,05 μM
HPA_X I	0,1	0,5 μM
HPA_X II	0,1	0,5 μM
Sterilna destilirana H20	10,5	
AmpliTaq Gold	0,1	0,5 U
Genomska DNA (10μg/mL)	5,0	50 ng

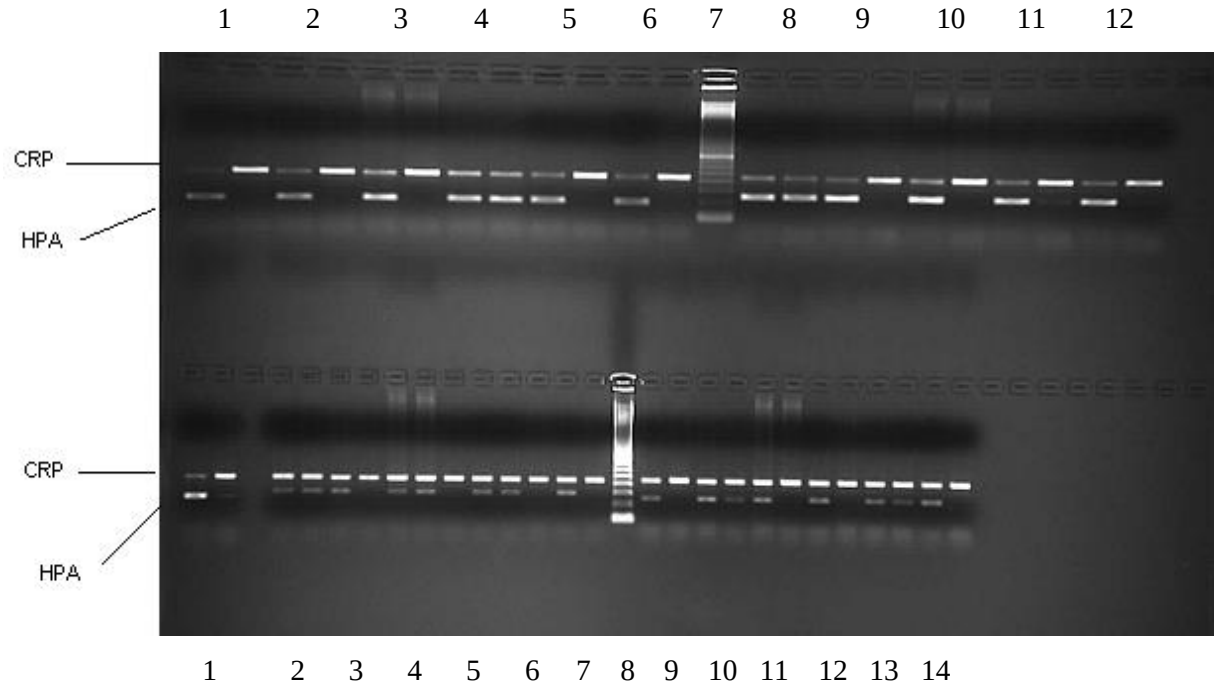
Kao kontrolni uzorci HPA -1, -2, -3 i -5 korištene su B limfoblastične stanične linije poznatih sustava HPA (COX HPA-1a/a, -2a/a, -3a/a, -5a/a; HAG HPA-1a/a, -2a/a, -3a/b, -5a/b; KAS011 HPA-1a/a, -2a/a, -3a/b, -5a/b) (134) i negativna kontrola (voda).

Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, USA). Reakcijski uvjeti PCR su bili: 10 min na 95°C; 10 ciklusa od 15 s na 95°C, 30 s na 67°C i 30 s na 72°C; 25 ciklusa od 15 s na 95°C, 30 s na 61°C i 30 s na 72°C i na kraju produljenje od 10 min na 72°C.

Kvaliteta i veličina umnoženih ulomaka DNA ispituje se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu i bojanjem s etidijevim bromidom na 140V/160mA/1h. Uz svaku seriju uzoraka pri elektroforetskom odvajanju uključili smo kontrolu, kao i molekularni biljeg od

100 pb (Amersham Pharmacia, Velika Britanija). Dobiveni produkti detektiraju se pod UV-transluminatorom i rezultati se dokumentiraju fotografiranjem kamerom GBOX (Syngene, USA).

Genotip je određen prisutnošću ili odsutnošću fragmenata. Prisutnost fragmenta od 440pb ljudskog gena CRP-a ukazuje da je došlo do umnažanja, odnosno CRP predstavlja pozitivnu unutarnju kontrolu. Pojava kraćih fragmenata ukazuje na prisutnost odgovarajućeg alela (Slika 7).



Slika 7. Elektroforeza produkata alel-specifičnog PCR-a gena za HPA na agaroznom gelu. Gornji fragmenti od 440 pb predstavljaju CRP (pozitivna interna kontrola), a donji fragmenti predstavljaju različite HPA. Gornji red od 1-6 predstavlja polimorfizam HPA-1 (1-a/a, 2-a/a, 3-a/a, 4-a/b, 5-a/a, 6-a/a), 7 je marker od 100pb, od 8-12 je polimorfizam HPA-2 (8-a/b, 9-a/a, 10-a/a, 11-a/a, 12-a/a). Donji red od 1-7 predstavlja polimorfizam HPA-3 (1-a/b, 2-a/b, 3-a/a, 4-a/b, 5-b/b, 6-a/a, 7-a/a), 8 je marker od 100pb, od 9-14 je polimorfizam HPA-5 (9-a/a, 10-a/b, 11-a/a, 12-a/a, 13-a/b, 14-a/a).

4.2.3.2. Genotipizacija PSEL-a metodom PCR-SSP

Reagensi:

1. 10XPCR pufer I (Applied Biosystems, USA)

KCl (500 mM)
Tris-HCl (100 mM), pH 8,3
$MgCl_2$ (15mM)

2. AmpliTaq DNA polimeraza (Applied Biosystems, USA)

Ampli TaqGold polimeraza (Applied Biosystems, USA)

AmpliTaq polimeraza (250 U) 5IJ/μL
AmpliTaq Gold polimeraza (250 U) 5IJ/μL

3. Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) (Applied Biosystems, USA)

(dATP, dCTP, dGTP,dTTP), otopina 10 mM

5. PSEL specifične ishodnice (Tib-Molbiol, Njemačka) 100 μmol/L

PSEL-290S	5'-CTG GAA GCC CCC AG-3'
PSEL-290N	5'-CAC CTG GAA GCC CCC AA3-'
PSEL-S290N	5'-TTG GAC AGA ATG GAG GTT GC-3'
PSEL-562N	5'-CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TA-3'
PSEL-562D	5'-CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TG-3'
PSEL-N562D	5'-AAG TAG AAC TGT CTT AGC AAG TAC-3'
PSEL-599V	5'-CAC TTC CTA CTC CAG GGG-3'
PSEL-599L	5'-CAC TTC CTA CTC CAG GGT-3'
PSEL-V599L	5'-CAA CAT ACA GGC ACA ATG GC-3'
PSEL-715P	5'-GAG AAT GGC CAC TGG TCA A-3'
PSEL-715T	5'-GAG AAT GGC CAC TGG TCA C-3'
PSEL-T715P	5'-GGA TGG AAA GCA AGA CCA CT-3'

5. Unutarnja pozitivna kontrola (Tib-Molbiol, Njemačka)100 μmol/L

β-glob-F	5-'GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3'
β-glob-R	5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG-3'

6. sterilna destilirana H_20

Postupak:

Za svakog ispitanika priprema se 8 smjesa različitih ishodnica potrebnih za umnažanje PSEL-S290, -290N, -N562, -562D, -V599, -599L, -T715, -715P, prema protokolu prikazanom u Tablici 7. Ishodnice koje su odabrane u ovom radu kao i ishodnice pozitivne interne kontrole opisane su u radu Bugerta i sur. (88). Za određivanje svih polimorfizama koristili smo AmpliTaq polimerazu osim za polimorfizam S290N za koji je korištena AmpliTaq Gold polimeraza, budući da s AmpliTaq polimerazom nismo dobivali amplifikacijske produkte.

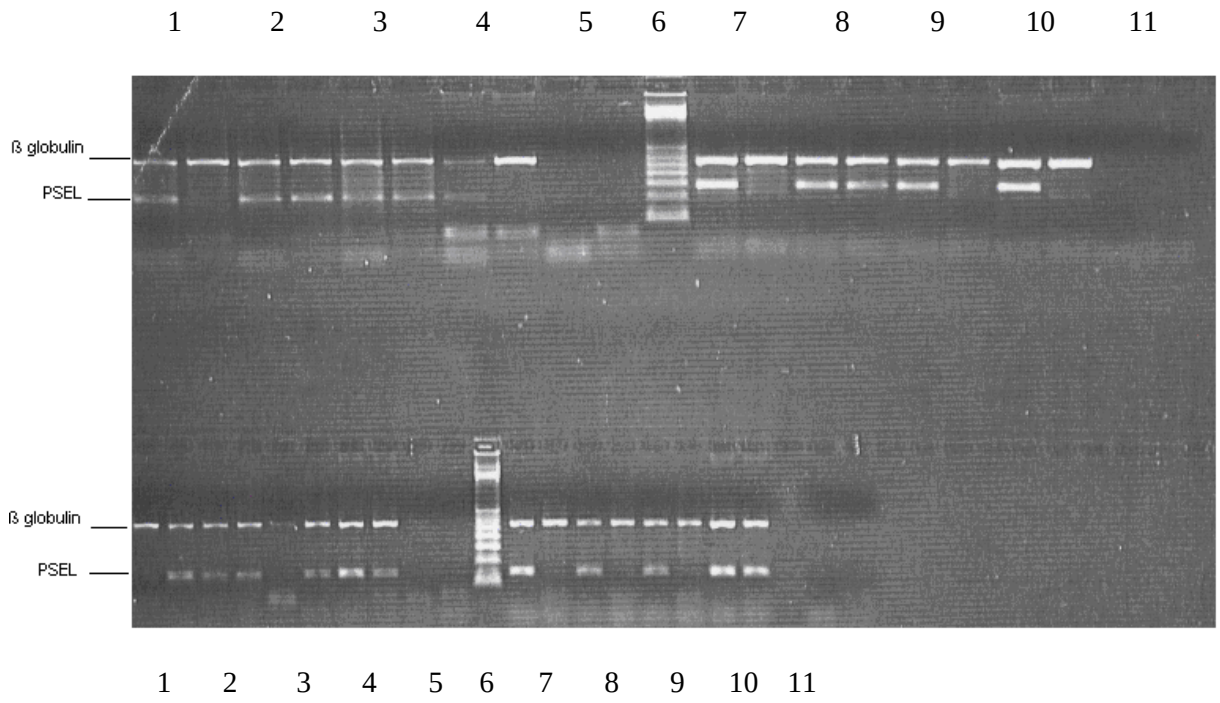
Kao kontrolni uzorci korišteni su kontrolni uzorci poznatih sustava PSEL-a, dobiveni ljubaznošću prof. P. Bugerta (88) i negativna kontrola (voda).

Tablica 7. Protokol izrade reakcijske smjese za genotipizaciju PSEL-a metodom PCR-SSP

Reagens	**Volumen (μL)**	**Koncentracija u 10 μL**
10XPCR pufer I	1,0	1X
dNTP	0,8	0,2 mM
β-glob-F (1:10)	0,2	0,2 μM
β-glob-R (1:10)	0,2	0,2 μM
SELP-F	0,1	1 μM
SELP-R	0,1	1 μM
Sterilna destilirana H20	6,5	
AmpliTaq polimeraza	0,1	0,5 U
Genomska DNA	1,0	10 ng

Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA). Reakcijski uvjeti PCR su bili: 2 min na 95°C (jedino za S290N, 10 min na 95°C); 10 ciklusa od 10 s na 95°C i 60 s na 65°C; 20 ciklusa od 10 s na 95°C, 60 s na 61°C i 20 s na 72°C i na kraju produljenje od 10 min na 72°C.

Kvaliteta i veličina umnoženih ulomaka DNA ispituje se elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu i bojanjem etidijevim bromidom na 180V/200mA/40min. Uz svaku seriju uzoraka pri elektroforetskom odvajanju uključili smo kontrolu, kao i molekularni biljeg od 100 pb (Amersham Pharmacia, Velika Britanija). Dobiveni produkti detektiraju se pod UV-transluminatorom i rezultati se dokumentiraju fotografiranjem kamerom GBOX (Syngene, USA) (Slika 8).



Slika 8. Elektroforeza produkata alel-specifičnog PCR-a gena za PSEL na agaroznom gelu. Gornji fragmenti od 536 pb predstavljaju ß globulin (pozitivna interna kontrola), a donji fragmenti predstavljaju različite PSEL. Gornji red od 1-5 predstavlja polimorfizam S290N (1-SS, 2-SN, 3-SN, 4-SS, 5-slijepa), 6 je marker od 100pb, od 7-11 je polimorfizam V559L (7-VV, 8-VL, 9-VV, 10-VV, 11-slijepa). Donji red od 1-5 predstavlja polimorfizam N562D (1-DD, 2-ND, 3-DD, 4-ND, 5-slijepa), 6 je marker od 100pb, od 7-11 je polimorfizam T715P (7-TT, 8-TT, 9-TT, 10-TP, 11-slijepa).

Genotip je određen prisutnošću ili odsutnošću fragmenata. Prisutnost fragmenta od 536pb ljudskog gena β-globulina ukazuje da je došlo do umnažanja, odnosno β-globulin predstavlja pozitivnu unutarnju kontrolu. Pojava kraćih fragmenata ukazuje na prisutnost odgovarajućeg alela.

4.2.4. Analiza DNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu

Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (od engl. *real-time PCR*), temeljene na TaqMan tehnologiji istovremeno je moguće izvođenje genotipizacije većeg broja uzoraka. TaqMan tehnologija omogućava otkrivanje specifičnih produkata koji se amplificiraju za vrijeme PCR-a primjenom fluorescentnih proba, specifičnih za alele a i b. Na 5' kraju specifičnih proba nalazi se VIC (alel a) ili FAM (alel b) fluorescentna boja, a na 3' kraju je prigušivač NFQ (od engl. *nonfluorescent quencher*). Dok su probe cjelovite nema

fluorescencije, ali za vrijeme reakcije PCR-a, 5 nukleazna aktivnost polimeraze, cijepa probu i odvaja se fluorescentna boja. Količina fluorescencije razmjerna je količini produkta PCR-a. Dobiveni rezultati očitavaju se na dijagramu kao završna točka, a prema položaju točaka na dijagramu određuje se postojanje pojedinih alela.

4.2.4.1. Genotipizacija HPA metodom PCR-a u stvarnom vremenu

Osim standardne metode PCR-SSP, genotipizacija HPA izvršena je i metodom PCR-a u stvarnom vremenu temeljene na TaqMan tehnologiji prema Ficko i sur. (135).

Reagensi:

1. TaqMan Genotyping Master Mix, 2X (Applied Biosystems, USA)
   (AmplyTaq Gold polimeraza, dNTP, pufer)

2. HPA specifične ishodnice (Applied Biosystems, USA), 100pmol/µL

   HPA-1 F 5'-TGA TTG CTG GAC TTC TCT TTG G -3'
   HPA-1 R 5'-CTC ACT GGG AAC TCG ATG GAT T -3'

   HPA-2 F 5'-GAG CTC TAC CTG AAA GGC AAT GA-3'
   HPA-2 R 5'-TGT TGT TAG CCA GAC TGA GCT TCT-3'

   HPA-3 F 5'-GCC TGA CCA CTC CTT TGC C-3'
   HPA-3 R 5'- TGC GAT CCC GCT TGT GA-3'

   HPA-5 F 5'- CTT TCC AAA TGC AAG TTA AAT TAC CAG-3'
   HPA-5 R 5'- TGA CCT AAA GAA AGA GGA AGG AAG AGT-3'

3. HPA specifične MGB probe (Applied Biosystems, USA), 100pmol/µL

   HPA-1a 5'-VIC- CCT CTG GGC TCA CCT -3'NFQ
   HPA-1b 5'-FAM- CCT CCG GGC TCA CCT -3'NFQ

   HPA-2a 5'-VIC-CCT GTT TAC TAT CAA AGA G-3'NFQ
   HPA-2b 5'-FAM- CTC CTG ATG CCC ACA C-3'NFQ

   HPA-3a 5'-VIC-CTG CCC ATC CCC A-3'NFQ
   HPA-3b 5'-FAM-CTG CCC AGC CCC A-3'NFQ

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

Postupak:

Za svakog ispitanika pripremaju se 4 smjese koje sadrže različite ishodnice i MGB probe potrebne za umnažanje HPA-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -5a, -5b, kao i TaqMan Genotyping Master Mix prema protokolu prikazanom u Tablici 8. Ishodnice i MGB probe koje su odabrane za ovo istraživanje opisane su u radu Ficko i sur. (135).

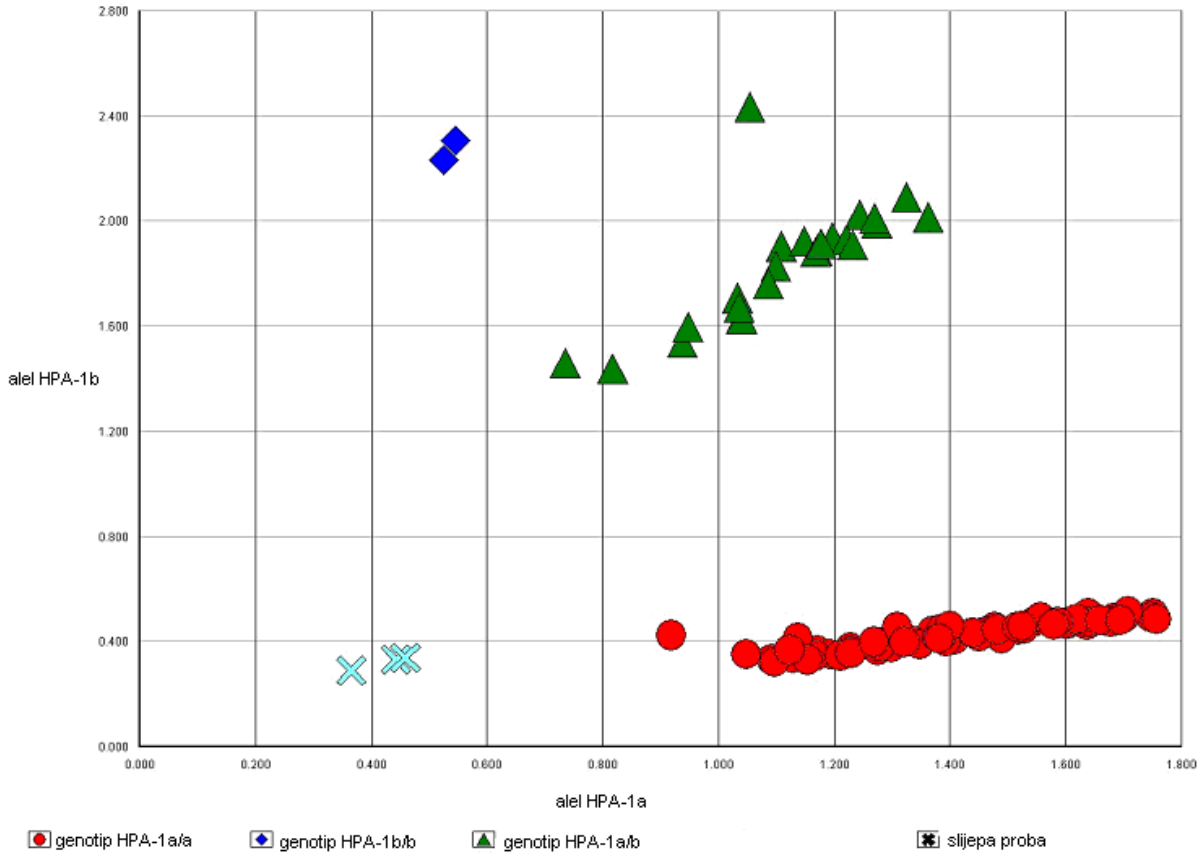
Tablica 8. Protokol izrade reakcijske smjese genotipizacije HPA PCR-om u stvarnom vremenu

Reagens	**HPA-1**	**HPA-2**	**HPA-3**	**HPA-5**
	V(µl) [C(nM)]			
TaqMan master mix	10 [1X]			
Sterilna destilirana H20	7,84	7,1	4,78	6,1
HPA-X-F	0,40 [200]	0,60 [300]	1,80 [900]	1,20 [600]
HPA-X-R	0,40 [200]	0,60 [300]	1,80 [900]	1,20 [600]
HPA-Xa	0,20 [100]	0,35 [175]	0,38 [190]	0,32 [160]
HPA-Xb	0,16 [80]	0,35 [175]	0,24 [120]	0,18 [90]
DNA (50-100 µg/ml)	1			

Kao kontrolni uzorci HPA -1, -2, -3 i -5 korištene su B limfoblastične stanične linije poznatih sustava HPA (134) i negativna kontrola (voda).
Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav TaqMan 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Reakcijski uvjeti PCR su bili: 2min na 50°C; 10 min na 95°C, 45 ciklusa od 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. U svakoj seriji uzoraka korištene su pozitivna i negativna kontrola (voda).

Nakon završetka real-time PCR-a, izvršena je detekcija završne točke, pri čemu smo koristili dijagram, os x obuhvaća signale fluorescentne boje VIC (alel a), a os y signale fluorescentne boje FAM (alel b).

Pozitivni rezultat real-time PCR-a ukazuje na povećanje fluoroscentnog intenziteta VIC kada su uzorci homozigoti aa, povećani intenzitet fluorescencije FAM kada su uzorci homozigoti bb ili povećanje oba signala (VIC, FAM) kada su uzorci heterozigoti ab (Slika 9).



Slika 9. Genotipizacija HPA-1 PCR-om u stvarnom vremenu. Na dijagramu svaki ispitivani uzorak je predstavljen kao pojedinačna točka. Homozigotni uzorci (HPA-1a/a) pokazuju pojačanu fluorescenciju duž osi X, homozigotni uzorci (HPA-1b/b) duž osi Y, a heterozigotni uzorci (HPA-1a/b) nalaze se u centru dijagrama.

Ovom metodom ukupno je genotipizirano 250 ispitanika, od kojih je 50 ispitanika genotipizirano i PCR-SSP-om. Dobiveni rezultati genotipizacije objema metodama pokazali su 100% podudarnost.

4.2.5. Analiza DNA metodom PCR-RFLP

Analiza DNA metodom PCR-RFLP, lančane reakcije polimerazom s određivanjem polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (od engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length plymorphisms*) korištena je za utvrđivanje točkaste mutacije FV Leiden (136) i FII G20210A (137). Prvo se selektivno umnoži dio izolirane genomske DNA, a nakon toga se digestiraju PCR-ulomci pomoću restrikcijskih endonukleaza.

4.2.5.1. Utvrđivanje točkaste mutacije gena za FV G1691A (FV Leiden)

Reagensi:

1. 10XPCR pufer II (Applied Biosystems, USA)

KCl (500 mM)
Tris-HCl (100 mM), pH 8,3

2. AmpliTaq DNA polimeraza (Applied Biosystems, USA)

AmpliTaq polimeraza (250 U) 5IJ/μL

3. Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) (Applied Biosystems, USA)

(dATP, dCTP, dGTP,dTTP), otopina 10 mM

4. otopina Mg Cl_2 (Applied Biosystems, USA) 25mM

5. specifične ishodnice (Tib-Molbiol, Njemačka)100 pmol/μL

FV I: 5' GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA 3'
FV II: 5' TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC 3'

6. sterilna destilirana H_20

Postupak:

Za svakog ispitanika priprema se smjesa ishodnica (136), potrebnih za umnažanje ulomka FV prema protokolu prikazanom u Tablici 9. Kao kontrolni uzorci korištene su pozitivna i negativna kontrola (voda).

Tablica 9. Protokol izrade reakcijske smjese za umnažanje ulomka FV

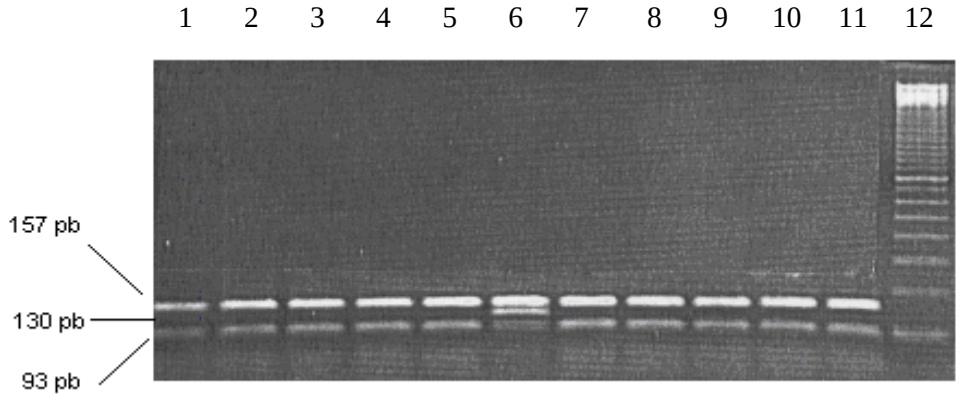
Reagens	**Volumen (μL)**	**Koncentracija u 50 μL**
10 X PCR pufer II	5	1 X
$MgCl_2$	5	1,25mM
dNTP	4	200μM
primer FV I	0,22	13,2 μM
primer FV II	0,22	13,2 μM
Taq DNA polimeraza	0,25	1,25 U
dest.H_2O	34	
DNA (150 μg/ml)	1	80 ng

Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems, USA). Reakcijski uvjeti PCR su bili: 5 min na 94°C; 30 ciklusa od 60 s na 93°C, 30 s na 62°C i 90 s na 72°C i na kraju produljenje od 10 min na 72°C.

Nakon PCR-a slijedi provjera umnoženog produkta elektroforetskim odvajanjem na 0,3%-tnom agaroza gelu i bojanje s etidijevim bromidom.

Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata načinjen je dodatkom restrikcijskog enzima Mnl I (New England BioLabs, Njemačka) kroz 12 sati na 37˚C, pri čemu se cijepa umnoženi produkt.

Elektroforetsko odvajanje fragmenata učinjeno je na 1,5%-tnom agaroznom gelu (Applied Biosystems, USA) i bojanjem s etidijevim bromidom, a uz svaku seriju uzoraka uključili smo digeriranu pozitivnu kontrolu heterozigota i molekularni biljeg od 100 pb (Amersham Pharmacia, Velika Britanija). Dobiveni fragmenti detektiraju se i dokumentiraju fotografiranjem kamerom GBOX (Syngene, USA). Rezultati očitavanja vrpci nakon elektroforetskog razdvajanja i bojanja mogu ukazati na normalni genotip FV (fragmenti od 93 pb i 157 pb), mutirani genotip-heterozigot (fragmenti od 93pb, 130pb i 157pb) i mutirani genotip-homozigot (fragmenti od 130pb i 157pb). Na Slici 10 su prikazani normalni genotip FV (GG) i mutirani genotip-heterozigot (GA).



Slika 10. Utvrđivanje točkaste mutacije FV G1691A metodom PCR-RFLP nakon elektroforeze na agaroznom gelu. Uzorci od 1-5 i od 7-11 prikazuju ispitanike s nepromijenjenim genotipom za FV (GG), uzorak 6 je ispitanik heterozigot za FVL (GA). Na poziciji 12 nalazi se marker od 100 pb.

4.2.5.2. Utvrđivanje točkaste mutacije gena za FII zgrušavanja krvi (FII G20210A)

Reagensi:

1. 10XPCR pufer II (Applied Biosystems, USA)

KCl (500 mM)
Tris-HCl (100 mM), pH 8,3

2. AmpliTaq DNA polimeraza (Applied Biosystems, USA)

AmpliTaq polimeraza (250 U) 5IJ/μL

3. Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) (Applied Biosystems, USA)

(dATP, dCTP, dGTP,dTTP), otopina 10 mM

4. otopina Mg Cl_2 (Applied Biosystems, USA) 25mM

5. BSA I 1mg/ml

6. specifične ishodnice (Tib-Molbiol, Njemačka)100 pmol/μL
FII I: 5' TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3'
FII II: 5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C 3'

7. sterilna destilirana H_20

Postupak:

Za svakog ispitanika priprema se smjesa različitih ishodnica (137) potrebnih za umnažanje ulomka FII prema protokolu prikazanom u Tablici 10. Kao kontrolni uzorci korištene su pozitivna i negativna kontrola (voda).

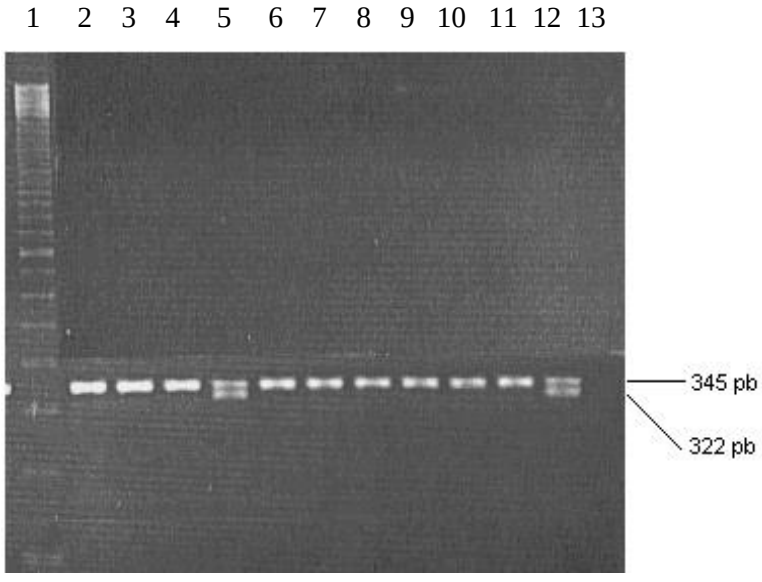
Tablica 10. Protokol izrade reakcijske smjese za umnažanje ulomka FII

Reagens	Volumen (μL)	Koncentracija u 50 μL
10 X PCR pufer II	5	1 X
$MgCl_2$	4	1,0 mM
dNTP	4	200μM
BSA (1mg/ml)	5	0,1 mg/ml
primer FII I	0,2	12 μM
primer FII II	0,2	12 μM
Taq DNA polimeraza	0,2	1 U
dest.H_2O	29,4	
DNA (300 μg/ml)	2	80 ng

Za umnažanje ulomaka korišten je automatizirani sustav Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems, USA). Reakcijski uvjeti PCR su bili: 4 min na 94°C; 32 ciklusa od 60 s na 93°C, 60 s na 55°C i 60 s na 67°C i na kraju 10 min na 4°C.

Nakon PCR-a slijedi provjera umnoženog produkta elektroforetskim odvajanjem na 0,3%-tnom agaroza gelu i bojanje s etidijevim bromidom.

Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata načinjen je dodatkom restrikcijskog enzima Hind III (Roche, Njemačka) kroz 12 sati na 37˚C, pri čemu se cijepa umnoženi produkt. Elektroforetsko odvajanje fragmenata učinjeno je na 1,5%-tnom agaroznom gelu (Applied Biosystems, USA) i bojanjem s etidijevim bromidom, a uz svaku seriju uzoraka uključili smo digeriranu pozitivnu kontrolu heterozigota i molekularni biljeg od 100 pb (Amersham Pharmacia, Velika Britanija). Dobiveni fragmenti detektiraju se i dokumentiraju fotografiranjem kamerom GBOX (Syngene, USA). Rezultati očitavanja vrpci nakon elektroforetskog razdvajanja i bojanja mogu ukazati na normalni genotip FII (fragmenti od 345 pb), mutirani genotip-heterozigot (fragmenti od 345pb i 322pb) i mutirani genotip-homozigot (fragmenti od 322pb i 23pb). Na Slici 11 su prikazani normalni genotip FII (GG) i mutirani genotip-heterozigot (GA).



Slika 11. Utvrđivanje točkaste mutacije FII G20210A metodom PCR-RFLP nakon elektroforeze na agaroznom gelu. Na poziciji 1 nalazi se marker od 100 pb.Uzorci od 2-4 i od 6-11 prikazuju ispitanike s nepromijenjenim genotipom za FII (GG), uzorci 5 i 12 su ispitanici heterozigoti za FII 20210A (GA). Negativna kontrola (voda) nalazi se na poziciji 13.

4.3. Statistička analiza

Normalnost razdiobe kvantitativne varijable (dob) ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Dob je, bez obzira na vrstu razdiobe, prikazana medijanom te rasponom (minimum-maksimum). Ispitivanje statistički značajne razlike između dviju skupina neparnih podataka za kvantitativnu varijablu dobi provedeno je parametrijskim t-testom. Kategoričke varijable su prikazane cijelim brojem i postotkom (N, %).

Za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina kategoričkih podataka (genotipovi, aleli, spol) korišten je hi-kvadrat test ili Fisherov test ovisno o broju uzoraka.

Isti test je korišten i za ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže. Pomoću Courtlab programa (www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator) za svaki polimorfizam izračunate su očekivane učestalosti za pojedine genotipove. Hi-kvadrat testom ispitano je postojanje statistički značajne razlike između očekivanih (izračunatih) učestalosti i učestalosti dobivenih u istraživanju. Ukoliko nema razlike između očekivanih i dobivenih učestalosti, dobivena P vrijednost bila je veća od 0,05 i raspodjela polimorfizma nalazi se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. P vrijednost manja od 0,05 ukazuje da raspodjela ispitivanog polimorfizma odstupa od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Razlike u učestalosti pojedinih alela u europskoj populaciji određene su usporedbom dvaju omjera, kao i usporedbe učestalosti haplotipova.

Jačina povezanosti polimorfizama s pojavom bolesti procjenjena je određivanjem omjera vjerojatnosti (engl. *odds ratio,* OR) uz pripadajuće 95% raspone pouzdanosti (engl. *confidence interval,* CI). Za sve polimorfizme OR je određen prema dominantnom modelu, a za polimorfizme HPA-3, S290N i N562D i prema recesivnom modelu. U dominantnom modelu homozigotnu ili heterozigotnu varijantu genotipa usporedili smo s homozigotom divljeg tipa. U recesivnom modelu homozigotni genotip usporedili smo s heterozigotnom varijantom i homozigotom divljeg tipa. Ukoliko je OR > 1, tada ispitivana varijabla povećava vjerojatnost od nastanka ispitivanog ishoda (djeluje kao rizični faktor), a ukoliko je OR < 1 ispitivana varijabla smanjuje vjerojatnost od nastanka ishoda (djeluje protektivno).

Regresijska analiza načinjena je stupnjevito. Prvo su u univarijantnoj regresijskoj analizi identificirani čimbenici koji su bili statistički značajni u predviđanju ishoda. Da bi varijabla

bila statistički značajna dobivena P vrijednost mora biti < 0,05. Svaka je varijabla opisana i pomoću parametra OR s pripadajućim 95%-tnim rasponom pouzdanosti. Kada su identificirane statistički značajne varijable u univarijantnoj analizi, sve značajne varijable uključene su u multivarijantni regresijski model. Varijable koje su ostale značajne u ovom modelu smatrane su statistički značajnim prediktorima ishoda.

U svim testovima koji su upotrijebljeni u radu P vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom i ukazivala je na postojanje razlike između skupina.

Podaci su prikupljeni i pohranjeni u programu Microsoft Excel Office 2003. Statističko testiranje provedeno je korištenjem programa Medcalc ®, verzija 9.3.2.0 (Frank Schoonjans, Mariakerke, Belgija). Analiza haplotipova načinjena je programom Hapstat, verzija 3.0 (Department of Biostatistic and the University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina, USA).

5. REZULTATI

5.1. Osnovne značajke ispitanika u ispitivanim skupinama i podskupinama

U skupinama s CVP-om obrađeno je ukupno 300 bolesnika, 100 dječje i 200 odrasle dobi, a u kontrolnim skupinama ukupno 200 ispitanika od čega 100 dječje i 100 odrasle dobi. Svim ispitanicima izolirana je DNA iz leukocita periferne krvi i određeni polimorfizmi HPA, gena za PSEL, te FV G1691A i FII G20210 A. Za sve ispitanike prikupljeni su podaci o dobi, spolu te vrsti CVP-a (iCVI, TIA). Osnovni podaci o ispitivanim skupinama i podskupinama prikazani su u Tablici 11. Podaci o dobi ispitanika prikazani su medijanom i rasponom (minimum i maksimum).

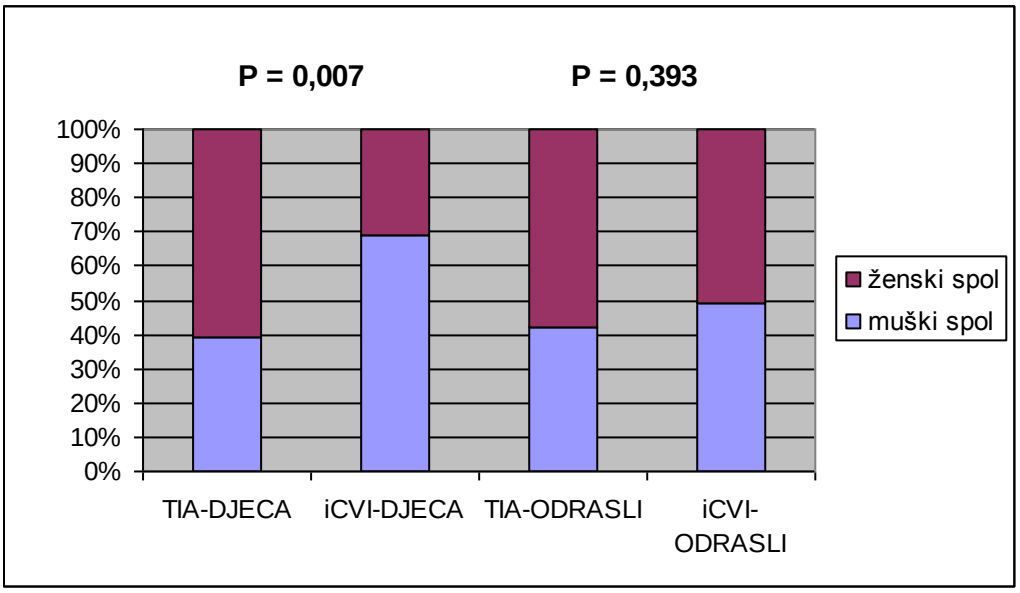
Tablica 11. Dob, spol i veličina promatranih skupina i podskupina ispitanika

ISPITIVANE SKUPINE I PODSKUPINE	N	DOB (godine)		SPOL		UDIO SKUPINE, PODSKUPINE %
				M	Ž	
		M (MIN-MAX)[a]	95% CI[b]	N (%)	N (%)	
TIA-DJECA	36	12 (3 – 17)	11 – 14	14 (38,9)	22 (61,1)	7,2
iCVI-DJECA	64	7 (1 – 18)	6 – 9	44 (68,8)	20 (31,2)	12,8
CVP DJECA-UKUPNO	100	9 (1 – 18)	7 – 11	58 (58,0)	42 (42,0)	20,0
TIA-ODRASLI	74	70 (27 – 92)	62 – 74	31 (41,9)	43 (58,1)	14,8
iCVI-ODRASLI	126	64 (20 – 88)	62 – 65	62 (49,2)	64 (50,8)	25,2
CVP ODRASLI-UKUPNO	200	64 (20 – 92)	63 – 65	93 (46,5)	107 (53,5)	40,0
CVP SVI-UKUPNO	300	56 (1 – 92)	50 – 60	151 (50,3)	149 (49,7)	60,0
KONTROLE-DJECA	100	9 (1 – 18)	7 – 10	58 (58,0)	42 (42,0)	20,0
KONTROLE-ODRASLI	100	60 (32 – 91)	56 – 65	47 (47,0)	53 (53,0)	20,0
KONTROLE-UKUPNO	200	25 (1 – 91)	15 – 47	105 (52,5)	95 (47,5)	40,0
SVEUKUPNO	500	48 (1 – 92)	45 – 53	256 (51,2)	244 (48,8)	100,0

[a]medijan i raspon (minimum i maksimum), [b] raspon pouzdanosti

U ispitivanim podskupinama djece (iCVI, TIA) dobivena je značajna razlika u učestalosti spola (P = 0,007). U djece s TIA-om bio je učestaliji ženski spol (61,1%), za razliku od djece s iCVI-om u kojih je bio učestaliji muški spol (68,8%) (Tablica 11, Slika 12). Djeca s iCVI-om su značajno mlađa od djece s TIA-om (7 god. vs. 12 god.; P < 0,001). Kontrolna skupina djece podudarna je prema dobi i spolu ispitivanoj skupini djece s CVP-om (Tablica 11).

Zastupljenost muškog i ženskog spola u odraslih s iCVI-om bila je podjednaka (49,2% vs. 50,8%), za razliku od TIA-e u kojoj je učestaliji ženski spol (58,1%), ali bez statističke značajnosti (P = 0,393) (Slika 12). Između odraslih s iCVI-om i TIA-om nije dobivena statistički značajna razlika u godinama (64 god. vs. 70 god.; P = 0,052). Kontrolna skupina odraslih podudarna je prema dobi i spolu skupini odraslih s CVP-om (Tablica 11, 13).



Slika 12. Učestalost spola u ispitivanim podskupinama (iCVI, TIA) u djece i odraslih

5.2. Standardni čimbenici rizika u odraslih ispitanika

Kliničke karakteristike odraslih ispitanika (kontrolna skupina, skupina s CVP-om, podskupine s iCVI-om i TIA-om) prikazane su u Tablici 12. U ispitanike sa srčanim bolestima uvrstili smo slijedeće poremećaje: poremećaj ritma, infarkt miokarda, stabilnu i nestabilnu anginu pektoris. U ispitanike pušača osim sadašnjih pušača, uvrstili smo i bivše. Alkohol kao čimbenik rizika uvršten je za one ispitanike koji piju svaki dan 2 dl ili veće količine alkohola. Ispitanici s BMI >25 kg/m^2 svrstani su u pretile.

Tablica 12. Kliničke karakteristike ispitivanih skupina i podskupina odrasle populacije

ČIMBENICI RIZIKA	KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		CVP-ODRASLI (N = 200)		iCVI-ODRASLI (N = 126)		TIA-ODRASLI (N = 74)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
pozitivna obiteljska anamneza								
ne	94	94,0	149	74,5	85	67,5	64	86,5
da	6	6,0	51	25,5	41	32,5	10	13,5
hipertenzija								
ne	64	64,0	67	33,5	43	34,1	24	32,4
da	36	36,0	133	66,5	83	65,9	50	67,6
šećerna bolest								
ne	94	94,0	151	75,5	89	70,6	62	83,8
da	6	6,0	49	24,5	37	29,4	12	16,2
hiperkolesterolemija								
ne	60	60,0	101	50,5	65	51,5	36	48,6
da	40	40,0	99	49,5	61	48,4	38	51,4
hipertrigliceridemija								
ne	71	71,0	131	65,5	81	64,3	50	67,6
da	29	29,0	69	34,5	45	35,7	24	32,4
srčane bolesti								
bez tegoba	82	82,0	145	72,5	86	68,3	59	79,7
poremećaj ritma	14	14,0	34	17,0	23	18,3	11	14,9
infarkt miokarda	4	4,0	8	4,0	6	4,8	2	2,7
stabilna angina pektoris	0	0,0	7	3,5	7	5,6	0	0,0
nestabilna angina pektoris	0	0,0	6	3,0	4	3,2	2	2,7
pušenje								
puši	26	26,0	57	28,5	39	31,0	18	24,3
ne puši	63	63,0	126	63,0	76	60,3	50	67,6
pušio je	11	11,0	17	8,5	11	8,7	6	8,1
alkoholizam								
ne pije	57	57,0	124	62,0	73	57,9	51	68,9
povremeno 2dl	41	41,0	42	21,0	25	19,8	17	23,0
svaki dan 2 dl	2	2,0	30	15,0	24	19,1	6	8,1
veće količine	0	0,0	4	2,0	4	3,2	0	0,0
pretilost								
BMI* <18,5 kg/m^2	1	1,0	7	3,5	5	4,0	2	2,7
18,5-25 kg/m^2	71	71,0	122	61,0	68	53,9	54	73,0
25-30 kg/m^2	26	26,0	55	27,5	39	31,0	16	21,6
>30 kg/m^2	2	2,0	16	8,0	14	11,1	2	2,7

*BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

U odraslih s CVP-om statistički je značajno više nego u kontrolnoj skupini odraslih, ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom (25,5% vs. 6,0%; P < 0,001), hipertenzijom (66,5% vs. 36,0%; P < 0,001), šećernom bolesti (24,5% vs. 6,0%; P < 0,001) i alkoholizmom (17,0% vs. 2,0%; P < 0,001). Rezultati su prikazani u Tablici 13.

Tablica 13. Učestalost pojedinih čimbenika rizika u ispitivanoj skupini s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

ČIMBENICI RIZIKA		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		CVP-ODRASLI (N = 200)		P
		N	%	N	%	
spol	**M** **Ž**	47 53	47,0 53,0	93 107	46,5 53,5	0,967
pozitivna obiteljska anamneza	**ne** **da**	94 6	94,0 6,0	149 51	74,5 25,5	***<0,001***
hipertenzija	**ne** **da**	64 36	64,0 36,0	67 133	33,5 66,5	***<0,001***
šećerna bolest	**ne** **da**	94 6	94,0 6,0	151 49	75,5 24,5	***<0,001***
hiperkolesterolemija	**ne** **da**	60 40	60,0 40,0	101 99	50,5 49,5	0,152
hipertrigliceridemija	**ne** **da**	71 29	71,0 29,0	131 69	65,5 34,5	0,408
srčane bolesti	**ne** **da**	82 18	82,0 18,0	145 55	72,5 27,5	0,096
pušenje	**ne** **da**	63 37	63,0 37,0	126 74	63,0 37,0	0,899
alkoholizam	**ne** **da**	98 2	98,0 2,0	166 34	83,0 17,0	***<0,001***
pretilost (BMI*>25 kg/m^2)	**ne** **da**	72 28	72,0 28,0	129 71	64,5 35,5	0,241
dob (godine)		60 (32-91)		64 (20-92)		0,176

*BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

U odraslih s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih prisutna je statistički učestalija pozitivna obiteljska anamneza ($P < 0,001$), hipertenzija ($P < 0,001$), šećerna bolest ($P < 0,001$), alkoholizam ($P < 0,001$) i pretilost ($P = 0,040$) (podaci nisu prikazani).

U odraslih s TIA-om u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih prisutna je jedino statistički učestalija hipertenzija ($P < 0,001$) (podaci nisu prikazani).

5.3. Utvrđivanje učestalosti polimorfizama HPA u kontrolnoj skupini

Raspodjela učestalosti polimorfizama HPA-1, -2, -3 i -5 utvrđena je za ispitanike kontrolnih podskupina prema dobi (odrasli, djeca) kao i za ispitanike ukupne kontrolne skupine. Za svaki su polimorfizam HPA prikazane učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 14.

Tablica 14. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanim kontrolnim podskupinama (odrasli, djeca) i ukupnoj kontrolnoj skupini

GENOTIP/ ALEL HPA		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		KONTROLE-DJECA (N = 100)		P	KONTROLE-UKUPNO (N = 200)	
		N	%	N	%		N	%
HPA-1	a/a	77	77,0	71	71,0	0,420	148	74,0
	a/b	21	21,0	27	27,0		48	24,0
	b/b	2	2,0	2	2,0		4	2,0
	a	175	87,5	169	84,5	0,415	344	86,0
	b	25	12,5	31	15,5		56	14,0
HPA-2	a/a	70	70,0	81	81,0	0,100	151	75,5
	a/b	29	29,0	19	19,0		48	24,0
	b/b	1	1,0	0	0,0		1	0,5
	a	169	84,5	181	90,5	0,096	350	87,5
	b	31	15,5	19	9,5		50	12,5
HPA-3	a/a	30	30,0	29	29,0	0,100	59	29,5
	a/b	59	59,0	49	49,0		108	54,0
	b/b	11	11,0	22	22,0		33	16,5
	a	119	59,5	107	53,5	0,267	226	56,5
	b	81	40,5	93	46,5		174	43,5
HPA-5	a/a	79	79,0	80	80,0	1,000	159	79,5
	a/b	21	21,0	18	18,0		39	19,5
	b/b	0	0,0	2	2,0		2	1,0
	a	179	89,5	178	89,0	1,000	357	89,3
	b	21	10,5	22	11,0		43	10,7

Raspodjela učestalosti ispitivanih polimorfizama HPA (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5) u ukupnoj kontrolnoj skupini nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,963; P = 0,170; P = 0,163; P = 0,819). Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA u

kontrolnim podskupinama prema dobi (odrasli, djeca) pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 14).

Ispitivanjem raspodjele učestalosti polimorfizama HPA u kontrolnoj podskupini odraslih prema spolu, kao i kontrolnoj podskupini djece prema spolu pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 15, 16).

Tablica 15. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u kontrolnoj podskupini odraslih, prema spolu

GENOTIP/ ALEL HPA		**MUŠKARCI (N = 47)**		**ŽENE (N = 53)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	
HPA-1	**a/a**	36	76,6	41	77,3	
	a/b	10	21,3	11	20,8	1,000
	b/b	1	2,1	1	1,9	
	a	82	87,2	93	87,7	
	b	12	12,8	13	12,3	1,000
HPA-2	**a/a**	30	63,8	40	75,5	
	a/b	17	36,2	12	22,6	0,275
	b/b	0	0,0	1	1,9	
	a	77	81,9	92	86,8	
	b	17	18,1	14	13,2	0,434
HPA-3	**a/a**	13	27,6	17	32,1	
	a/b	31	66,0	28	52,8	0,667
	b/b	3	6,4	8	15,1	
	a	57	60,6	62	58,5	
	b	37	39,4	44	41,5	0,775
HPA-5	**a/a**	37	78,7	42	79,2	
	a/b	10	21,3	11	20,8	1,000
	b/b	0	0,0	0	0,0	
	a	84	89,4	95	89,6	
	b	10	10,6	11	10,4	1,000

Tablica 16. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u kontrolnoj podskupini djece, prema spolu

GENOTIP/ ALEL HPA		MUŠKI (N = 58)		ŽENSKI (N = 42)		P
		N	%	N	%	
HPA-1	a/a	44	75,9	27	64,3	
	a/b	12	20,7	15	35,7	0,265
	b/b	2	3,4	0	0,0	
	a	100	86,2	69	82,1	
	b	16	13,8	15	17,9	0,437
HPA-2	a/a	48	82,8	33	78,6	
	a/b	10	17,2	9	21,4	0,615
	b/b	0	0,0	0	0,0	
	a	106	91,4	75	89,3	
	b	10	8,6	9	10,7	0,633
HPA-3	a/a	15	25,9	14	33,3	
	a/b	31	53,4	18	42,9	0,567
	b/b	12	20,7	10	23,8	
	a	61	52,6	46	54,8	
	b	55	47,4	38	45,2	0,776
HPA-5	a/a	46	79,3	34	81,0	
	a/b	10	17,2	8	19,0	1,000
	b/b	2	3,5	0	0,0	
	a	102	87,9	76	90,5	
	b	14	12,1	8	9,5	0,651

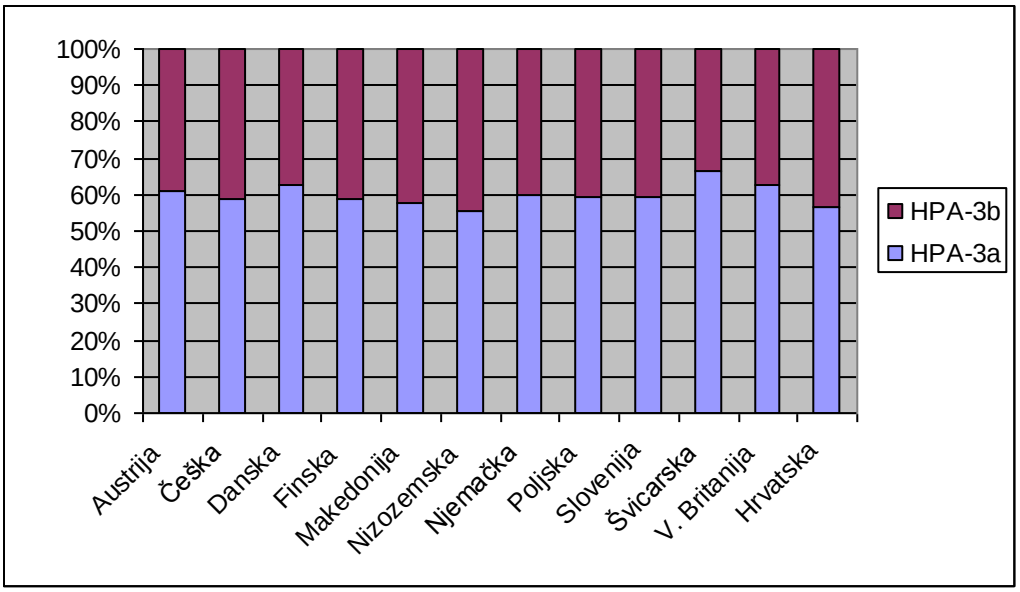
Dobiveni rezultati našeg ispitivanja alelne učestalosti HPA uspoređene su s rezultatima drugih populacijskih studija u Europi. Prikaz dobivenih vrijednosti za populaciju nekih europskih zemalja, uz broj ispitanika nalazi se u Tablici 17, među kojima su i naši rezultati. Za većinu ispitivanih HPA ne postoji značajna razlika u dobivenim učestalostima između naše i europske populacije.

Tablica 17. Učestalost alela HPA u nekim europskim zemljama i Hrvatskoj

ZEMLJA	**N**	**HPA-1**		**HPA-2**		**HPA-3**		**HPA-5**	
		a(%)	**b**(%)	**a**(%)	**b**(%)	**a**(%)	**b**(%)	**a**(%)	**b**(%)
Austrija (138)	906-931	85,2	14,8	91,8	8,2	61,2	38,8	89,2	10,8
Češka (139)	235	83	17	90	10	59	41	93	7
Danska (140)	163-557	83,1	16,9	91,7	8,3	62,6	37,4	92,1	7,8
Finska (141)	200	86,0	14,0	91,0	9,0	59,0	41,0	95,0	5,0
Makedonija (142)	115-132	86,5	13,5	85,2	14,8	57,8	42,2	90,9	9,1
Nizozemska (143)	200	84,6	15,4	93,4	6,6	55,5	44,5	90,2	9,8
Njemačka (77)	321	85,0	15,0	94,0	6,0	60,0	40,0	92,0	8,0
Poljska (144)	130-211	87,4	12,6	89,8	10,2	59,2	40,8	93,7	6,3
Slovenija (68)	152	80,9	19,1	89,1	10,9	59,2	40,8	93,4	6,6
Švicarska (145)	499-500	83,2	16,8	89,9	10,1	66,7	33,3	89,2	10,8
Velika Britanija (146)	134	84,0	16,0	92,5	7,5	62,7	37,3	91,4	8,6
Hrvatska (kontrole-ukupno)	200	86,0	14,0	87,5	12,5	56,5	43,5	89,3	10,7

( ): broj u zagradi odnosi se na referencu; N: broj ispitanika; plavom bojom su označene najniže učestalosti, a crvenom najviše učestalosti pojedinih alela u populaciji

U našoj populaciji u odnosu na neke europske populacije dobivena je značajna razlika u alelnoj učestalosti za HPA-2, HPA-3 i HPA-5. Alel HPA-2b bio je značajno učestaliji u našoj populaciji u odnosu na Nijemce ($P < 0,001$), Nizozemce ($P = 0,007$) i Austrijance ($P = 0,009$). Dobivena učestalost alela HPA-3b u naših ispitanika nalazi se među višima u europskoj populaciji i statistički je značajno učestalija nego u Švicaraca ($P < 0,001$). U europskoj populaciji prisutne su najveće razlike u učestalostima alela HPA-3, razlika između najveće učestalosti i najmanje učestalosti alela veća je od 11% (55,5% - 66,7% za HPA-3a i 33,3% - 44,5% za HPA-3b). (Slika 13). Alel HPA-5b, osim u Austrijanaca i Švicaraca, učestaliji je i u našoj populaciji, a statističku značajnost dobili smo samo u odnosu na Dance ($P = 0,004$).



Slika 13. Učestalost alela HPA-3 u europskoj populaciji

5.4. Utvrđivanje učestalosti polimorfizama PSEL-a u kontrolnoj skupini

Raspodjela učestalosti polimorfizama PSEL-S290N, N562D, V599L i T715P utvrđena je za ispitanike kontrolnih podskupina prema dobi (odrasli, djeca) kao i za ispitanike ukupne kontrolne skupine. Za svaki su polimorfizam PSEL-a prikazane učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 18.

Tablica 18. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanim kontrolnim podskupinama (odrasli, djeca) i ukupnoj kontrolnoj skupini

GENOTIP/ ALEL PSEL		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		KONTROLE-DJECA (N = 100)		P	KONTROLE-UKUPNO (N = 200)	
		N	%	N	%		N	%
S290N	SS	59	59,0	63	63,0	0,664	122	61,0
	SN	36	36,0	31	31,0		67	33,5
	NN	5	5,0	6	6,0		11	5,5
	S	154	77,0	157	78,5	0,810	311	77,8
	N	46	23,0	43	21,5		89	22,2
N562D	NN	29	29,0	27	27,0	0,050	56	28,0
	ND	41	41,0	56	56,0		97	48,5
	DD	30	30,0	17	17,0		47	23,5
	N	99	49,5	110	55,0	0,593	209	52,3
	D	101	50,5	90	45,0		191	47,7
V599L	VV	76	76,0	84	84,0	0,216	160	80,0
	VL	23	23,0	16	16,0		39	19,5
	LL	1	1,0	0	0,0		1	0,5
	V	175	87,5	184	92,0	0,187	359	89,8
	L	25	12,5	16	8,0		41	10,2
T715P	TT	86	86,0	86	86,0	1,000	172	86,0
	TP	13	13,0	13	13,0		26	13,0
	PP	1	1,0	1	1,0		2	1,0
	T	185	92,5	185	92,5	1,000	370	92,5
	P	15	7,5	15	7,5		30	7,5

Raspodjela učestalosti ispitivanih polimorfizama PSEL (S290N, N562D, V599L i T715P) u ukupnoj kontrolnoj skupini nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,635; P = 0,692; P = 0,397; P = 0,373). Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a u

kontrolnim podskupinama prema dobi (odrasli, djeca) pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 18).

Ispitivanjem raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a u kontrolnoj podskupini odraslih prema spolu, kao i kontrolnoj podskupini djece prema spolu pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 19, 20).

Tablica 19. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u kontrolnoj podskupini odraslih, prema spolu

GENOTIP/ ALEL PSEL		**MUŠKARCI (N = 47)**		**ŽENE (N = 53)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	
S290N	**SS**	30	63,8	29	54,7	0,471
	SN	16	34,1	20	37,7	
	NN	1	2,1	4	7,6	
	S	76	80,9	78	87,7	0,176
	N	18	19,1	28	12,3	
N562D	**NN**	12	25,5	17	32,1	0,651
	ND	19	40,4	22	41,5	
	DD	16	34,1	14	26,4	
	N	43	45,7	56	52,8	0,391
	D	51	54,3	50	47,2	
V599L	**VV**	38	80,9	38	71,7	0,404
	VL	9	19,1	14	26,4	
	LL	0	0,0	1	1,9	
	V	85	90,4	90	84,9	0,335
	L	9	9,6	16	15,1	
T715P	**TT**	38	80,9	48	90,6	0,248
	TP	8	17,0	5	9,4	
	PP	1	2,1	0	0,0	
	T	84	89,4	101	89,6	0,177
	P	10	10,6	5	10,4	

Tablica 20. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u kontrolnoj podskupini djece, prema spolu

GENOTIP/ ALEL PSEL		MUŠKI (N = 58)		ŽENSKI (N = 42)		P
		N	%	N	%	
S290N	SS	41	70,7	22	52,4	
	SN	14	24,1	17	40,5	0,093
	NN	3	5,2	3	7,1	
	S	96	82,8	61	72,6	
	N	20	17,2	23	27,4	0,122
N562D	NN	13	22,4	14	33,3	
	ND	35	60,3	21	50,0	0,462
	DD	10	17,2	7	16,7	
	N	61	52,6	49	58,3	
	D	55	47,4	35	41,7	0,508
V599L	VV	50	86,2	34	81,0	
	VL	8	13,8	8	19,0	0,583
	LL	0	0,0	0	0,0	
	V	108	93,1	76	90,5	
	L	8	6,9	8	9,5	0,600
T715P	TT	52	89,7	34	80,9	
	TP	6	10,3	7	16,7	0,252
	PP	0	0,0	1	2,4	
	T	110	94,8	75	89,3	
	P	6	5,2	9	10,7	0,177

5.5. Utvrđivanje učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u kontrolnoj skupini

Raspodjela učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A utvrđena je za ispitanike kontrolnih podskupina prema dobi (odrasli, djeca) kao i za ispitanike ukupne kontrolne skupine. Za svaku od ispitivanih mutacija FV G1691A i FII G20210A prikazane su učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 21.

Tablica 21. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela FV G1691A i FII G20210A u kontrolnim podskupinama (odrasli, djeca) i ukupnoj kontrolnoj skupini

GENOTIP/ ALEL		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		KONTROLE-DJECA (N = 100)		P	KONTROLE-UKUPNO (N = 200)	
		N	%	N	%		N	%
FV G1691A	GG	98	98,0	97	97,0	1,000	195	97,5
	GA	2	2,0	3	3,0		5	2,5
	AA	0	0,0	0	0,0		0	0,0
	G	198	99,0	197	98,5	1,000	395	98,8
	A	2	1,0	3	1,5		5	1,2
FII G20210A	GG	95	95,0	96	96,0	1,000	191	95,5
	GA	5	5,0	4	4,0		9	4,5
	AA	0	0,0	0	0,0		0	0,0
	G	195	97,5	196	98,0	1,000	391	97,8
	A	5	2,5	4	2,0		9	2,2

Raspodjela učestalosti ispitivanih mutacija FV G1691A i FII G20210A u ukupnoj kontrolnoj skupini nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,858; P = 0,745). Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u kontrolnim podskupinama prema dobi (odrasli, djeca) pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 21).

Ispitivanjem raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u kontrolnoj podskupini odraslih prema spolu, kao i kontrolnoj podskupini djece prema spolu pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 22, 23).

Tablica 22. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela FV G1691A i FII G20210A u kontrolnoj podskupini odraslih, prema spolu

GENOTIP/ ALEL		MUŠKARCI (N = 47)		ŽENE (N = 53)		P
		N	%	N	%	
FV G1691A	GG	47	100,0	51	96,2	0,497
	GA	0	0,0	2	3,8	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	94	100,0	104	98,1	0,499
	A	0	0,0	2	1,9	
FII G20210A	GG	44	95,0	51	96,2	0,664
	GA	3	5,0	2	3,8	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	91	97,5	104	98,1	0,667
	A	3	2,5	2	1,9	

Tablica 23. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela FV G1691A i FII G20210A u kontrolnoj podskupini djece, prema spolu

GENOTIP/ ALEL		MUŠKI (N = 58)		ŽENSKI (N = 42)		P
		N	%	N	%	
FV G1691A	GG	57	98,3	40	95,2	0,571
	GA	1	1,7	2	4,8	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	115	99,1	82	97,6	0,573
	A	1	0,9	2	2,4	
FII G20210A	GG	55	94,8	41	97,6	0,852
	GA	3	5,2	1	2,4	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	113	97,4	83	98,8	0,854
	A	3	2,6	1	1,2	

5.6. Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e

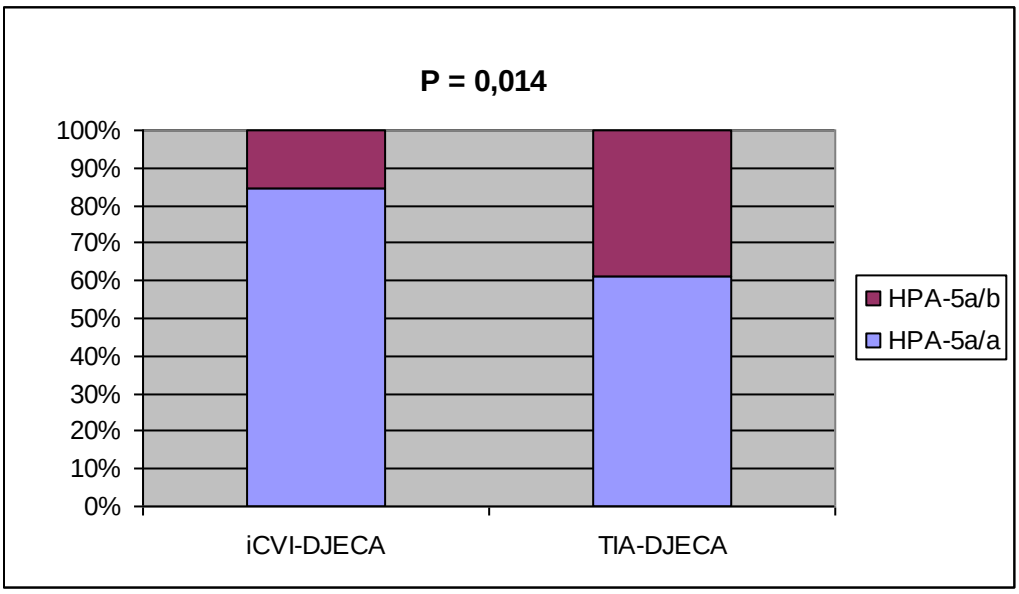
5.6.1. Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e u dječjoj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama HPA-1, -2, -3 i -5 utvrđena je u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, kao i podskupinama djece (iCVI, TIA). Za svaki su polimorfizam HPA u ispitivanoj skupini i podskupinama djece prikazane učestalosti genotipova i alela (Tablica 24). Raspodjela učestalosti polimorfizama HPA (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5) u ispitivanoj skupini djece s CVP-om nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,532; P = 0,751; P = 0,619; P = 0,173).

Tablica 24. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj skupini djece s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL HPA		**CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)**		**iCVI-DJECA (N = 64)**		**TIA-DJECA (N = 36)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
HPA-1	**a/a**	65	65,0	44	68,8	21	58,3	
	a/b	30	30,0	15	23,4	15	41,7	0,383
	b/b	5	5,0	5	7,8	0	0,0	
	a	160	80,0	103	80,5	57	79,2	
	b	40	20,0	25	19,5	15	20,8	0,971
HPA-2	**a/a**	78	78,0	53	82,8	25	69,4	
	a/b	21	21,0	11	17,2	10	27,8	0,138
	b/b	1	1,0	0	0,0	1	2,8	
	a	177	88,5	117	91,4	60	83,3	
	b	23	11,5	11	8,6	12	16,7	0,137
HPA-3	**a/a**	39	39,0	29	45,3	10	27,8	
	a/b	45	45,0	25	39,1	20	55,5	0,199
	b/b	16	16,0	10	15,6	6	16,7	
	a	123	61,5	83	64,8	40	55,6	
	b	77	38,5	45	35,2	32	44,4	0,253
HPA-5	**a/a**	76	76,0	54	84,4	22	61,1	
	a/b	24	24,0	10	15,6	14	38,9	***0,014***
	b/b	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	a	176	88,0	118	92,2	58	80,6	
	b	24	12,0	10	7,8	14	19,4	***0,028***

Prema dobivenim vrijednostima zabilježena je jedino statistički značajna razlika između djece s iCVI-om i s TIA-om u genotipskoj i alelnoj učestalosti za HPA-5. Djeca s TIA-om imala su veću učestalost genotipa HPA-5a/b (38,9% vs. 15,6%; P = 0,014) i polimorfnog alela HPA5b (19,4% vs. 7,8%; P = 0,028), u odnosu na djecu s iCVI-om (Tablica 24, Slika 14).



Slika 14. Učestalost genotipova polimorfizma HPA-5 u ispitivanim podskupinama djece (iCVI, TIA)

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA u skupini djece s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu djece pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 25, 26, 27).

Tablica 25. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL HPA		CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)		KONTROLE-DJECA (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
HPA-1	a/a	65	65,0	71	71,0		
	a/b	30	30,0	27	27,0	1,32 (0,73-2,39)[c]	0,449
	b/b	5	5,0	2	2,0		
	a	160	80,0	169	84,5		
	b	40	20,0	31	15,5	1,36 (0,81-2,28)	0,295
HPA-2	a/a	78	78,0	81	81,0		
	a/b	21	21,0	19	19,0	1,20 (0,60-2,39)[c]	0,726
	b/b	1	1,0	0	0,0		
	a	177	88,5	181	90,5		
	b	23	11,5	19	9,5	1,24 (0,65-2,35)	0,625
HPA-3	a/a	39	39,0	29	29,0		
	a/b	45	45,0	49	49,0	0,64 (0,35-1,15)[c]	0,179
	b/b	16	16,0	22	22,0	0,68 (0,33-1,38)[d]	0,368
	a	123	61,5	107	53,5		
	b	77	38,5	93	46,5	0,72 (0,48-1,07)	0,129
HPA-5	a/a	76	76,0	80	80,0		
	a/b	24	24,0	18	18,0	1,26 (0,65-2,47)[c]	0,609
	b/b	0	0,0	2	2,0		
	a	176	88,0	178	89,0		
	b	24	12,0	22	11,0	1,10 (0,60-2,04)	0,876

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

Tablica 26. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj podskupini djece s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL HPA		iCVI-DJECA (N = 64)		KONTROLE-DJECA (N = 64)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
HPA-1	a/a	44	68,8	47	73,5	1,26 (0,58-2,70)[c]	0,697
	a/b	15	23,4	15	23,4		
	b/b	5	7,8	2	3,1		
	a	103	80,5	109	85,2	1,39 (0,72-2,68)	0,408
	b	25	19,5	19	14,8		
HPA-2	a/a	53	82,8	53	82,8	1,00 (0,40-2,51)[c]	1,000
	a/b	11	17,2	11	17,2		
	b/b	0	0,0	0	0,0		
	a	117	91,4	117	91,4	1,00 (0,42-2,40)	1,000
	b	11	8,6	11	8,6		
HPA-3	a/a	29	45,3	19	29,7		
	a/b	25	39,1	32	50,0	0,51 (0,25-1,06)[c]	0,100
	b/b	10	15,6	13	20,3	0,73 (0,29-1,80)[d]	0,646
	a	83	64,8	70	54,7	0,65 (0,40-1,08)	0,126
	b	45	35,2	58	45,3		
HPA-5	a/a	54	84,4	50	78,1	0,66 (0,27-1,62)[c]	0,498
	a/b	10	15,6	12	18,8		
	b/b	0	0,0	2	3,1		
	a	118	92,2	112	87,5	0,59 (0,26-1,36)	0,301
	b	10	7,8	16	12,5		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

Djeca s iCVI-om imala su manju učestalost genotipa HPA-3 (a/b + b/b) u odnosu na kontrolnu skupinu, ali dobivena razlika nije bila statistički značajna (54,7% vs. 70,3%; P = 0,100) (Tablica 26).

Tablica 27. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj podskupini djece s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL HPA		TIA-DJECA (N = 36)		KONTROLE-DJECA (N = 36)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
HPA-1	a/a	21	58,3	24	66,7	1,43 (0,55-3,73)[c]	0,627
	a/b	15	41,7	12	33,3		
	b/b	0	0,0	0	0,0		
	a	57	79,2	60	83,3	1,32 (0,57-3,05)	0,670
	b	15	20,8	12	16,7		
HPA-2	a/a	25	69,4	28	77,8	1,54 (0,53-4,44)[c]	0,594
	a/b	10	27,8	8	22,2		
	b/b	1	2,8	0	0,0		
	a	60	83,3	64	88,9	1,60 (0,61-4,18)	0,471
	b	12	16,7	8	11,1		
HPA-3	a/a	10	27,8	10	27,8	1,00 (0,36-2,81)[c]	1,000
	a/b	20	55,5	17	47,2		
	b/b	6	16,7	9	25,0	0,60 (0,19-1,91)[d]	0,563
	a	40	55,6	37	51,4	0,85 (0,44-1,63)	0,738
	b	32	44,4	35	48,6		
HPA-5	a/a	22	61,1	30	83,3	3,18 (1,06-9,59)[c]	0,064
	a/b	14	38,9	6	16,7		
	b/b	0	0,0	0	0,0		
	a	58	80,6	66	91,7	2,66 (0,96-7,36)	0,090
	b	14	19,4	6	8,3		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

Djeca s TIA-om imala su veću učestalost polimorfnog genotipa HPA-5a/b u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti (38,9% vs. 16,7%; P = 0,064) (Tablica 27).

Ispitivanjem raspodjele učestalosti polimorfizama HPA (-1, -2, -3 i -5) u podskupinama prema spolu za CVP, iCVI i TIA u djece pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (podaci nisu prikazani).

5.6.2. Utjecaj polimorfizama HPA na CVP-e u odrasloj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama HPA-1, -2, -3 i -5 utvrđena je u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, kao i podskupinama odraslih (iCVI, TIA). Za svaki su polimorfizam HPA u ispitivanoj skupini i podskupinama odraslih prikazane učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 28.

Tablica 28. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL HPA		**CVP ODRASLI-UKUPNO (N = 200)**		**iCVI-ODRASLI (N = 126)**		**TIA-ODRASLI (N = 74)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
HPA-1	**a/a**	140	70,0	83	65,9	57	77,0	
	a/b	54	27,0	39	30,9	15	20,3	0,133
	b/b	6	3,0	4	3,2	2	2,7	
	a	334	83,5	195	77,4	129	87,2	
	b	66	16,5	47	18,6	19	12,8	0,123
HPA-2	**a/a**	162	81,0	101	80,2	61	82,4	
	a/b	37	18,5	24	19,0	13	17,6	0,834
	b/b	1	0,5	1	0,8	0	0,0	
	a	361	90,3	226	89,7	135	91,2	
	b	39	9,7	26	10,3	13	8,8	0,745
HPA-3	**a/a**	72	36,0	43	34,1	29	39,2	
	a/b	100	50,0	66	52,4	34	45,9	0,677
	b/b	28	14,0	17	13,5	11	14,9	
	a	244	61,0	152	60,3	92	62,2	
	b	156	39,0	100	39,7	56	37,8	0,509
HPA-5	**a/a**	150	75,0	94	74,6	56	75,7	
	a/b	46	23,0	30	23,8	16	21,6	1,000
	b/b	4	2,0	2	1,6	2	2,7	
	a	346	86,5	218	86,5	128	86,5	
	b	54	13,5	34	13,5	20	13,5	0,884

Raspodjela učestalosti ispitivanih polimorfizama HPA (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5) u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P =

0,776; P = 0,469; P = 0,472; P = 0,830). Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA između podskupina odraslih s iCVI-om i odraslih s TIA-om pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 28).

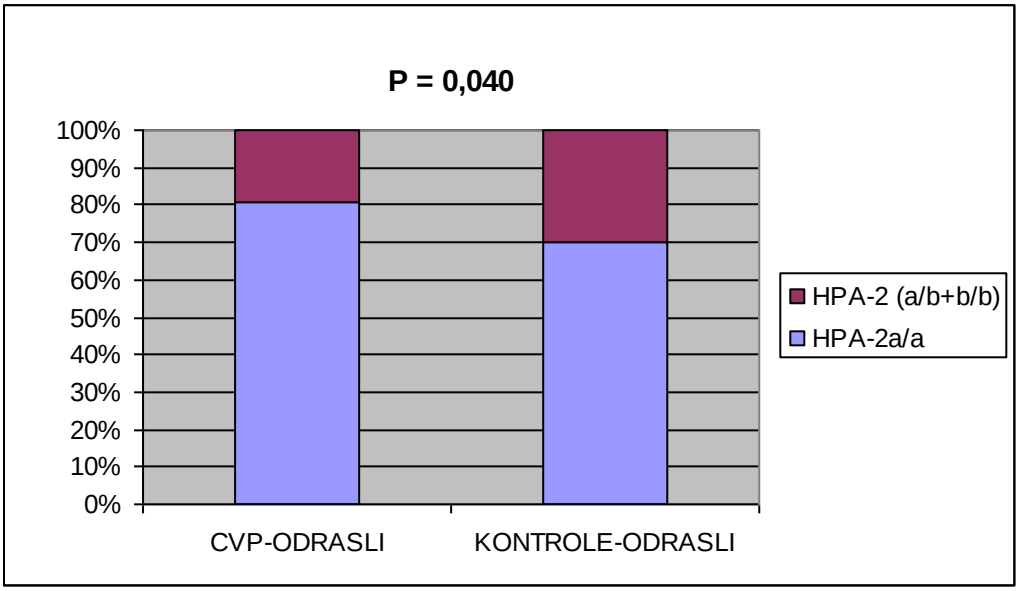
U skupini ispitanika s CVP-om, kao i podskupinama (iCVI, TIA) ispitana je razlika u genotipskoj i alelnoj učestalosti odgovarajućih HPA u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih (Tablice 29, 30 i 31).

Tablica 29. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL HPA		**CVP ODRASLI- UKUPNO (N = 200)**		**KONTROLE- ODRASLI (N = 100)**		**OR[a] (95%CI)[b]**	**P**
		N	**%**	**N**	**%**		
HPA-1	**a/a**	140	70,0	77	77,0	1,43 (0,82-2,50)[c]	0,220
	a/b	54	27,0	21	21,0		
	b/b	6	3,0	2	2,0		
	a	334	83,5	175	87,5	1,38 (0,84-2,27)	0,228
	b	66	16,5	25	12,5		
HPA-2	**a/a**	162	81,0	70	70,0	***0,55 (0,31-0,95)[c]***	***0,040***
	a/b	37	18,5	29	29,0		
	b/b	1	0,5	1	1,0		
	a	361	90,3	169	84,5	***0,59 (0,36-0,98)***	***0,043***
	b	39	9,7	31	15,5		
HPA-3	**a/a**	72	36,0	30	30,0	0,76 (0,45-1,28)[c]	0,366
	a/b	100	50,0	59	59,0		
	b/b	28	14,0	11	11,0	1,32 (0,63-2,77)[d]	0,585
	a	244	61,0	119	59,5	0,94 (0,66-1,33)	1,000
	b	156	39,0	81	40,5		
HPA-5	**a/a**	150	75,0	79	79,0	1,25 (0,70-2,24)[c]	0,474
	a/b	46	23,0	21	21,0		
	b/b	4	2,0	0	0,0		
	a	346	86,5	179	89,5	1,33 (0,78-2,27)	0,359
	b	54	13,5	21	10,5		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

Prema dobivenim vrijednostima zabilježena je jedino statistički značajna razlika između odraslih s CVP-om i kontrolne skupine odraslih u genotipskoj i alelnoj učestalosti za HPA-2. Odrasli s CVP-om imali su manju učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) (19,0% vs. 30,0%; OR = 0,55 (0,31-0,95); P = 0,040) (Slika 15) i alela HPA-2b (9,7% vs. 15,5%; OR = 0,59 (0,36-0,98); P = 0,043) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 29). Veća učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) (18,0% vs. 36,2%; OR = 0,39 (0,18-0,87); P = 0,034) i alela HPA-2b (9,1% vs. 18,1%; OR = 0,45 (0,22-0,94); P = 0,049) prisutna je samo za kontrolnu skupinu muških u odnosu na odrasle muške s CVP-om, dok u ženskoj populaciji ta razlika nije zabilježena (podaci nisu prikazani).



Slika 15. Učestalost genotipova polimorfizma HPA-2 u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om i kontrolnoj skupini

Tablica 30. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj podskupini odraslih s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL HPA		iCVI-ODRASLI (N = 126)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
HPA-1	a/a	83	65,9	77	77,0		
	a/b	39	30,9	21	21,0	1,73 (0,96-3,14)[c]	0,078
	b/b	4	3,2	2	2,0		
	a	195	77,4	175	87,5		
	b	47	18,6	25	12,5	1,68 (1,00-2,86)	0,053
HPA-2	a/a	101	80,2	70	70,0		
	a/b	24	19,0	29	29,0	0,58 (0,31-1,07)[c]	0,087
	b/b	1	0,8	1	1,0		
	a	226	89,7	169	84,5		
	b	26	10,3	31	15,5	0,63 (0,36-1,10)	0,117
HPA-3	a/a	43	34,1	30	30,0		
	a/b	66	52,4	59	59,0	0,83 (0,47-1,45)[c]	0,568
	b/b	17	13,5	11	11,0	1,26 (0,56-2,83)[d]	0,686
	a	152	60,3	119	59,5		
	b	100	39,7	81	40,5	0,97 (0,66-1,41)	1,000
HPA-5	a/a	94	74,6	79	79,0		
	a/b	30	23,8	21	21,0	1,28 (0,68-2,40)[c]	0,528
	b/b	2	1,6	0	0,0		
	a	218	86,5	179	89,5		
	b	34	13,5	21	10,5	1,32 (0,75-2,37)	0,386

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

U odraslih s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih nije bila prisutna značajna razlika niti u genotipskoj niti u alelnoj učestalosti svih ispitivanih HPA (Tablica 30). Zamjetna je bila veća učestalost alela HPA-1b u odraslih s iCVI-om od 18,6%, za razliku od kontrolne skupine, gdje je iznosila 12,5%, ali ta razlika nije bila statistički značajna (OR = 1,68 (1,00-2,86); P = 0,053).

Tablica 31. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela HPA u ispitivanoj podskupini odraslih s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL HPA		TIA-ODRASLI (N = 74)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
HPA-1	a/a	57	77,0	77	77,0		
	a/b	15	20,3	21	21,0	1,00 (0,49-2,04)[c]	1,000
	b/b	2	2,7	2	2,0		
	a	129	87,2	175	87,5		
	b	19	12,8	25	12,5	1,03 (0,54-1,95)	1,000
HPA-2	a/a	61	82,4	70	70,0		
	a/b	13	17,6	29	29,0	0,50 (0,24-1,04)[c]	0,076
	b/b	0	0,0	1	1,0		
	a	135	91,2	169	84,5		
	b	13	8,8	31	15,5	0,53 (0,26-1,04)	0,073
HPA-3	a/a	29	39,2	30	30,0		
	a/b	34	45,9	59	59,0	0,67 (0,35-1,25)[c]	0,257
	b/b	11	14,9	11	11,0	1,41 (0,58-3,46)[d]	0,494
	a	92	62,2	119	59,5		
	b	56	37,8	81	40,5	0,89 (0,58-1,38)	0,658
HPA-5	a/a	56	75,7	79	79,0		
	a/b	16	21,6	21	21,0	1,21 (0,59-2,48)[c]	0,713
	b/b	2	2,7	0	0,0		
	a	128	86,5	179	89,5		
	b	20	13,5	21	10,5	1,33 (0,69-2,56)	0,405

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b i b/b vs. a/a; [d] b/b vs. a/a i a/b

U odraslih s TIA-om u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih nije bila prisutna značajna razlika niti u genotipskoj niti u alelnoj učestalosti svih ispitivanih HPA (Tablica 31).

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA (-1, -2, -3 i -5) u podskupinama prema spolu za CVP i iCVI u odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela za HPA-2, -3 i -5, ali je pronađena razlika u učestalosti genotipova i alela za HPA-1 u odraslih s CVP-om, kao i razlika u učestalosti genotipova za HPA-1 u odraslih s iCVI-om. Muški s CVP-om imali su veću učestalost genotipa HPA-1 (a/b + b/b) (38,7% vs. 22,4%; P = 0,019) i alela HPA1b (21,0% vs. 12,6%; P = 0,035), u odnosu na žene s CVP-om. U odraslih s iCVI-om genotip HPA-1 (a/b + b/b) bio je

učestaliji u muškaraca nego u žena (43,5% vs. 25,0%; P = 0,044). Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA (-1, -2, -3 i -5) u podskupinama prema spolu za TIA-u u odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (podaci nisu prikazani).

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama HPA (-1, 2, -3 i -5) u skupinama i podskupinama djece (CVP, iCVI, TIA) u odnosu na skupine i podskupine odraslih (CVP, iCVI, TIA) pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela za sve polimorfizme HPA (podaci nisu prikazani).

5.7. Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e

5.7.1. Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e u dječjoj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama PSEL-S290N, N562D, V599L, T715P utvrđena je u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, kao i podskupinama djece (iCVI, TIA). Za svaki su polimorfizam PSEL-a u ispitivanoj skupini i podskupinama djece prikazane učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 32.

Tablica 32. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj skupini djece s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL PSEL		**CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)**		**iCVI-DJECA (N = 64)**		**TIA-DJECA (N = 36)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
S290N	**SS**	61	61,0	42	65,6	19	52,8	0,293
	SN	33	33,0	18	28,1	15	41,7	
	NN	6	6,0	4	6,3	2	5,5	
	S	155	77,5	102	79,7	53	73,6	
	N	45	22,5	26	20,3	19	26,4	0,417
N562D	**NN**	27	27,0	20	31,2	7	19,5	
	ND	45	45,0	24	37,5	21	58,3	0,130
	DD	28	28,0	20	31,3	8	22,2	
	N	99	49,5	64	50,0	35	48,6	
	D	101	50,5	64	50,0	37	51,4	0,967
V599L	**VV**	81	81,0	53	82,8	28	77,8	
	VL	19	19,0	11	17,2	8	22,2	0,726
	LL	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	V	181	90,5	117	91,4	64	88,9	
	L	19	9,5	11	8,6	8	11,1	0,740
T715P	**TT**	87	87,0	55	85,9	32	88,9	
	TP	12	12,0	9	14,1	3	8,3	0,911
	PP	1	1,0	0	0,0	1	2,8	
	T	186	93,0	119	93,0	67	93,1	
	P	14	7,0	9	7,0	5	6,9	0,791

Raspodjela učestalosti ispitivanih polimorfizama PSEL-a (S290N, N562D, V599L, T715P) u ispitivanoj skupini djece s CVP-om nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,591; P = 0,318; P = 0,293; P = 0,433). Ispitivanjem raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a između podskupina djece s iCVI-om i s TIA-om pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 32).

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a u skupini djece s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu djece pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 33, 34, 35).

Tablica 33. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL PSEL		**CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)**		**KONTROLE-DJECA (N = 100)**		**OR[a] (95%CI)[b]**	**P**
		N	**%**	**N**	**%**		
S290N	**SS**	61	61,0	63	63,0		
	SN	33	33,0	31	31,0	1,09 (0,61-1,93)[c]	0,884
	NN	6	6,0	6	6,0	1,00 (0,31-3,21) [g]	1,000
	S	155	77,5	157	78,5		
	N	45	22,5	43	21,5	1,06 (0,66-1,70)	0,904
N562D	**NN**	27	27,0	27	27,0		
	ND	45	45,0	56	56,0	1,00 (0,54-1,87)[d]	1,000
	DD	28	28,0	17	17,0	1,67 (0,84-3,31) [h]	0,090
	N	99	49,5	110	55,0		
	D	101	50,5	90	45,0	1,67 (0,84-3,31)	0,317
V599L	**VV**	81	81,0	84	84,0		
	VL	19	19,0	16	16,0	1,23 (0,59-2,56)[e]	0,710
	LL	0	0,0	0	0,0		
	V	181	90,5	184	92,0		
	L	19	9,5	16	8,0	1,21 (0,60-2,42)	0,724
T715P	**TT**	87	87,0	86	86,0		
	TP	12	12,0	13	13,0	0,92 (0,41-2,07)[f]	1,000
	PP	1	1,0	1	1,0		
	T	186	93,0	185	92,5		
	P	14	7,0	15	7,5	0,93 (0,44-1,98)	1,000

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [g] NN vs. SN i SS, [h] DD vs. ND i NN

U djece s CVP-om zabilježena je veća učestalost genotipa 562DD u odnosu na kontrolnu skupinu ali dobivena razlika nije bila statistički značajna (28,0% vs. 17,0%, P = 0,090) (Tablica 33). Kada smo razdvojili skupinu prema vrsti CVP-a, veća učestalost genotipa 562DD očitovala se samo u djece s iCVI-om (31,3% vs. 17,2%, P = 0,098), ali također nije dobivena statistička značajnost (Tablica 34).

Tablica 34. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj podskupini djece s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL PSEL		iCVI-DJECA (N = 64)		KONTROLE-DJECA (N = 64)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
S290N	SS	42	65,6	44	68,8	1,15 (0,55-2,41)[c]	0,851
	SN	18	28,1	17	26,6		
	NN	4	6,3	3	4,6		
	S	102	79,7	105	82,0	1,16 (0,62-2,17)	0,751
	N	26	20,3	23	18,0		
N562D	NN	20	31,2	17	26,5		
	ND	24	37,5	36	56,3	0,80 (0,37-1,71)[d]	0,697
	DD	20	31,3	11	17,2	1,78 (0,76-4,14)[h]	0,098
	N	64	50,0	70	54,7		
	D	64	50,0	58	45,3	1,20 (0,74-1,97)	0,532
V599L	VV	53	82,8	54	84,4		
	VL	11	17,2	10	15,6	1,12 (0,44-2,86)[e]	1,000
	LL	0	0,0	0	0,0		
	V	117	91,4	118	92,2		
	L	11	8,6	10	7,8	1,10 (0,45-2,71)	1,000
T715P	TT	55	85,9	55	85,9		
	TP	9	14,1	8	12,5	1,00 (0,37-2,71)[f]	1,000
	PP	0	0,0	1	1,6		
	T	119	93,0	118	92,2		
	P	9	7,0	10	7,8	0,89 (0,35-2,28)	1,000

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [h] DD vs. ND i NN

Tablica 35. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj podskupini djece s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL PSEL		TIA-DJECA (N = 36)		KONTROLE-DJECA (N = 36)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
S290N	SS	19	52,8	19	52,8		
	SN	15	41,7	14	38,9	1,00 (0,40-2,52)[c]	1,000
	NN	2	5,5	3	8,3		
	S	53	73,6	52	72,2		
	N	19	26,4	20	27,8	0,93 (0,45-1.94)	1,000
N562D	NN	7	19,5	10	27,8		
	ND	21	58,3	20	55,5	1,59 (0,53-4,79)[d]	0,580
	DD	8	22,2	6	16,7	1,43 (0,44-4,64) [h]	0,767
	N	35	48,6	40	55,6		
	D	37	51,4	32	44,4	1,32 (0,69-2,55)	0,505
V599L	VV	28	77,8	30	83,3		
	VL	8	22,2	6	16,7	1,43 (0,44-4,64)[e]	0,767
	LL	0	0,0	0	0,0		
	V	64	88,9	66	91,7		
	L	8	11,1	6	8,3	1,38 (0,45-4,18)	0,780
T715P	TT	32	88,9	31	86,1		
	TP	3	8,3	5	13,9	0,78 (0,19-3.16)[f]	1,000
	PP	1	2,8	0	0,0		
	T	67	93,1	67	93,1		
	P	5	6,9	5	6,9	1,00 (0,28-3,61)	1,000

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [h] DD vs. ND i NN

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a (S290N, N562D, V599L, T715P) u podskupinama prema spolu za CVP, iCVI i TIA u djece pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (podaci nisu prikazani).

5.7.2. Utjecaj polimorfizama PSEL-a na CVP-e u odrasloj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama PSEL-S290N, N562D, V599L, T715P utvrđena je u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, kao i podskupinama odraslih (iCVI, TIA). Za svaki su polimorfizam PSEL-a u ispitivanoj skupini i podskupinama odraslih prikazane učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 36.

Tablica 36. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL PSEL		**CVP ODRASLI- UKUPNO (N = 200)**		**iCVI-ODRASLI (N = 126)**		**TIA-ODRASLI (N = 74)**		**P**
		N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
S290N	**SS**	128	64,0	79	62,7	49	66,2	
	SN	58	29,0	39	31,0	19	25,7	0,689
	NN	14	7,0	8	6,3	6	8,1	
	S	314	83,5	197	78,2	117	79,1	
	N	86	16,5	55	21,8	31	20,9	0,936
N562D	**NN**	63	31,5	37	29,4	26	35,1	
	ND	84	42,0	53	42,1	31	41,9	0,593
	DD	53	26,5	36	28,5	17	23,0	
	N	210	52,5	127	50,4	83	56,1	
	D	190	47,5	125	49,6	65	43,9	0,320
V599L	**VV**	155	77,5	97	77,0	58	78,4	
	VL	42	21,0	27	21,4	15	20,3	0,958
	LL	3	1,5	2	1,6	1	1,3	
	V	352	88,0	221	87,7	131	88,5	
	L	48	12,0	31	12,3	17	11,5	0,934
T715P	**TT**	164	82,0	99	78,6	65	87,8	
	TP	36	18,0	27	21,4	9	12,2	0,145
	PP	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	T	364	91,0	225	89,3	139	93,9	
	P	36	9,0	27	10,7	9	6,1	0,167

Raspodjela učestalosti ispitivanih polimorfizama PSEL-a u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om pokazala je odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže za polimorfizme PSEL-a (S290N; P = 0,046 i N562D; P = 0,025) za razliku od PSEL-a (V599L; P = 0,936 i T715P; P

= 0,162) koji su bili u ravnoteži. Ispitivanjem raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a između podskupina odraslih s iCVI-om i s TIA-om pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 36).

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a u skupini odraslih s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 37, 38, 39).

Tablica 37. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL PSEL		**CVP ODRASLI- UKUPNO (N = 200)**		**KONTROLE- ODRASLI (N = 100)**		**OR[a] (95%CI)[b]**	**P**
		N	**%**	**N**	**%**		
S290N	**SS**	128	64,0	59	59,0		
	SN	58	29,0	36	36,0	0,81 (0,49-1,32)[c]	0,449
	NN	14	7,0	5	5,0	1,43 (0,59-4,09) [g]	0,620
	S	314	83,5	154	77,0		
	N	86	16,5	46	23,0	0,92 (0,61-1,38)	0,677
N562D	**NN**	63	31,5	29	29,0		
	ND	84	42,0	41	41,0	0,89 (0,53-1,50)[d]	0,894
	DD	53	26,5	30	30,0	0,84 (0,49-1,43) [h]	0,584
	N	210	52,5	99	49,5		
	D	190	47,5	101	50,5	0,89 (0,63-1,25)	1,000
V599L	**VV**	155	77,5	76	76,0		
	VL	42	21,0	23	23,0	0,92 (0,52-1,62)[e]	0,773
	LL	3	1,5	1	1,0		
	V	352	88,0	175	87,5		
	L	48	12,0	25	12,5	0,95 (0,57-1,60)	0,895
T715P	**TT**	164	82,0	86	86,0		
	TP	36	18,0	13	13,0	1,35 (0,69-2,64)[f]	0,416
	PP	0	0,0	1	1,0		
	T	364	91,0	185	92,5		
	P	36	9,0	15	7,5	1,22 (0,65-2,29)	0,642

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [g] NN vs. SN i SS, [h] DD vs. ND i NN

Tablica 38. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj podskupini odraslih s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL PSEL		iCVI-ODRASLI (N = 126)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
S290N	SS	79	62,7	59	59,0		
	SN	39	31,0	36	36,0	0,86 (0,50-1,47)[c]	0,586
	NN	8	6,3	5	5,0	1,28 (0,41-4,07) [g]	0,778
	S	197	78,2	154	77,0		
	N	55	21,8	46	23,0	0,93 (0,60-1,46)	0,854
N562D	NN	37	29,4	29	29,0		
	ND	53	42,1	41	41,0	0,98 (0,55-1,75)[d]	1,000
	DD	36	28,5	30	30,0	0,93 (0,52-1,66) [h]	0,883
	N	127	50,4	99	49,5		
	D	125	49,6	101	50,5	0,96 (0,67-1,40)	0,925
V599L	VV	97	77,0	76	76,0		
	VL	27	21,4	23	23,0	0,95 (0,51-1,76)[e]	0,876
	LL	2	1,6	1	1,0		1,000
	V	221	87,7	175	87,5		
	L	31	12,3	25	12,5	0,98 (0,56-1,72)	0,936
T715P	TT	99	78,6	86	86,0		
	TP	27	21,4	13	13,0	1,68 (0,83-3,40)[f]	0,168
	PP	0	0,0	1	1,0		
	T	225	89,3	185	92,5		
	P	27	10,7	15	7,5	1,48 (0,76-2,86)	0,314

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [g] NN vs. SN i SS, [h] DD vs. ND i NN

Tablica 39. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela PSEL-a u ispitivanoj podskupini odraslih s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL PSEL		TIA-ODRASLI (N = 74)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
S290N	SS	49	66,2	59	59,0		
	SN	19	25,7	36	36,0	0,73 (0,39-1,37)[c]	0,348
	NN	6	8,1	5	5,0	1,68 (0,49-5,72) [g]	0,532
	S	117	79,1	154	77,0		
	N	31	20,9	46	23,0	0,89 (0,53-1,48)	0,696
N562D	NN	26	35,1	29	29,0		
	ND	31	41,9	41	41,0	0,75 (0,40-1,44)[d]	0,413
	DD	17	23,0	30	30,0	0,70 (0,35-1,39) [h]	0,388
	N	83	56,1	99	49,5		
	D	65	43,9	101	50,5	0,77 (0,50-1,18)	0,234
V599L	VV	58	78,4	76	76,0		
	VL	15	20,3	23	23,0	0,87 (0,43-1,79)[e]	0,856
	LL	1	1,3	1	1,0		
	V	131	88,5	175	87,5		
	L	17	11,5	25	12,5	0,91 (0,47-1,75)	0,868
T715P	TT	65	87,8	86	86,0		
	TP	9	12,2	13	13,0	0,85 (0,35-2,09)[f]	0,823
	PP	0	0,0	1	1,0		
	T	139	93,9	185	92,5		
	P	9	6,1	15	7,5	0,80 (0,34-1,88)	0,673

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] NN i SN vs. SS, [d] DD i ND vs. NN, [e] LL i VL vs. VV, [f] PP i TP vs. TT; [g] NN vs. SN i SS, [h] DD vs. ND i NN

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a (S290N, N562D, V599L, T715P) u podskupinama prema spolu za CVP, iCVI i TIA u odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti alela za sve ispitivane polimorfizme, osim razlike u učestalosti genotipa i alela T715P u ispitanika s CVP-om. Muškarci s CVP-om imali su veću učestalost genotipa TP (24,7% vs. 12,1%; P = 0,034) i alela P (12,4% vs. 6,1%; P = 0,044), u odnosu na žene s CVP-om (podaci nisu prikazani).

Ispitivanje raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a (S290N, N562D, V599L, T715P) u skupinama i podskupinama djece (CVP, iCVI, TIA) u odnosu skupine i podskupine odraslih (CVP, iCVI, TIA) pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela za sve polimorfizme gena za PSEL (podaci nisu prikazani).

5.8. Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e

5.8.1. Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e u dječjoj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama mutacija FV G1691A i FII G20210A utvrđena je u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, kao i podskupinama djece (iCVI, TIA). Za mutacije FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini i podskupinama djece prikazane su učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 40.

Tablica 40. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini djece s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL		CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)		iCVI-DJECA (N = 64)		TIA-DJECA (N = 36)		P
		N	%	N	%	N	%	
FV G1691A	GG GA AA	86 14 0	86,0 14,0 0,0	54 10 0	84,0 15,6 0,0	32 4 0	88,9 11,1 0,0	0,746
	G A	186 14	93,0 7,0	118 10	92,2 7,8	68 4	94,4 5,6	0,755
FII G20210A	GG GA AA	95 5 0	95,0 5,0 0,0	63 1 0	98,4 1,6 0,0	32 4 0	88,9 11,1 0,0	0,104
	G A	195 5	97,5 2,5	127 1	99,2 0,8	68 4	94,4 5,6	0,109

Raspodjela učestalosti ispitivanih mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini djece s CVP-om nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,452; P = 0,798).

Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A između podskupina djece s iCVI-om i s TIA-om pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 40).

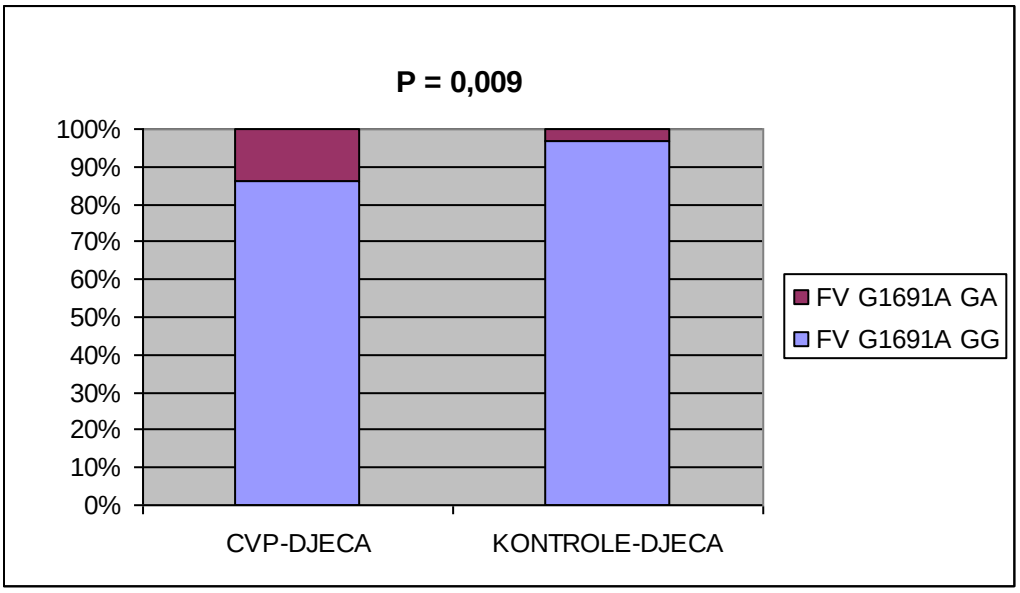
U skupini ispitanika djece s CVP-om, kao i podskupinama (iCVI, TIA) ispitana je razlika u genotipskoj i alelnoj učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u odnosu na kontrolnu skupinu djece (Tablice 41, 42 i 43).

Tablica 41. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini djece s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL		**CVP DJECA-UKUPNO (N = 100)**		**KONTROLE-DJECA (N = 100)**		**OR[a] (95%CI)[b]**	**P**
		N	**%**	**N**	**%**		
FV G1691A	**GG** **GA** **AA**	86 14 0	86,0 14,0 0,0	97 3 0	97,0 3,0 0,0	***5,26 (1,46-18,94)[c]***	***0,009***
	G **A**	186 14	93,0 7,0	197 3	98,5 1,5	***4,94 (1,40-17,48)***	***0,011***
FII G20210A	**GG** **GA** **AA**	95 5 0	95,0 5,0 0,0	96 4 0	96,0 4,0 0,0	1,26 (0,33-4,85)[c]	1,000
	G **A**	195 5	97,5 2,5	196 4	98,0 2,0	1,26 (0,33-4,75)	1,000

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Prema dobivenim vrijednostima zabilježena je jedino statistički značajna razlika između skupine djece s CVP-om i kontrolne skupine djece u genotipskoj i alelnoj učestalosti za FV G1691A. Djeca s CVP-om imali su veću učestalost genotipa GA FV G1691A (14,0% vs. 3,0%; OR = 5,26 (1,46-18,94); P = 0,009) (Slika 16) i alela A FV G1691A (7,0% vs. 1,5%; OR = 4,94 (1,40-17,48; P = 0,011) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 41).



Slika 16. Učestalost genotipova mutacije FV G1691A u ispitivanoj skupini djece s CVP-om i kontrolnoj skupini

Tablica 42. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj podskupini djece s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL		iCVI-DJECA (N = 64)		KONTROLE-DJECA (N = 64)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
FV G1691A	GG	54	84,0	61	95,3	3,77 (0,98-14,40)[c]	0,079
	GA	10	15,6	3	4,7		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	118	92,2	125	97,7	3,53 (0,95-13,15)	0,088
	A	10	7,8	3	2,3		
FII G20210A	GG	63	98,4	63	98,4	1,00 (0,06-16,34)[c]	1,000
	GA	1	1,6	1	1,6		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	127	99,2	127	99,2	1,00 (0,06-16,16)	1,000
	A	1	0,8	1	0,8		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Tablica 43. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u u ispitivanoj podskupini djece s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu djece

GENOTIP/ ALEL		TIA-DJECA (N = 36)		KONTROLE-DJECA (N = 36)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
FV G1691A	GG	32	88,9	36	100,0	4,50 (0,48-42,38)[c]	0,123
	GA	4	11,1	0	0,0		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	68	94,4	72	100,0	4,24 (0,46-38,85)	0,128
	A	4	5,6	0	0,0		
FII G20210A	GG	32	88,9	33	91,7	1,38 (0,28-6,64)[c]	1,000
	GA	4	11,1	3	8,3		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	68	94,4	69	95,8	1,35 (0,29-6,27)	1,000
	A	4	5,6	3	4,2		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Prema dobivenim rezultatima u podskupinama ispitanika (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu djece nema razlike niti u genotipskoj, niti u alelnoj učestalosti za FV G1691A i FII G20210A. Rezultati su prikazani u Tablicama 42 i 43.

Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u podskupinama prema spolu za CVP, iCVI i TIA u djece pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (podaci nisu prikazani).

5.8.2. Utjecaj mutacija FV G1691A i FII G20210A na CVP-e u odrasloj dobi

Raspodjela učestalosti polimorfizama mutacija FV G1691A i FII G20210A utvrđena je u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, kao i podskupinama odraslih (iCVI, TIA). Za FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini i podskupinama odraslih prikazane su učestalosti genotipova i alela. Dobivene vrijednosti nalaze se u Tablici 44.

Tablica 44. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om i podskupinama (iCVI, TIA)

GENOTIP/ ALEL		CVP ODRASLI- UKUPNO (N = 200)		iCVI-ODRASLI (N = 126)		TIA-ODRASLI (N = 74)		P
		N	%	N	%	N	%	
FV G1691A	GG GA AA	191 9 0	95,5 4,5 0,0	119 7 0	94,4 5,6 0,0	72 2 0	97,3 2,7 0,0	0,558
	G A	391 9	97,8 2,2	245 7	97,2 2,8	146 2	98,6 1,4	0,562
FII G20210A	GG GA AA	191 7 2	95,5 3,5 1,0	121 3 2	96,0 2,4 1,6	70 4 0	94,6 5,4 0,0	0,904
	G A	389 11	97,3 2,7	245 7	97,2 2,8	144 4	97,3 2,7	0,785

Raspodjela učestalosti ispitivanih mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže (P = 0,745; P = 0,745). Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210 A između podskupina odraslih s iCVI-om i s TIA-om pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 44).

Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u skupini odraslih s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (Tablica 45, 46, 47).

Tablica 45. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj skupini odraslih s CVP-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL		CVP ODRASLI-UKUPNO (N = 200)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
FV G1691A	GG	191	95,5	98	98,0	2,31 (0,49-10,89)[c]	0,347
	GA	9	4,5	2	2,0		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	391	97,8	198	99,0	2,28 (0,49-10,65)	0,352
	A	9	2,2	2	1,0		
FII G20210A	GG	191	95,5	95	95,0	0,90 (0,29-2,75)[c]	1,000
	GA	7	3,5	5	5,0		
	AA	2	1,0	0	0,0		
	G	389	97,3	195	97,5	1,10 (0,38-3,22)	1,000
	A	11	2,7	5	2,5		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Tablica 46. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj podskupini odraslih s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL		iCVI-ODRASLI (N = 126)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
FV G1691A	GG	119	94,4	98	98,0	2,88 (0,59-14,19)[c]	0,310
	GA	7	5,6	2	2,0		
	AA	0	0,0	0	0,0		
	G	245	97,2	198	99,0	2,83 (0,58-13,77)	0,315
	A	7	2,8	2	1,0		
FII G20210A	GG	121	96,0	95	95,0	0,79 (0,22-2,79)[c]	0,961
	GA	3	2,4	5	5,0		
	AA	2	1,6	0	0,0		
	G	245	97,2	195	97,5	1,11 (0,35-3,57)	0,911
	A	7	2,8	5	2,5		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Tablica 47. Učestalost nositelja pojedinih genotipova i alela mutacija FV G1691A i FII G20210A u ispitivanoj podskupini odraslih s TIA-om, u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

GENOTIP/ ALEL		TIA-ODRASLI (N = 74)		KONTROLE-ODRASLI (N = 100)		OR[a] (95%CI)[b]	P
		N	%	N	%		
FV G1691A	GG GA AA	72 2 0	97,3 2,7 0,0	98 2 0	98,0 2,0 0,0	1,36 (0,19-9,89)[c]	0,837
	G A	146 2	98,6 1,4	198 2	99,0 1,0	1,36 (0,19-9,74)	0,838
FII G20210A	GG GA AA	70 4 0	94,6 5,4 0,0	95 5 0	95,0 5,0 0,0	1,09 (0,28-4,19)[c]	0,821
	G A	144 4	97,3 2,7	195 5	97,5 2,5	1,08 (0,29-4,11)	0,823

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] GA i AA vs. GG

Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691Ai FII G20210A u podskupinama prema spolu za CVP, iCVI i TIA u odraslih pokazalo je da nije bilo statistički značajne razlike niti u raspodjeli genotipova, niti u raspodjeli alela (podaci nisu prikazani).

Ispitivanje raspodjele učestalosti mutacija FV G1691A i FII G20210A u skupinama i podskupinama djece (CVP, iCVI, TIA) u odnosu na skupinu i podskupinu odraslih (CVP, iCVI, TIA) pokazalo je statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela za FV G1691A između skupina, djece i odraslih s CVP-om (P = 0,007; P = 0,009), kao i značajnu razliku u raspodjeli genotipova i alela za FV G1691A između podskupina djece i odraslih s iCVI-om (P = 0,042; P = 0,048) (podaci nisu prikazani).

5.9. Učestalost haplotipova HPA i FV G1691A - PSEL u kontrolnim skupinama i skupinama s CVP-om

Da bismo ispitali može li eventualna povezanost pojedinog polimorfizma i bolesti biti prikrivena mutacijskim djelovanjem drugog polimorfizma, saželi smo 3 polimorfna gena za HPA (-1, -2, -3) smještenih na kromosomu 17 u haplotipove HPA. Budući da je gen za FV G1691A smješten na kromosomu 1 kao i geni za PSEL saželi smo ih u zajednički haplotip FV G1691A – PSEL (S290N, N562D, V599L, T715P).

Učestalost haplotipova koji su rezultat ispitivanih polimorfizama HPA, FV G1691A i gena za PSEL određeni su u kontrolnim skupinama djece i odraslih, kao i u skupinama djece i odraslih s CVP-om. U Tablici 48 prikazano je osam haplotipova HPA koji pokrivaju 100% svih haplotipova HPA, a u Tablici 49 jedanaest haplotipova FV G1691A i PSEL koji čine 95-99% svih haplotipova FV G1691A - PSEL.

Najučestaliji haplotip HPA je HPA-1a2a3a, a za FV G1691A - PSEL haplotip GSDVT u svim ispitivanim skupinama.

U kontrolnoj skupini djece haplotip HPA-1a2a3b bio je učestaliji, u odnosu na djecu s CVP-om. U kontrolnoj skupini odraslih haplotip HPA-1a2b3b bio je učestaliji, u odnosu na odrasle s CVP-om.

Tablica 48. Učestalost haplotipova polimorfizama HPA -1, -2, -3 u ispitivanim skupinama

HPA HAPLOTIP	KONTROLE-DJECA (N = 200)	CVP-DJECA (N = 200)	P*	KONTROLE-ODRASLI (N = 200)	CVP-ODRASLI (N = 400)	P*
	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
HPA-1a2a3a	82(40,9)	88(43,9)	0,613	88(44,1)	175(43,7)	0,995
HPA-1a2a3b	73(36,5)	49(24,6)	***0,013***	60(29,9)	131(32,8)	0,531
HPA-1b2b3a	5(2,4)	0(0)	0,081	2(1,0)	6(1,6)	0,825
HPA-1a2b3a	5(2,7)	12(6,2)	0,146	15(7,4)	21(5,3)	0,402
HPA-1b2a3a	15(7,5)	23(11,5)	0,233	14(7,0)	42(10,5)	0,215
HPA-1b2a3b	11(5,6)	17(8,6)	0,330	7(3,6)	14(3,4)	0,912
HPA-1b2b3b	0(0)	0(0)	----	2(0,9)	4(1,1)	0,842
HPA-1a2b3b	9(4,4)	11(5,4)	0,817	12(6,1)	7(1,8)	***0,010***

P*- usporedba učestalosti haplotipova između kontrolnih skupina i skupina bolesnika

U djece s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu djece haplotip ANDVT bio je učestaliji, a u kontrolnoj skupini odraslih javlja se haplotip GSDLT koji nije prisutan u odraslih s CVP-om.

Tablica 49. Učestalost haplotipova polimorfizama FV G1691A-PSEL u ispitivanim skupinama

FV G1691A - PSEL HAPLOTIP	**KONTROLE-DJECA (N = 200)**	**CVP-DJECA (N = 200)**	**P***	**KONTROLE-ODRASLI (N = 200)**	**CVP-ODRASLI (N = 400)**	**P***
	N (%)	**N (%)**		**N (%)**	**N (%)**	
GSDVT	71(35,4)	75(37,6)	0,724	69(34,7)	140(34,9)	0,966
GSNVT	58(29,1)	51(25,6)	0,501	50(24,9)	106(26,6)	0,727
GNNVT	24(12,1)	12(6,1)	0,056	16(8,0)	32(8,0)	0,873
GNDVT	15(7,4)	16(8,1)	0,940	24(12,2)	35(8,8)	0,243
GSNVP	14(6,9)	8(3,9)	0,269	13(6,7)	24(6,1)	0,915
GSNLT	9(4,7)	18(8,8)	0,151	14(7,1)	31(7,8)	0,887
GNNVP	0(0)	4(2,2)	0,103	0(0)	0(0)	------
GSDLT	2(1,2)	0(0)	0,365	6(3,1)	0(0)	***0,002***
GNNLT	2(1,2)	1(0,7)	1,000	3(1,4)	10(2,4)	0,612
ANDVT	1(0,4)	10(4,8)	***0,014***	1(0,5)	4(1,0)	0,874
ANNVT	0(0)	1(0,7)	0,735	0(0)	0(0)	-------

P*- usporedba učestalosti haplotipova između kontrolnih skupina i skupina bolesnika

5.10. Povezanost standardnih čimbenika rizika i ispitivanih polimorfizama u odraslih s CVP-om

U odraslih s CVP-om ispitali smo povezanosti standardnih čimbenika rizika i polimorfizama ispitivanih gena (HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A). Dobivene statistički značajne razlike prikazane su u Tablici 50.

Tablica 50. Učestalost nositelja pojedinih polimorfizama u podskupinama odraslih s CVP-om

PODSKUPINA CVP-a	**POLIMORFIZAM N (%)**			**P**
ALKOHOLIZAM	**GENOTIP PSEL T715P** TT	TP	PP	
ne (N = 165)	140 (84,8)	25 (15,2)	0 (0,0)	***0,042***[a]
da (N = 35)	24 (68,6)	11 (31,4)	0 (0,0)	
PUŠENJE	**GENOTIP HPA-1** a/a	a/b	b/b	
ne (N = 126)	97 (77,0)	26 (20,6)	3 (2,4)	***0,008***[b]
da (N = 74)	43 (58,1)	28 (37,8)	3 (4,1)	
SRČANE BOLESTI	**GENOTIP PSEL N562D** NN	ND	DD	
ne (N = 145)	50 (34,5)	65 (44,8)	30 (20,7)	***0,010***[c]
da (N = 55)	13 (23,6)	19 (34,6)	23 (41,8)	
PRETILOST	**GENOTIP PSEL N562D** NN	ND	DD	
ne (N = 129)	42 (32,6)	60 (46,5)	27 (20,9)	***0,046***[c]
da (N = 71)	21 (29,6)	24 (33,8)	26 (36,6)	

[a] TP vs.TT, [b] a/b + b/b vs. a/a, [c] DD vs. NN + ND

Prema dobivenim rezultatima heterozigotni genotip TP učestaliji je u odraslih s CVP-om koji uzimaju alkohol u većim količinama nego u odraslih, koji rijetko ili uopće ne konzumiraju alkohol (31,4 % vs. 15,2%; P = 0,042). U pušača s CVP-om veća je učestalost genotipa HPA-1 (a/b + b/b) u odnosu na nepušače (41,9% vs. 23,0%; P = 0,019). U odraslih s CVP-om koji

u podlozi imaju srčanu bolest homozigotni DD genotip N562D je učestaliji u odnosu na odrasle bez srčanih poteškoća (41,8% vs. 20,7%; P = 0,010). Također i u odraslih s CVP-om koji su pretili, homozigotni DD genotip N562D je učestaliji u odnosu na odrasle normalne tjelesne težine (36,6% vs. 20,9%; P = 0,046).

Budući da su dobivene razlike između kontrolne skupine odraslih u odnosu na odrasle s CVP-om u učestalosti obiteljske anamneze, hipertenzije, šećerne bolesti i alkoholizma, usporedili smo učestalosti ispitivanih polimorfizama između kontrolne skupine i bolesnika s čimbenicima rizika, kao i između kontrolne skupine i bolesnika bez čimbenika rizika. Prema dobivenim podacima jedino genotip HPA-1 (a/b + b/b) bio je učestaliji u hipertenzivnih bolesnika s CVP-om u odnosu na kontrolne ispitanike s hipertenzijom (31,6 vs. 8,3; OR = 5,08 (1,47-17,49); P < 0,001) (Tablica 51).

Tablica 51. Učestalost nositelja pojedinih polimorfizama u podskupinama odraslih hipertenzivnih ispitanika

PODSKUPINA	**POLIMORFIZAM N (%)**			**OR[a] (95%CI)[b]**	**P**
HIPERETENZIJA	**HPA-1** a/a	a/b	b/b		
CVP-ODRASLI (N = 133)	91 (68,4)	37 (27,8)	5 (3,8)	***5,08 (1,47-17,49)[c]***	***<0,001***
KONTROLE-ODRASLI (N = 36)	33 (91,7)	3 (8,3)	0 (0,0)		

[a] omjer vjerojatnosti; [b] raspon pouzdanosti; [c] a/b + b/b vs. a/a

U odraslih s CVP-om mlađih od 50 godina u odnosu na kontrolnu skupinu podudarnu prema dobi nije bilo razlike u učestalosti niti jednoga od ispitivanih polimorfizama (rezultati nisu prikazani).

U kontrolnih ispitanika s hiperkolesterolemijom, hipertrigliceridemijom i hipertenzijom povećana je učestalost homozigotnog DD genotip N562D, u odnosu na kontrolne ispitanike bez prisutnih čimbenika rizika.

5.11. Regresijski model za procjenu čimbenika rizika CVP-a

U našem smo istraživanju pokušali napraviti regresijski model kojim bismo mogli identificirali one ispitanike kod kojih postoji povećani izgled za CVP-om (iCVI, TIA) s obzirom na ispitivane standardne i genske čimbenike rizika. Načinili smo ga samo za odrasle budući da u djece prethodni rezultati daju povezanost samo FVL s CVP-om. Prema prethodnim analizama za odrasle više standardnih čimbenika rizika uz polimorfizam HPA-2 povezani su s CVP-om. Regresijsku analizu načinili smo u skupini odraslih s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Univarijantna regresijska analiza je identificirala slijedeće parametre kao statistički značajne u izradi regresijskog modela (Tablica 52):

- pozitivnu obiteljsku anamnezu uz OR (95% CI) = 5,36 (2,21-12,99);
- hipertenziju uz OR (95% CI) = 3,53 (2,13-5,84);
- šećernu bolest uz OR (95% CI) = 7,79 (2,72-22,27);
- alkoholizam uz OR (95% CI) = 10,04 (2,36-42,69);
- polimorfizam HPA-2: prisutnost polimorfnog alela imala je protektivni učinak na razvoj bolesti uz OR (95% CI) = 0,56 (0,33-0,96).

U model multivarijantne regresijske analize uvrstili smo samo one parametre koji su se pokazali značajnim u univarijantnoj analizi. U konačnom modelu ostali su statistički značajni:

- pozitivna obiteljska anamneza uz OR (95% CI) = 4,51 (1,74-11,71);
- hipertenzija uz OR (95% CI) = 3,53 (2,04-6,10);
- šećerna bolest uz OR (95% CI) = 5,35 (1,79-15,97);
- alkoholizam uz OR (95% CI) = 6,60 (1,45-30,09).

Ovim modelom nije dokazana protektivna uloga polimorfnog alela HPA-2 u CVP-u (P = 0,148) (Tablica 52). Dobiveni regresijski model ima koeficijent determinacije 0,767, što znači da se korištenjem ovog modela 76,7% od ukupnog broja ispitanika može ispravno klasificirati kao bolesnik s CVP-om ili kao kontrolni ispitanik.

Tablica 52. Logistička regresija za ispitivane čimbenike u skupini odraslih s CVP-om (TIA+iCVI) u odnosu na kontrolnu skupinu odraslih

PARAMETAR	Univarijantna regresijska analiza		Multivarijantna regresijska analiza	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Spol muški	0,98 (0,61-1,59)	0,935		
Godine	1,01 (0,99-1,03)	0,176		
Anamneza	***5,36 (2,21-12,99)***	***<0,001***	***4,51 (1,74-11,71)***	***0,002***
Hipertenzija	***3,53 (2,13-5,84)***	***<0,001***	***3,53 (2,04-6,10)***	***<0,001***
Šećerna bolest	***7,79 (2,72-22,27)***	***<0,001***	***5,35 (1,79-15,97)***	***0,003***
Hiperkolesterolemija	1,50 (0,92-2,44)	0,103		
Hipertrigliceridemija	1,29 (0,77-2,17)	0,339		
Srčane bolesti	1,73 (0,95-3,14)	0,072		
Pušenje	1,00 (0,61-1,64)	1,000		
Alkoholizam	***10,04 (2,36-42,69)***	***0,002***	***6,60 (1,45-30,09)***	***0,015***
Pretilost	1,41 (0,84-2,39)	0,194		
HPA-2	***0,56 (0,33-0,96)***	***0,034***	0,65 (0,36-1,17)	0,148

6. RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja u dječjoj i odrasloj dobi polimorfizama gena za HPA (-1, -2, -3 i -5), gena za PSEL (S290N, N562D, V599L i T715P), FV G1691A i FII G20210A u skupinama s CVP-om i kontrolnim skupinama, s ciljem da se ispitaju njihove učestalosti i eventualna povezanost s nastankom bolesti. Za sve odrasle ispitanike uz spomenute polimorfizme obrađeni su podaci o standardnim čimbenicima rizika uključujući pozitivnu obiteljsku anamnezu, hipertenziju, šećernu bolest, hiperkolesterolemiju, hipertrigliceridemiju, srčane bolesti, pušenje, alkoholizam i pretilost.

Prema dosadašnjim literaturnim podacima sustav trombocitnih GP-a (61), kao i PSEL trombocita i endotelnih stanica (89,90,147), te faktori koagulacije (52,118) mogu doprinijeti različitima fazama evolucije aterotrombotične bolesti.

S obzirom na razlike u hemostatskom sustavu djece i odraslih, učestalosti tromboze, te činjenicu da je doprinos genskih čimbenika izraženiji u mlađih bez stečenih čimbenika rizika, u našem istraživanju skupine djece i odraslih obrađene su odvojeno. Za potrebe istraživanja polimorfizama u skupinama s CVP-om (iCVI, TIA), ukupno je ispitano stotinu djece, prosječne dobi od 9 godina i dvjesto odraslih, prosječne dobi od 64 godine. Djeca s iCVI-om značajno su mlađa od djece s TIA-om. Povećana zastupljenost iCVI-a u djece muškog spola u skladu je s literaturnim podacima (9,13). U literaturi ne postoje podaci o zastupljenosti spola u djece s TIA-om a prema dobivenim podacima ženski spol je učestaliji. Za pretpostaviti je da su djevojčice za vrijeme i poslije puberteta sklonije TIA-i nego dječaci, možda uslijed hormonalnih razlika. Između odraslih s iCVI-om i s TIA-om nije dobivena značajna razlika u dobi. Zastupljenost muškog i ženskog spola u odraslih s iCVI-om bila je podjednaka, za razliku od TIA-e u kojoj je učestaliji ženski spol, ali bez statističke značajnosti. Prema literaturnim podacima muški spol je učestaliji u bolesnika s iCVI-om i TIA-om (21), što u sadašnjem ispitivanju nije potvrđeno jer se radi o relativno malom broju bolesnika na ukupni broj oboljelih u Hrvatskoj.

Neosporna je važnost poznavanja čimbenika rizika koji utječu na cerebrovaskularne poremećaje i njihovu kliničku manifestaciju, ne samo s aspekta prevencije već kao i doprinos

boljem razumijevanju same patogeneze bolesti. Rezultati ovog istraživanja koji se odnose na poznate standardne čimbenike rizika, upućuju na povezanost pozitivne obiteljske anamneze, hipertenzije, šećerne bolesti i alkoholizma s CVP-om u odraslih, a u skladu su s rezultatima nekih studija (29,30,33,78,85).

Prema podacima ovog istraživanja za sve ispitivane polimorfizme nije postojalo statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u ukupnoj kontrolnoj skupini, kao i u skupinama djece i odraslih s CVP-om, osim za PSEL S290N i N562D u odraslih s CVP-om. Polimorfizmi koji su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ukazuju na homogenost ispitivanih skupina što se tiče regionalne pripadanosti. Polimorfizmi koji nisu unutar Hardy-Weinbergove ravnoteže možda mogu ukazivati na različitu raspodjelu ispitivanih polimorfizama upravo kod odraslih s CVP-om ili ovo odstupanje od ravnoteže može biti jedan od pokazatelja eventualne greške genotipiziranja. Ovu posljednju stavku možemo isključiti budući da je genotipizacija za svakog bolesnika provjerena.

Podaci o alelnoj učestalosti HPA u različitim populacijama, ukazuju na različitost geografske i etničke raspodjele nekih od antigena. O učestalosti HPA u hrvatskoj populaciji dosada su objavljena samo dva istraživanja, rad o učestalosti HPA-15 (148) i rad u kojem je prikazan dio rezultata ovog istraživanja (149). U objavljenom radu istražene su učestalosti polimorfizama HPA-1, -2, -3 i -5 u kontrolnoj skupini od 219 ispitanika. Dobivene alelne učestalosti HPA u hrvatskoj populaciji slične su rezultatima drugih populacijskih studija u Europi. Postoje razlike u odnosu na određenu europsku populaciju za HPA-2, -3 i -5. Statistički značajne razlike odnosile su se na povećanu učestalost polimorfnog alela b u našoj populaciji. HPA-2b bio je učestaliji u odnosu na Nijemce (77) i Nizozemce (143), HPA-3b u odnosu na Švicarce (145), a HPA-5b u odnosu na Fince (141). U ovome radu dobivena je nešto veća učestalost alela HPA-2b, što je dovelo do statistički veće učestalosti alela HPA-2b i u odnosu na Austrijance (138). Relativno veća učestalost alela HPA-2b, HPA-3b i HPA-5b u našoj populaciji može predodrediti veći rizik aloimunizacije. Prema učestalostima alela HPA u različitim europskim populacijama zamjetna je najveća varijacija za HPA-3. Donedavno kliničko značenje polimorfizama trombocitnih GP-a pripisivalo se isključivo njihovoj sposobnosti da potaknu imunološki odgovor stvaranjem protutijela i dobiveni podaci omogućavaju ispravnu dijagnozu i liječenje imuno-posredovanih trombocitnih poremećaja. Dobiveni rezultati pružaju ujedno temeljnu informaciju za daljnja klinička istraživanja koja

osim trombocitnih poremećaja uključuju i ispitivanja povezanosti polimorfizama HPA i drugih bolesti.

Dosada su objavljena mnoga istraživanja o utjecaju polimorfizama HPA na trombotička zbivanja, ali su najčešće obuhvaćala samo pojedinačne polimorfizme HPA u populaciji odraslih, dok su u djece takva istraživanja vrlo rijetka. U ovom radu istražene su učestalosti četiriju glavnih polimorfizma HPA (-1, -2, -3 i -5) i njihova povezanost s CVP-om ne samo u odraslih, nego i u djece.

Weiss i sur. radom objavljenim 1996. godine (71) pokrenuli su niz istraživanja na području polimorfizama HPA, sugerirajući da je učestalost nositelja jedne kopije alela HPA-1b dva puta veća u bolesnika s infarktom miokarda ili nestabilnom anginom. Ova povezanost bila je još jače izraženija u ispitanika mlađih od 60 godina. Rezultati drugih ispitivanja (150), pa tako i jedne velike multicentrične studije u odraslih nisu potvrdila povezanost HPA-1b s infarktom miokarda (151).

Prema literaturnim podacima dosadašnja istraživanja polimorfizama HPA u skupinama s CVP-om, također ukazuju na značajne proturječnosti, kao i rezultati ovoga istraživanja u djece i odraslih.

Povezivanje trombocita preko receptora GPIIb/IIIa vrlo je bitno za nastajanje tromba, a i inhibitori receptora GPIIb/IIIa sve više se primjenjuju u liječenju aterotrombotičnih bolesti. Na GPIIb/IIIa smješten je HPA-1 polimorfizam. Prema rezultatima ovog istraživanju u odraslih s iCVI-om dobivena je veća učestalost alel HPA-1b u odnosu na kontrolnu skupinu, ali razlika nije dosegla statističku značajnost (OR = 1,68 (1,00-2,86); P = 0,053). Razdvajanjem odraslih s iCVI-om prema spolu, veća učestalost genotipa HPA-1 (a/b + b/b) dobivena je samo u bolesnika muškog spola, od kuda potječe dobivena razlika u cijeloj podskupini. Budući da je iCVI učestaliji u muške populacije, trebali bi u slijedeće istraživanje uključiti veći broj muških bolesnika, što bi pridonijelo definiranju statističke značajnosti te razlike.

Naime u radu Slowika i sur. (152) alel HPA-1b neovisni je čimbenik rizika, ali samo u muških s iCVI-om u kojem su zahvaćene velike krvne žile (OR = 2,5 (1,2-5,2)). Također u radu Szolnoki i sur. (153) u bolesnika s iCVI-om kod kojih su bile zahvaćene velike krvne žile, u odnosu na kontrolne ispitanike alel HPA-1b bio je 2 puta učestaliji. Multivarijantna logistička regresijska analiza potvrdila je ovu povezanost uz OR = 2,9 (1,6-4,9). U istraživanju Streiflera i sur. (72) u skupini bolesnika (TIA, iCVI, retinalna ishemijska zbivanja) genotip HPA-1a/b bio je 2 puta češći u odnosu na skupinu asimptomatskih ispitanika uz OR = 2,5 (1,2-5,1). Povezanost HPA-1 s iCVI-om u odraslih dobivena je i u radovima Saida i sur. (74,154). U njihovom prvom objavljenom radu (154) dobivena je veća učestalost alela HPA-1b u skupini s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu kao i povezanost genotipa HPA-1b/b s iCVI-om, s rasprostranjenošću neuroloških simptoma, kao i s ponovljenim iCVI-om. U drugom radu (74) provedenom na većem broju ispitanika potvrđeni su rezultati prethodnog rada o značajnijoj učestalosti HPA-1b u skupini s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedino u njihovu radu prisutna je obrada haplotipova HPA. Haplotip HPA-1a/2a/3a/4a je negativno povezan s iCVI-om, za razliku od haplotipa HPA-1b/2a/3b/4a koji ima pozitivan učinak na iCVI. Budući da se radi o neeuropskoj populaciji, prisutna je razlika u učestalostima haplotipova između kontrolnih skupina dobivenih u ovome radu i njihovih kontrolnih skupina. Prema dobivenim podacima ovoga istraživanja, protektivni haplotipovi u djece i odraslih s CVP-om su različiti (djeca: HPA-1a2a3b; odrasli: HPA-1a2b3b) i niti jedan od haplotipova nema pozitivan učinak na CVP-e.

Prema rezultatima ovog istraživanja dobivena je značajno veća učestalost genotipa HPA-1 (a/b + b/b) u hipertenzivnih bolesnika s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertenzijom uz (31,6 vs. 8,3; $P < 0,001$), kao i u pušača s CVP-om u odnosu na nepušače s CVP-om (41,9% vs. 23,0%; $P = 0,019$). Dobiveni rezultati u skladu su s radovima koji ukazuju na značajan utjecaj kombinacije protrombotičkih i standardnih čimbenika rizika u razvoju aterotrombotične bolesti. Tako u radu Lanni i sur. (155) u kojem je obrađena visoko rizična hipertenzivna populacija, alel HPA-1b bio je značajno učestaliji u bolesnika s iCVI-om u odnosu na kontrolne ispitanike (46.4% vs. 22.6%; $P = 0,01$). I u istraživanju Wagner i sur. (78) dobivena je povezanost HPA-1b polimorfizma s rizikom za iCVI samo u podskupini bjelkinja s poznatim uzrokom iCVI-a (OR = 12,8 (1,2-135,0)).

No suprotno prethodnim rezultatima, prema Carteru i sur. (73) utjecaj genotipova je jače izražen u bolesnika bez standardnih čimbenika rizika. Tako je u ispitanika nepušača s aterotrombotičnim CVI-om učestaliji genotip HPA-1a/b u odnosu na nepušače kontrolne skupine. Također dobivena je značajno veća učestalost genotipa HPA-1 (a/b + b/b) u bolesnika s aterotrombotičnim CVI-om do 50 godine u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Suprotno njihovim rezultatima u naših bolesnika mlađih od 50 godina s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu nisu dobivene razlike u učestalostima HPA-1.

Međutim, brojna istraživanja nisu potvrdila povezanost polimorfizma HPA-1 u odraslih s CVP-om (75,76,77,156,157,158,159), kao niti rezultati dviju meta-analiza. Prema meta-analizi Wiwanitkit i sur. (160) koja je objedinila rezultate polimorfizma HPA-1 u do tada objavljena četiri istraživanja, ispitanici s alelom HPA-1b imali su 1,18 puta veći rizik za razvitak cerebrovaskularne bolesti, što prema autorima ove meta-analize ne predstavlja korisan čimbenik za procjenu rizika bolesti. Rezultati meta-analize Wu i sur. (117) također ne nalaze povezanost polimorfizma HPA-1 s iCVI-om u 1855 bolesnika.

U skupini djece s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu djece nisu dobivene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela HPA-1, što je u skladu s radom Komitopoulou i sur. (79) u kojem su ispitana djeca s iCVI-om. Učestalost alela HPA-1b u njihovoj populaciji bolesnih i kontrolnih ispitanika relativno je viša u odnosu na europsku populaciju, a isto tako i hrvatsku. Među rijetkima u dječjoj populaciji je i rad (80), u kojem je obuhvaćen dio podataka ovog istraživanja, prema kojemu polimorfizam HPA-1 nije povezan s CVP-om u djece.

Rezultati ovog istraživanja i prethodno spomenuti radovi u suprotnosti su s rezultatima grupe indijskih istraživača (161). Naime u skupini azijsko-indijske djece s iCVI-om i istom broju kontrolnih ispitanika podudarnih prema dobi i spolu, polimorfizam HPA-1 pokazuje značajnu alelnu i genotipsku povezanost s fenotipom bolesti.

U dosadašnjem malom broju istraživanja polimorfizmi HPA nisu povezani s hemoragijskim CVI-om (75,80,162). Jedini rad u kojem je dokazana povezanost polimorfizama GP i moždanog krvarenja je studija Inieste i sur. (163). Prema rezultatima navedene studije alel HPA-1b značajno smanjuje rizik od subarahnoidalnog kvarenja i u kombinaciji s alelom

HPA-2b taj utjecaj se dodatno pojačava. Njihovi rezultati podržavaju teoriju o suprotnim ulogama polimorfizama HPA u patogenezi poremećaja zgrušavanja u odnosu na poremećaje krvarenja. Također je bitno naglasiti da je alel HPA-1b uglavnom odsutan u Japanaca kod kojih je prisutna vrlo visoka učestalost subarahnoidalnog krvarenja.

Prema funkcionalnim istraživanjima alel HPA-1b nema utjecaja na vezivanje trombocita s fibrinogenom (164), dok prema drugom istraživanju vezivanje fibrinogena na trombocite stimulirane ADP-om je više u ispitanika s alelom HPA-1b (165). Laserskom fluorescentom mikroskopijom grupa autora također je potvrdila stabilniju adheziju trombocita pri visoko protočnim uvjetima genotipa HPA-1b/b, u odnosu na HPA-1a/a (166).

Trombocitni GPIb/V/IX je glavni receptor VWF i odgovoran je za početnu adheziju i aktivaciju trombocita pod visoko protočnim uvjetima. U rezultatima ovog istraživanja u odraslih s CVP-om dobivena je manja učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) i alela HPA-2b u odnosu na kontrolnu skupinu. Veća učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) i alela HPA-2b dobivena je samo za kontrolnu skupinu muških u odnosu na muške s CVP-om, dok u ženskoj populaciji ta razlika nije zabilježena. Muškarci s alelom b imali su 55% manji rizik oboljenja od CVP-a u odnosu na muškarce s alelom a, odnosno homozigoti ili heterozigoti za divlji alel a imali su veću sklonost CVP-u. Značajno veća učestalost alela HPA-2a u bolesnika s iCVI-om, u odnosu na kontrolnu skupinu, dobivena je i u istraživanju Chen i sur. (156), ali u objema ispitivanim skupinama učestalosti alela HPA-2a bile su podudarne za veći broj ispitanika.

Suprotno prethodnim rezultatima, u radu González-Conejero i sur. (84) dobivena je značajna povezanost alela HPA-2b i akutnog cerebrovaskularnog događaja (TIA, iCVI). Nije zabilježena nikakva razlika u genotipu HPA-2, s obzirom na dob, spol ili vrstu cerebrovaskularnog događaja. Također i rezultati istraživanja Sonoda i sur. (85) ukazuju na značajno veću učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) u ispitanika s cerebrovaskularnom bolešću u usporedbi s kontrolnom skupinom. Statistički značajna razlika u učestalosti genotipa HPA-2 (a/b + 2b/b) prisutna je za oba spola (bolesni u odnosu na kontrole). Utjecaj genotipova puno je više izražen u bolesnika mlađih od 60 godina ili u bolesnika bez stečenih kardiovaskularnih čimbenika rizika. U bolesnika s TIA-om i lakunarnim moždanim udarom zabilježena je veća učestalost genotipa HPA-2 (a/b + b/b) u usporedbi s kontrolnom skupinom

za razliku od atreotrombotičnog CVI-a u kojem razlika nije dobivena. I u rezultatima meta-analize Maguire i sur. (167) potvrđena je povezanost HPA-2a/b polimorfizama s iCVI-om (HPA-2a/b vs. HPA-2a/a, OR = 1,43 (1,13-1,81)).

Međutim, postoje istraživanja koja nisu potvrdila povezanost polimorfizma HPA-2 s CVP-om u odraslih (75,77,157,168,169).

Prema rezultatima ovog istraživanja u skupini djece s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu djece nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela HPA-2. Jedini rad u kojem je istražena povezanost polimorfizma HPA-2 u djece s CVP-om (80), obuhvaća dio podataka ovog istraživanja, prema kojima alel HPA-2b, kao i kombinacija genotipa HPA-2a/b i HPA-5a/b značajno povećavaju rizik za TIA-u. Ova povezanost alela HPA-2b s TIA-om, nije potvrđena u sadašnjem istraživanju kada su podskupine (iCVI, TIA) uspoređene s kontrolnim skupinama djece podudarnim prema dobi i spolu.

U svakom slučaju rezultati svih dosadašnjih ispitivanja postavljaju pitanje o utjecaju polimorfizma HPA-2 na strukturalna i funkcionalna svojstva veznog mjesta za VWF. Naime polimorfizam HPA-2 smješten je u blizini veznog mjesta za VWF i trombin, te bi ovaj polimorfizam mogao utjecati na funkciju receptora. Istraživanje Mazzucato i sur. (170) ukazuje da ne postoji funkcionalna abnormalnost vezivanja VWF na trombocitni GPIbα uslijed prisutnosti različitih genotipova HPA-2. Suprotno ovomu, rezultati jedne studije funkcionalnog ispitivanja trombocita pokazali su puno jače međudjelovanje VWF s alelom HPA-2a, što je u suprotnosti s oznakom alela HPA-2b kao genskog čimbenika rizika (86), a u skladu je s dobivenim rezultatima ovoga rada.

Na receptoru GPIIb/IIIa smješten je i polimorfizam HPA-3. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja ne nalazi se povezanost polimorfizma HPA-3 s CVP-om u odraslih (75,77,156), što je u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja. U istraživanju Carter i sur. (82) također nije dobivena razlika u genotipskoj učestalosti HPA-3 između odraslih s akutnim iCVI-om i kontrolne skupine. Dobivena je jedino razlika u genotipskoj učestalosti HPA-3

između umrlih bolesnika s iCVI-om i preživjelih. Relativni rizik smrtnosti od iCVI-a u bolesnika s genotipom a/a iznosio je 2,42 (1,24-4,71) a za genotip a/b 2,13 (1,09-4,17) u odnosu na genotip b/b.
Jedino u istraživanju Duan i sur. (171) u ispitanika mlađih od 60 godina osobito muškaraca, dobivena je povezanost s HPA-3, odnosno HPA-3 b/b dvostruko povećava rizik iCVI-a.

Prema rezultatima ovoga istraživanja polimorfizam HPA-3 nije povezan s CVP-om u djece. U djece s iCVI-om dobivena je nešto veća učestalost genotipa HPA-3a/a u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti. Jedini rad u kojem je istražena povezanost polimorfizma HPA-3 u djece s CVP-om (80), obuhvaća dio podataka ovog istraživanja, prema kojima nosioci alela HPA-3b imaju manji rizik za iCVI. Ovaj rezultat nije potvrđen rezultatima ovoga rada kada su podskupine (iCVI, TIA) uspoređene s kontrolnim skupinama djece podudarnim prema dobi i spolu, ali ukazuje na umjerenu zaštitnu ulogu genotipa HPA-3 (a/b + b/b) u djece s iCVI-om.

Funkcionalno značenje polimorfizma HPA-3 je nejasno, budući da se ono ne javlja unutar područja GPIIb koje je značajno za vezivanje fibrinogena ili Arg-Gly-Asp peptida (62). Osim toga HPA-3 može biti nefunkcionalni polimorfizam, koji je u veznoj neravnoteži s nekim drugim polimorfizmom. Također postoji mogućnost da alel HPA-3a može utjecati na stabilnost međudjelovanje trombocita i fibrinogena kojim nastaje stabilniji ugrušak možda otporniji na lizu, što bi eventualno moglo objasniti dobivenu veću učestalost alel HPA-3a u djece s CVI-om. Naime u radu Cartera (82) homozigoti ili heterozigoti za alel a imali su veću sklonost smrtnosti od iCVI-a u odnosu na homozigote s alelom b.

HPA-5 je smješten na GPIa/IIa koji je uključen u adheziju trombocita na fibrilarni i nefibrilarni kolagen. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s literaturnim podacima prema kojima nije nađena povezanost polimorfizma HPA-5 u odraslih s CVP-om (75,77,156). Jedino u već spomenutom radu Saida i sur. (154) u bolesnika s prvim iCVI-om dobivena je veća učestalost alela HPA-5b, u odnosu na kontrolnu skupinu kao i povezanost genotipa HPA-5a/b i HPA-5b/b s iCVI-om.

U rezultatima ovog istraživanja polimorfizam HPA-5 nije povezan s CVP-om u djece. U djece s TIA-om dobivena je nešto veća učestalost genotipa HPA-5a/b u odnosu na kontrolnu skupinu ali bez statističke značajnosti. Također u djece s TIA-om dobivena je veća učestalost genotipa HPA-5a/b i alela HPA5-b, u odnosu na djecu s iCVI-om.

Jedini rad u kojem je istražena povezanost polimorfizma HPA-5 u djece s CVP-om (80), obuhvaća dio podataka ovog istraživanja, prema kojima nosioci alela HPA-5b, genotip HPA-5a/b, kao i kombinacija genotipa HPA-2a/b i HPA-5a/b značajno povećavaju rizik za TIA-u. Ova povezanost nije potvrđena rezultatima ovoga rada kada su podskupine (iCVI, TIA) uspoređene s kontrolnim skupinama djece podudarnim prema dobi i spolu, ali dobiveni rezultati ukazuju na umjerenu povezanost genotipa HPA-5a/b u djece s TIA-om. Možemo pretpostaviti da bi istraživanje na većem uzorku, zbog niske učestalosti alela HPA-5b u populaciji, vjerojatno pridonijelo definiranju statističke značajnosti te razlike.

Polimorfizam HPA-5 je smješten u kation vezujućoj domeni GPIa (172) i prema jedinom dosadašnjem funkcionalnom ispitivanju, polimorfizam HPA-5 ne utječe na različitu adhezivnost trombocita na kolagen, osim smanjenog vezivanja HPA-5b na proteoglikan dekorin (173).

Rezultati ovog istraživanja raspodjele učestalosti polimorfizama PSEL-a pokazali su da u skupinama djece i odraslih s CVP-om kao i u podskupinama (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolne skupine djece i odraslih nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela.

Prva istraživanja polimorfizama gena za PSEL kao i HPA uključivala su kardiovaskularne bolesnike. U trima studijama dokazana je zaštitna uloga alela 715P u bolesnika s infarktom miokarda (87,93,94), ali postoje i studije koje to nisu potvrdile (88,95,174,175,176). Osim polimorfizma T715P, u nekim od spomenutih radova ispitana je povezanost i ostalih polimorfizama PSEL-a (S290N, N562D i V599L) s infarktom miokarda (87,88,94,176), ali nisu dobiveni statistički značajni rezultati. Jedino analizom haplotipa u radu Tregouta (94) osim zaštitne uloge 715P, otkriveno je da je prisutnost dvaju asparagina na pozicijama S290N i N562D u svezi s infarktom miokarda, odnosno haplotip NNVT je rizičan za populaciju

sjevernih Iraca i Francuza. U radu Bugerta i sur. (88) alel 715P bio je povezan s hiperkolesterolemijom u bolesnika s infarktom miokarda, što je u suprotnosti s prethodnim rezultatima o zaštitnoj ulozi alela 715P. Dobivene genotipske učestalosti PSEL-a za kontrolnu skupinu ispitanika u njegovu radu odgovaraju učestalostima koje su dobivene u ovom istraživanju.

U mnogim radovima istražena je povezanost polimorfizama PSEL-a s koncentracijom PSEL-a. Prema rezultatima Reinera i sur. (177) alel 715P značajno utječe na nižu koncentraciju PSEL-a u europskih Amerikanaca, a u afričkih Amerikanaca tu ulogu ima alel 599L. Slični rezultati dobiveni su i u radu Marteau i sur. (178) prema kojima su haplotipovi NLT i NVP značajno povezani sa smanjenom koncentracijom PSEL-a (u haplotipnu kombinaciju nije uvršten S290N). Povezanost alela 715P s nižom koncentracijom PSEL-a dobivena je i u bijelaca i Azijata u radu Millera i sur. (179). U radu Volciki i sur. (180) istražena je povezanost četiriju polimorfizama PSEL-a s koncentracijom trombocitnog PSEL-a u bolesnika sa značajnom stenozom karotidnih arterija. U bijelaca genotipovi 715TP i 715PP povezani su sa značajno nižim koncentracijama trombocitnog PSEL-a, dok u američkih Afrikanaca nositelji genotipova 562ND i 562DD sa značajno višim koncentracijama.

Postoji vrlo mali broj istraživanja u kojima je ispitana povezanost polimorfizama PSEL-a i CVP-a u odraslih, a u dječjoj populaciji takvih istraživanja zasada nema. Dosadašnji radovi u odraslih ne dokazuju povezanost polimorfizama PSEL-a s CVP-om (96,97,98,99).

U radu Volciki i sur. (96) ispitana su sva četiri polimorfizma u bolesnika sa srčanom bolešću i iCVI-om u bijelaca i afričkih Amerikanaca. Učestalosti genotipova za afričke Amerikance značajno se razlikuju u odnosu na bijelu rasu. Genotip PSEL 290NN značajan je prediktor srčane bolesti u bijelaca (HRR = 1,30 (1,00-1,70)), kao i haplotip PSEL NNVP (HRR = 2,09 (1,23-3,55)). U bolesnika s iCVI-om nije nađena povezanost niti s polimorfizmima PSEL-a niti s haplotipovima. Dobivene učestalosti genotipova u bijelaca s iCVI-om za sve ispitivane polimorfizme vrlo su slične rezultatima ovoga istraživanja za skupinu s CVP-om.

Prema podacima ovog istraživanja jedino u djece s CVP-om dobivena je nešto veća učestalost genotipa 562DD u odnosu na kontrolnu skupinu, ali dobivena razlika nije bila statistički značajna (P = 0,090). Razdvajanjem skupine prema vrsti CVP-a, veća učestalost genotipa 562DD dobivena je samo u djece s iCVI-om, od kuda potječe razlika koja je dobivena u skupini s CVP-om. Ovaj rezultat bi mogao ukazivati na umjerenu rizičnu ulogu genotipa 562DD u djece s iCVI-om. Prema dobivenim rezultatima haplotip ANDVT je rizičan za dječju populaciju, a u odraslih haplotip GSDLT ima zaštitnu ulogu. Najučestaliji haplotip u našim kontrolnim skupinama je GSDVT, a i ostale učestalosti haplotipova vrlo su slične rezultatima dobivenim za kontrolnu skupinu u radu Herrmanna i sur. koji su obradili samo haplotipove PSEL-a (87).

Prema radu Ferrari i sur. (97) u kojem je ispitan polimorfizam T715P u bolesnika mlađih od 60 godina (iCVI, TIA) i kontrolnoj skupini, dobivene su slične učestalosti genotipova. Nije dobivena razlika u učestalostima genotipova prema spolu, niti u mlađih od 45 godina. Također nije nađena povezanost polimorfizma T715P s čimbenicima rizika, etiologijom ili jačinom iCVI-a. I u rezultatima ovoga rada u mlađih s CVP-om (manje od 50 godina) u odnosu na kontrolu skupinu nisu dobivene razlike u učestalostima polimorfizama PSEL-a. No suprotno njima dobivena je povezanost nekih od polimorfizama s čimbenicima rizika. Rezultati u ovome radu ukazuju na povezanost genotipa 715TP s CVP-om u bolesnika koji uzimaju alkohol u većim količinama (P = 0,042), genotipa 562DD s CVP-om u bolesnika koji u podlozi imaju srčanu bolest (P = 0,010) ili koji su pretili (P = 0,046) u odnosu na bolesnike bez čimbenika rizika. Najvjerojatnije polimorfizmi PSEL-a u kombinaciji sa standardnim čimbenicima rizika doprinose razvitku CVP-a. Svi istraživani polimorfizmi PSEL-a smješteni su u kodirajućoj regiji, unutar ponavljajuće sekvence, te mogu djelovati na sekundarnu strukturu proteina i tako utjecati na specifično vezivanje za ligand (88), ali zasad ne postoje istraživanja funkcionalnog utjecaja ovih polimorfizama.

U ovom istraživanju osim ispitivanih polimorfizama HPA i PSEL-a za sve ispitanike određeni su već dobro poznati čimbenici rizika venske tromboze, FV G1691 i FII G20210A. Gen za FV smješten je u blizini gena za PSEL na kromosomu 1 (92).

Prema rezultatima ovog istraživanju u odraslih s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu, nije dobivena značajna razlika u učestalostima genotipova i alela FV G1691A, što je u skladu s nekim dosadašnjim studijama. U istraživanju starije populacije od 65 godina (iCVI, TIA) (110), kao i velikoj prospektivnoj studiji u muškoj populaciji s iCVI-om (111), te istraživanju u mlađih žena (127) i mlađih odraslih oba spola s iCVI-om (181), nije dobivena povezanost s FV G1691A. Prema istraživanju provedenom na Francuzima starije životne dobi s iCVI-om također nije nađena povezanost, osim u bolesnika bez pozitivne obiteljske anamneze kardiovaskularnih bolesti (112). U radu Lalouschek i sur. (113) u bolesnika mlađih od 60 godina (iCVI, TIA) u odnosu na kontrolnu skupinu podudarnu prema dobi i spolu nije nađena povezanost s FV1691A, osim u žena koje puše uz OR = 8,8 (2,0-38,0). Prema ovom istraživanju povezanost mutacije FV G1691A u odraslih CVP-om nije dobivena niti u ispitivanim podskupinama (s čimbenicima rizika, bez čimbenika rizika, mlađi od 50 godina). I prema rezultatima rada u kojem su objedinjene dvije meta-analize u odraslih s iCVI-om povezanost s FV G1691A također nije dokazana (119).

No suprotno prethodnim podacima postoje radovi u kojima je dokazana povezanost FV G1691A s CVP-om u odraslih. U istraživanju Margaglione i sur. (114) u mlađih bolesnika s iCVI-om, dobivena je povezanost s FV G1691A (OR = 2,6 (1,3-5,1)), koja je još više izražena u žena (OR = 3,95 (1,6-10,1)). Prema rezultatima Eterovića i sur. (115) u hrvatskoj populaciji mlađoj od 65 godina s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu mutacija je bila značajno učestalija, te prisutnost mutacija FV G1691A i FII G20210A značajno doprinose riziku iCVI-a osobito u žena i bolesnika bez čimbenika rizika. I rezultati četiriju meta-analiza također ukazuju na povezanost FV G1691A s i iCVI-om (Hamedani i sur. (116), OR = 2,00 (1,59-2,51); Wu i sur. (117), OR = 1,43 (1,03 - 1,97); Kim i Becker (118), OR = 1,21 (0,99-1,49); Casas i sur. (52), OR = 1,33 (1,12 - 1,58)).

Istraživanja u djece kao i u odraslih daju oprečne rezultate. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu razliku između djece s CVP-om i kontrolne skupine djece u genotipskoj (14,0% vs. 3,0%; OR = 5,26 (1,46-18,94); P = 0,009) i alelnoj učestalosti (7,0% vs. 1,5%; OR = 4,94 (1,40-17,48); P = 0,011) za FV G1691A. Dobiveni rezultati u skladu su s mnogim istraživanjima provedenim u različitim dječjim populacijama s iCVI-om, u kojima su bile podjednake brojčane skupine kontrolnih ispitanika i bolesnih kao i u našem istraživanju (Komitopoulou i sur. (79), OR = 3,8 (1,4-10,6); Heller i sur. (102), OR = 5,7 (1,9-17,3); Kenet i sur. (103), OR = 4,8 (1,4-16,5); Nowak-Göttl i sur. (105), OR = 6,0 (2,97-12,1);

Günther i sur. (122), OR = 3,9 (1,7-9,0)). I u radovima u kojima su bile zastupljene manje skupine dječjih ispitanika s iCVI-om mutacija je bila učestalija u odnosu na kontrolnu skupinu (104,182,183,184). Rezultati rada u kojem je obuhvaćen dio podataka ovog istraživanja, pokazali su da heterozigoti za FV G1691A imaju sedam puta veći rizik za iCVI u dječjoj i perinatalnoj dobi, kao i za TIA-u (80). Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju djeca s CVP-om koja su nosioci heterozigotnog genotipa GA ili djeca s alelom A imaju 5 puta veći rizik oboljenja od CVP-a, ali ne i u podskupinama (iCVI, TIA). Za razliku od objavljenog rada u ovom istraživanju podskupine (iCVI, TIA) uspoređivane su s odgovarajućim kontrolnim skupinama podudarnima prema dobi i spolu.

Također postoje radovi u kojima povezanost mutacije FV G1691A u djece s iCVI-om nije dokazana (106,107,108,109,185,186). Rezultati meta-analize iCVI-a također ne ukazuju na povezanost s navedenom mutacijom (123).

U ovom istraživanju u odraslih i djece FII G20210A nije povezan s CVP-om. Prema literaturnim podacima istraživanja ove mutacije u odraslih kao i u djece s CVP-om nisu rezultirala jasnim zaključcima.

U radu Lalouschek i sur. (113) učestalost mutacije je značajno veća u odraslih muških s iCVI-om i TIA-om u usporedbi s kontrolnom skupinom uz OR = 6,1 (1,3-28,3). Prema rezultatima Eterovića i sur. (115) u hrvatskoj populaciji mlađoj od 65 godina s iCVI-om u odnosu na kontrolnu skupinu mutacija je bila značajno učestalija. Rezultati dviju meta-analiza također daju povezanost FII G20210A s iCVI-om (Kim i Becker (118), OR = 1,32 (1,03-1,69); Casas i sur. (52), OR = 1,44 (1,11 - 1,86)).

Također postoje radovi u kojima ova povezanost u odraslih s CVP-om nije dokazana. U rezultatima jedne prospektivne studije muškaraca s iCVI-om nije nađena povezanost s mutacijom (126), kao niti u studiji u kojoj su bile zastupljene samo žene mlađe od 45 godina (127) ili u istraživanju u kojem su bila zastupljeni bolesnici oba spola do 45 godina s iCVI-om (181). Rezultati meta-analize iCVI-a također ne ukazuju na povezanost s mutacijom (117). Prema rezultatima ovog istraživanja povezanost mutacije FII G20210A u odraslih s CVP-om nije dokazana niti u podskupinama (s čimbenicima rizika, bez čimbenika rizika, mlađi od 50 godina).

U nekoliko istraživanja obrađeni su odrasli i djeca zajedno. Tako u radu de Stefana i sur. (124) u ispitanika od 2-50 godina s iCVI-om učestaliji je mutirani alel A FII (OR = 5,1 (1,6-16,3)), za razliku od druga dva istraživanja u kojima ova povezanost nije bila prisutna (114,125).

Postoje dva rada u kojima je dokazana povezanost FII G20210A i iCVI-a u djece (105,184), za razliku od brojnih istraživanja u kojima ova povezanost nije dokazana (79,80,102, 103,104,107,108,122,185,186). Rezultati meta-analize iCVI-a također ne ukazuju na povezanost s mutacijom (123).

U konačnici dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazali su da je mutacija FV G1691A najvažniji prediktor CVP-a u dječjoj dobi, za razliku od odraslih kod kojih prema modelu multivarijantne statističke analize jedini značajni parametri za razvoj CVP-a su standardni čimbenici rizika.

Kao što je vidljivo iz literaturnih navoda i prema dobivenim rezultatima ovoga rada, o utjecaju ispitivanih polimorfizama na CVP-e postoje vrlo oprečni rezultati, koji se mogu objasniti razlikama u ispitivanim populacijama, različitim vrstama ispitivanih CVP-a, različitim dobnim granicama ispitanika kao i različitim odabirom kontrolnih ispitanika. Jedan od glavnih nedostataka u istraživanju parova, upravo je neadekavatan odabir kontrolne skupine i mala snaga istraživanja koja je najčešće posljedica nedovoljnog broja ispitanika uključenih u istraživanje, što je jedan od mogućih nedostataka i ovog rada. Može se pretpostaviti da bi istraživanje na većem broju uzoraka kontrolnih skupina i skupina s CVP-om, osobito kod niske učestalosti polimorfnih alela u populaciji, vjerojatno pridonijelo definiranju statističke značajnosti razlike. Iako uslijed poligenske prirode CVP-a doprinos pojedinačnih polimorfizama njegovom nastanku nije velik, stoga i nije uvijek moguće detektirati taj mali genski učinak. Mali je broj i meta-analiza koje bi objedinile dosadašnje spoznaje i dale relevantan odgovor o povezanosti ovih polimorfizma s CVP-om, osobito u području polimorfizama HPA i PSEL-a. Pretraživanjem dostupnih baza podataka ne postoje prethodna istraživanja povezanosti ispitivanih polimorfizama s pojavnošću CVP-a od strane hrvatskih autora, osim rada u kojem je objavljen dio rezultata ovog istraživanja (80).

7. ZAKLJUČCI

1. Alelne učestalosti HPA u hrvatskoj populaciji slične su rezultatima drugih populacijskih studija u Europi. Postoje razlike za HPA-2, -3 i -5 u odnosu na određene Europljane. HPA-2b učestaliji je u odnosu na Nijemce, Nizozemce i Austrijance, HPA-3b u odnosu na Švicarce, a HPA-5b u odnosu na Fince.

2. U djece s TIA-om učestaliji je genotip HPA-5a/b (OR = 3,18 (1,06-9,59); P = 0,064) u odnosu na kontrolnu skupinu. Za definiranje statističke značajnosti te razlike, neophodan je veći broj ispitanika. Značajno učestaliji genotip HPA-5a/b i alel HPA5b dobiven je u djece s TIA-om u odnosu na djecu s iCVI-om.

3. Odrasli muški s CVP-om imali su značajno manju učestalost genotipa HPA (2a/b + 2b/b) i alela HPA-2b u odnosu na kontrolnu skupinu. Nositelji alela b muškog spola su imali 55% manju vjerojatnost oboljenja od CVP-a.

4. Djeca koja su nositelji genotipa GA ili s alelom A FV G1691A imala su 5 puta veću vjerojatnost oboljenja od CVP-a.

5. Značajno učestaliji genotip GA i alel A FV G1691A dobiven je u djece u odnosu na odrasle s CVP-om, kao i s iCVI-om.

6. U odraslih s CVP-om značajno su zastupljeniji bolesnici s pozitivnom obiteljskom anamnezom, hipertenzijom, šećernom bolesti i alkoholizmom, u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. U alkoholičara s CVP-om dobivena je statistički značajna povezanost s genotipom 715TP, u pušača s HPA-1 (a/b + 1b/b), u pretilih i sa srčanim poteškoćama s 562DD u odnosu na bolesnike bez čimbenika rizika. U hipertenzivnih s CVP-om genotip HPA-1 (a/b + b/b) bio je učestaliji u odnosu na kontrolne ispitanike s hipertenzijom.

7. Multivarijantna regresijska analiza u odraslih potvrdila je obiteljsku anamnezu, hipertenziju, šećernu bolest i alkoholizam kao čimbenike bitne za razvoj CVP-a, ali ne

i zaštitnu ulogu alela HPA-2a. Korištenjem ovog modela 76,7% od ukupnog broja ispitanika može se ispravno klasificirati kao bolesnik s CVP-om ili kao kontrolni ispitanik.

8. LITERATURA

1. Bekavac I. Poremećaji moždanih funkcija. U: Gamulin S, Marušić M. i sur., urednici. Patofiziologija. 4 izd., Zagreb: Medicinska naklada;1998;831-5.
2. Harrison principles of internal medicine, dostupno na: http://gateway.ut.ovid.com/gw1/ovidweb.cgi. datum pristupa 27.02.06.
3. Lovrenčić-Huzjan A. Cerebrovaskularne bolesti. U: Vrhovac B. i sur., urednici. Interna medicina. 3 izd., Zagreb: Naklada Ljevak;2003;1616-8.
4. Lušić I. Algoritam zbrinjavanja bolesnika s TIA-om. Medix 2008;79:86-9.
5. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, et al. Transient ischemic attack-proposal for a new definition. N Engl J Med 2002;347:1713-6.
6. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993;24:35-41.
7. Lynch JK. Cerebrovascular disoders in children. Curr Neurol Neurosci Rep 2004;4:29-38.
8. 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.
9. Jordan LC. Stroke in childhood. Neurologist 2006;12:94-102.
10. deVeber G. Arterial ischemic strokes in infants and children: An overview of current approaches. Semin Thrombosis Haemost 2003;29:567-73.
11. Rotta NT, da Silva AR, da Silva FLF, Ohlweiler L, Belarmino E, Fonteles VR, et al. Cerebrovascular disease in pediatric patients. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60:959-63.
12. Barišić N, Bašnec A, Bešenski N. Cerebrovaskularne bolesti. U: Barišić N. i sur., urednici. Pedijatrijska neurologija. 1 izd., Zagreb: Medicinska naklada;2009;535-63.
13. Kirkham FJ. Stroke in childhood. Arch Dis Child 1999;81:85-9.
14. Kaul S. Cerebrovascular disease in children. Indian Pediatr 2000;37:159-71.
15. deVeber G. Stroke and the child's brain: an overview of epidemiology, syndromes and risk factor. Curr Opin Neurol 2002;15:133-8.
16. Đuranović V, Mejaški-Bošnjak V, Marušić Della Marina B, Lujić L, Leniček J. Cerebrovaskularne bolesti u djece. Medix 2004;56/57:133-7.
17. The European registers of stroke (EROS) investigators. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. Stroke 2009;40:1557-63.

18. Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. Stroke 2001;32:280-99.
19. Hrabek-Žerjavić V, Kralj V, Dika Ž, Jelaković B. Epidemiologija hipertenzije, CVI-a i infarkta miokrada u Hrvatskoj. Medix 2010;87/88:102-7.
20. Demarin V. Najnovije spoznaje u prevenciji, dijagnostici i liječenju moždanog udara u starijih osoba. Medicus 2005;14:219-28.
21. Turtzo LC, McCullough LD. Sex Differences in Stroke. Cerebrovasc Dis 2008, 26:462-74.
22. Rosamond WD, Folsom AR, Chambless LE, Wang CH, McGovern PG, Howard G, et al. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort. Stroke 1999;30:736-43.
23. Hachinski V. Stroke in Japanese. Stroke 2006;37:1143
24. Kes P, Jurić I, Bašić-Kes V, Demarin V. Primarna i sekundarna prevencija CVI-a: kontrola arterijske hipertenzije. Medix 2008;79:120-3.
25. Abbott R, Yin Y, Reed D, Yano K. Risk of stroke in male cigarette smokers. N Engl J Med 1986;315:717-20.
26. Colditz G, Bonita R, Stampfer M, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Cigarette smoking and risk of stroke in middle-aged women. N Engl J Med 1988;318:937-41.
27. Wolf PA, D'Agostino RB, Kannel WB, Bonita R, Belanger AJ. Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. JAMA 1988; 259:1025-9
28. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. Stroke 2006;37:13-9.
29. Sacco R, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, et al. The protective effect of moderate alcohol consumption on ischaemic stroke. JAMA 1999;281:53-60.
30. Silvestrelli G, Paciaroni M, Caso V, Milia P, Palmerini F, Venti M, et al. Risk factors and stroke subtypes: results of five consecutive years of the Perugia Stroke Registry. Clin Exp Hypertens 2006;28:279-86.
31. Bornstein N, Silvestrelli G, Caso V, Parnetti L. Arterial hypertension and stroke prevention: an update. Clin Exp Hypertens 2006;28:317-26.

32. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). SHEP Cooperative Research Group. JAMA 1991;265:3255-64
33. Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from the stroke council of the American heart association. Circulation 2001;103:163-82.
34. UK Prospective Diabetes Study (KPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998;352:837-53.
35. Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul PJ**.** Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. Stroke 2004;35:2902-9.
36. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet 2005;366:1267-78.
37. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. JAMA1997;277:1539-45.
38. Harmsen P, Lappas G, Rosengren A, Wilhelmsen L. Long-term risk factors for stroke: twenty-eight years of follow-up of 7457 middle-aged men in Göteborg, Sweden. Stroke 2006;37:1663-7.
39. Tomasik T, Windak A, Margas G, de Melkera RA, Jacobs HM. Transient ischaemic attacks: desired diagnosis and management by Polish primary care physicians. Family Practice 2003;20:464-8.
40. Kleindorfer D, Panagos P, Pancioli A, Khoury J, Kissela B, Woo D, et al. Incidence and short-term prognosis of transient ischemic attack in a population-based study. Stroke 2005;36:720-3.
41. Bak S, Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins. Stroke 2002;33:769-74.
42. Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH. Familial aggregation of stroke: the Framingham study. Stroke 1993;24:1366-71.
43. Liao D, Myers R, Hunt S, Shahar E, Paton C, Burke G, et al. Familial history of stroke and stroke risk: the Family Heart Study. Stroke 1997;28:1908-12.

44. Bersano A, Ballabio E, Candelise L. Genetic of ischemic stroke. Riv. It. Neurobiologia 2007;53:15-23.
45. Carr FJ, McBride MW, Carswell HV, Graham D, Strahorn P, Clark JS, et al. Genetic aspects of stroke: human and experimental studies. J Cereb Blood Flow Metab 2002 ;22:767-73.
46. Stanković S, Majkić-Singh N. Genetic aspect of ischemic stroke. Jugoslov Med Biohem 2005;24:225-39.
47. Doi Y, Yoshinari M, Yoshizumi H, Ibayashi S, Wakisaka M, Fujishima M. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. Atherosclerosis 1997;132:145-50.
48. Margaglione M, Celentano E, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, et al. Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene in patients with a history of ischemic stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:304–9.
49. Aalto-Setala K, Palomaki H, Miettinen H, Vuorio A, Kuusi T, Raininko R, et al. Genetic risk factor and ischemic cerebrovascular disease: role of common variation of the genes encoding apolipoproteins and angiotensinconverting enzyme. Ann Med 1998;30:224–33.
50. Zee RYL, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpaintner K. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. Circulation 1999;99:340–3.
51. Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chedru F, Cambien F,Amarenco. P. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. The GENIC Investigators. Stroke 2000;31:1634-39.
52. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of Genetic Studies in Ischemic Stroke Thirty-two Genes Involving Approximately 18000 Cases and 58000 Controls. Arch Neurol. 2004;61:1652-62.
53. Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi T. No association between Glu/Asp polymorphism of NOS3 gene and ischemic stroke. Neurology 2000; 55:460-1.
54. Mc Carron M. Delong D, Alberts M. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: A meta-analysis. Neurology 1999;53:1308-11.
55. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Bazzoli E, Archetti S, Assanelli D, et al. A synergistic effect of apolipoprotein E polymorphisms and cigarette smoking on risk of ischemic stroke in young adults. Stroke 2004;35:438-42.

56. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, et al. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian case-control study. Stroke 1998;29:399-403
57. Michelson AD. How platelets work: Platelet function and dysfunction. J Thromb Thrombolysis 2003;16:7-12.
58. George JN. Platelets. Lancet 2000;355:1531-9.
59. Koutsogianni P. Nomenclature of human platelet antigens and clinical conditions. Haema 2004;7:82-8.
60. Rožman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. Transpl Immunol 2002;10:165-81.
61. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Kunicki TJ. Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000;222-40.
62. Nurden A.T. Polymorphisms of human paltelet membrane glycoproteins: Structure and clinical significance. Thromb Haemostas 1995; 74(1): 345-51.
63. Zadro R. Genski polimorfizmi ljudskih trombocitnih antigena U: Zadro R, urednici. Trombociti. Zagreb, 2008:39-34.
64. Norton A, Allen DL, Murphy MF. Review: platelet alloantigens and antibodies and their clinical significance. Immunohematol 2004;20:89-102.
65. Metcalfe P, Watkns NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newmann P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang 2003; 85:240-5.
66. Deckmyn H, Ulrichts H, Van de Walle G, Vanhoorelbeke K. Platelet antigen and their function. Vox Sang 2004; 87:105-11.
67. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. Blood 1992;80:1386-404.
68. Rožman P, Drabbels J, Schipper RF, Doxiadis I, Stein S, Claas J. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. Eur J Immunogenet 1999;26:265-9.
69. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean populations. Transfusion 1995;35:863-7.
70. Yan L, Zhu F, He J, Sandler SG. Human platelet alloantigen systems in three Chinese ethnic populations. Immunohematology 2006;22:6-10.

71. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphisms of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. N Engl J Med 1996; 334:1090-4.
72. Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela BA, Dardik R, et al. Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33 Pro) polymorphism. Stroke 2001;32:2753-8.
73. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GPIIIa $P1^{A}$ and GPIb variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18:1124-31.
74. 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.
75. Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT, Pearce RM, Rosendaal FR, et al. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. Stroke 2000;31:1628-33.
76. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. $PI^{A1/A2}$ polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. Lancet 1997;349:385-8.
77. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorhisms 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.
78. Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, Ou CJ, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ, et al. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risik. The stroke prevention in young women study. Stroke 1998;29:581-5.
79. 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.
80. Coen Herak D, Radic Antolic M, Lenicek Krleza J, Pavic M, Dodig S, Duranovic V, et al. Inherited prothrombotic risk factors in children with stroke, transient ischemic attack and migraine. Pediatrics 2009; 123:e653-60.

81. Feng DL, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS., O′ Donnell CJ, Lipinska I, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa P1A2 polymorphism: The Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1142-7.
82. 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
83. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. Cell Signal 2004;16:1329-44.
84. González-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ibα associated with arterial thrombotic disease. Blood 1998;92:2771-6.
85. Sonoda A, Murata M, Ito D, Tanahashi N, Ohta A, Tada Y, et al. Association between platelet glycoprotein Ibα genotype and ischemic cerebrovascular disease. Stroke 2000;31:493-7.
86. Ulrichts H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, Vauterin S, Kroll H, Santoso S, et al. Von Willebrand but not α-thrombin binding to platelet glycoprotein Ibα is influenced by the HPA-2 polymorphism. Arterioscler Throm Vasc Biol 2003;23:1302-7.
87. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, et al.The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. Hum Mol Genet 1998;7:1277-84.
88. Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Klüter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. Clin Chem Lab Med 2004;42:997-1004.
89. André P. P-selectin in haemostasis. Br J Haematol 2004;126:298-306.
90. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. Z Kardiol 2004;93:855-63.
91. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin.Trends Mol Med 2004;10:179-86.
92. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation.Trends Mol Med 2004;10:171-8.
93. Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J, et al. Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and women in the ECTIM extension study. Heart 2000;84:548-52.

94. Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. Hum Mol Genet 2002;11:2015-23.
95. Barbaux SC, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Francomme C, Bickel C, Hafner G, et al. Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1668-73.
96. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Atherosclerosis 2007;195:e76-82.
97. Ferrari J, Rieger S, Endler G, Greisenegger S, Funk M, Scholze T, et al. The Thr715Pro polymorphism of the P-selectin gene is not associated with ischemic stroke risk. Stroke 2007;38:395-7.
98. Wei YS, Lan Y, Huang RY, Liu YG, Tang RG, Xu QQ, et al. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the P-selectin gene with ischemic stroke. J Thromb Thrombolysis 2009;27:75-81.
99. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Wu KK, Boerwinkle E. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Atherosclerosis 2006;186:74-9.
100. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterila thrombotic disease. Blood 2000;95:1517-32.
101. Radić Antolić M. Molekularna dijagnostika poremećaja zgrušavanja U: Zadro R, urednici. Koagulacija. Zagreb, 2010:35-45.
102. Heller C, Becker S, Scharrer I, Kreuz W. Prothrombotic risk factors in childhood stroke and venous thrombosis. Eur J Pediatr 1999;158:117-21.
103. Kenet G, Sadetzki S, Murad H, Martinowitz U, Rosenberg N, Gitel S, et al. Factor V Leiden and antiphospholipid antibodies are significant risk factors for ischemic stroke in children. Stroke 2000;31:1283-8.
104. Zenz W, Bodo Z, Plotho J, Streif W, Male C, Bernert G, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G 20210A variant in children with ischemic stroke. Thromb Haemost 1998;80:763-6.

105. Nowak-Göttl U, Sträter R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin and methylenete-trahydrofolate reductase are risk factors of ischaemic stroke in childhood. Blood 1999; 94:3678-82.
106. Ganesan V, McShane MA, Liesner R, Cookson J, Hann I, Kirkham FJ. Inherited prothrombotic states and ischaemic stroke in childhood. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998;65:508-11.
107. McColl MD, Chalmers EA, Thomas A, Sproul A, Healey C, Rafferty I, et al. Factor V Leiden, prothrombin 20210G to A and the MTHFR C677T mutations in childhood stroke. Thromb Haemost. 1999;81:690-4.
108. Sträter R, Vielhaber H, Kassenböhmer R, von Kries R, Göbel U, Nowak-Göttl U. Genetic risk factors of thrombophilia in ischaemic childhood stroke of cardiac origin. A prospective ESPED survey. Eur J Pediatr 1999;158:122-5.
109. Laugesaar R, Kahre T, Kolk A, Uustalu Ü, Kool P, Talvik T. Factor V Leiden and prothrombin 21210G>A mutation and paediatric ischaemic stroke: a case–control study and two meta-analyses. Acta Paediatrica 2010;99:1168-74.
110. Cushamn M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, et al. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study. Thromb Haemost 1998;79:912-5.
111. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. N Engl J Med 1995;332:912-7.
112. Ripoll L, Mazoyer E, Woimant F, Drouet LO. Different contribution of factor V Leiden-associated hypercoagulability to ischaemic cerebrovascular disease in the elderly. Blood Coagulation & Fibrinolysis 1997;8:253-4.
113. Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Tentschert S, Lang W, et al. Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. Stroke 2005;36:1405-9.
114. Margaglione M, D'Andrea G, Giuliani N, Brancaccio V, De Lucia D, Grandone E, et al. Inherited prothrombotic conditions and premature ischemic stroke sex difference in the association with factor V Leiden. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1751-56.

115. Eterović D, Titlić M, Čulić V, Zadro R, Primorac D. Lower contribution of Factor V Leiden or G202104 mutations to ischemic stroke in patients with clinical risk factors: Pair-matched case-control study. Clin Appl Thromb Hemost 2007;13:188-93.
116. Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, Kittner SJ. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults The importance of case ascertainment. Stroke 2010;41:1599-603.
117. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. Am J Cardiol 2001;87:1361-6.
118. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies.Am Heart J 2003;146:948-57.
119. Juul K, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 meta-analyses. Blood 2002;100:3-10
120. Junker J, Nowak-Gottl U. The prothrombin G201210A mutation-a common cause of thrombophilia? J Lab Med 1998;22:472-82.
121. McGlennen RC, Key NS. Clinical and laboratory management of the prothrombin G20210A mutation. Arch Pathol Lab Med. 2002;126:1319-25.
122. Günther G, Junker R, Sträter R, Schobess R, Kurnik K, Heller C, et al. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates : role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. Stroke 2000;31:2437-41.
123. Haywood S, Liesner R, Pindora S, Ganesan V. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke:a systematic review. Arch Dis Child 2005;90:402-5.
124. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M, et al. Prothrombin G20210A Mutant Genotype Is a Risk Factor for Cerebrovascular Ischemic Disease in Young Patients. Blood 1998; 91:3562-65.
125. Madonna P, de Stefano V, Coppola V, Cirillo F, Cerbone AM, Orefice G, et al. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. Stroke 2002;33:51-6.
126. Ridker P, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. Circulation 1999;99:999-1004.
127. Longstreth WT, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, et al. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). Stroke 1998;29:577-80.

128. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood 1992;80:1998-2005.
129. Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. J Hypertens 2003 ;21:1983-92.
130. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2002;25:5-20.
131. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1988;16:1215.
132. Chen DF, Pastucha LT, Chen HY, Kadar JG, Stangel W. Simultaneous genotyping of human platelet antigens by hot start seqence-specific polymerase chain reaction with DNA polymerase Amplitaq Gold. Vox Sang 1997;72:192-6.
133. Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen system-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. Vox Sang 1996;71:121-5.
134. Bein G, Hackstein H, Klüter H. DNA typing of human platelet antigen system 1, 2, 3 and 5 in B-lymphoblastoid cell lines of the International Histocompatibility Workshop. Tissue Antigens 1997;49:443-7.
135. Ficko T, Galvani V, Rupreht R, Dovc T, Rožman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. Transfus Med 2004;14:425-32.
136. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. J Clin Invest 1994;94:2521-4.
137. 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.
138. Holensteiner A, Walchshofer S, Adler A, Kittl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. Haemostasis 1995;25:133-6.
139. Kornikova P, Vytiskova J, Suttnar J, Stehlikova M, Dyr JE. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT)–diagnosis and impact on transfusion therapy. Pediatric Research 1999;45:766.

140. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. Tissue Antigens 1996;48:93-6.
141. Kekomäki S, Partanen J, Kekomäki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. Transfus Med 1995;5:193-8.
142. Pavkovic M, Petlichkovski A, Strezova A, Arsov T, Trajkov D, Spiroski M. Gene frequencies of human platelet antigens in the Macedonian population. Tissue Antigens 2006;67:241-6.
143. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. Blood 1993;81:835-40.
144. Drzewek K, Brojer E, Zupańska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. Transfus Med 1998;8:339-42.
145. Boehlen F, Bulla O, Michel M, Reber G, de Moerloose P. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors. Hematol J 2003;4:441-4.
146. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. Eur J Immunogenet 2003;30:415-9.
147. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. Eur Heart J 2003;24:2166-79.
148. Tomicic M, Bingulac-Popovic J, Drazic V, Hundric-Haspl Z. Frequency of HPA-15a and HPA-15b (Gov a/b) human platelet alloantigens in the Croatian population. Arch Med Res 2006;37:172-4.
149. Pavic M, Zadro R, Herak DC, Antolic MR, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. Transfus Med 2010;20:73-7.
150. Meisel C, Lopez JA, Stangl K. Role of glycoprotein polymorphisms in cardiovascular diseases. Arch Pharmacol 2004;369:38-54.
151. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. The Leu^{33}/Pro polymorphism (PI^{A1}/PI^{A2}) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. Thromb Haemost 1997;77:1179-81.
152. Slowik A, Dziedzic T, Turaj W, Pera J, Glodzik-Sobanska L, Szermer P, et al. A2 alelle of GpIIIa gene is a risk factor for stroke caused by large-vessel disease in males. Stroke 2004;35:1589-93.

153. Szolnoki Z, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Bene J, Havasi V, et al. Increased prevalence of platelet glycoprotein IIb/IIIa PLA2 allele in ischaemic stroke associated with large vessel pathology. Thromb Res 2003;109:265-9.
154. 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.
155. Lanni F, Santulli G, Izzo R, Rubattu S, Zanda B, Volpe M, et al. The Pl(A1/A2) polymorphism of glycoprotein IIIa and cerebrovascular events in hypertension: increased risk of ischemic stroke in high-risk patients. J Hypertens 2007;25:551-6.
156. Chen F, Jian Z, Xie Q, Pu X, Xiao B, Han L. Polymorphisms of human platelet alloantigen in Chinese patients with acute myocardial infarction and acute ischemic stroke. Chinese Medical Journal 2000;119:702-5.
157. Zhang Y, Wang Y, Wang Y, Cui C, Huang P, Li X, et al. Platelet glycoprotein polymorphisms: risk, in vivo expression and severity of atherothrombotic stroke in Chinese. Clin Chim Acta 2007;378:99-104.
158. Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Iniesta JA, Lozano ML, Vicente V. HPA-1 genotype in arterial thrombosis-role of HPA-1b polymorphism in platelet function. Blood Coagul Fibrinolysis 1997;8:284-90.
159. 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.
160. Wiwanitkit V. PIA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIIa and its correlation to cerebrovascular diseases: an appraisal. Clin Appl Thromb Hemost 2009;15:458-60.
161. Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, et al. Prothrombotic polymorphisms, mutations, and their association with pediatric non-cardioembolic stroke in Asian-Indian patients. Ann Hematol 2009;88:473-8.
162. Iniesta JA, Corral J, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V. Polymorphisms of platelet adhesive receptors: Do they play a role in primary intracerebral hemorrhage? Cerebrovasc Dis 2003;15:51-5.
163. Iniesta JA, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. Platelet GPIIIa polymorphism HPA-1(P1A) protects against subarachnoid hemorrhage. Stroke 2004;35:2282-6.

164. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PlA2): no association with platelet fibrinogen binding. Br J Haematol 1999;105:664-6.
165. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, et al. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PlA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. Eur Heart J 1999;20:742-7.
166. Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE. HPA-1 polymorphism of alphaIIbbeta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. Thromb J 2007;5:2.
167. Maguire JM, Thakkinstian A, Sturm J, Levi C, Lincz L, Parsons M, et al. Polymorphisms in platelet glycoprotein 1balpha and factor VII and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. Stroke 2008;39:1710-6.
168. Baker RI, Eikelboom J, Lofthouse E, Staples N, Afshar-Kharghan V, López JA, et al. Platelet glycoprotein Ibalpha Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. Blood 2001;98:36-40.
169. Gao XG, Huo Y, Liu XZ, Teng ZP. Gene polymorphism of platelet glycoprotein I balpha in Chinese patients with large- and small-artery subtypes of ischemic stroke. Eur Neurol 2005;54:73-7.
170. Mazzucato M, Pradella P, de Angelis V, Steffan A, de Marco L. Frequency and functional relevance of genetic threonine145/methionine145 dimorphism in platelet glycoprotein Ib alpha in an Italian population. Transfusion 1996;36:891-4.
171. Duan H, Cai Y, Sun X. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism HPA-3 b/b is associated with increased risk of ischemic stroke in patients under 60 years of age. Med Sci Monit 2011;18:CR19-24.
172. Kunicki TJ. The Influence of Platelet Collagen Receptor Polymorphisms in Hemostasis and Thrombotic Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:14-20.
173. Kunicki TJ, Williams SA, Diaz D, Farndale RW, Nugent DJ. Platelet adhesion to decorin but not collagen I correlates with the integrin α2 dimorphism E534K, the basis of the human platelet alloantigen (HPA)-5 system. Haematol 2011;DOI: 10.3324
174. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. J Thromb Haemost 2003;1:1718-23.
175. Ghazouani L, Abboud N, Khalifa SB, Perret C, Nicaud V, Almawi WY, et al. Contribution of SELP and PSGL-1 genotypes and haplotypes to the presence of coronary heart disease in Tunisians. Mol Biol Rep 2011;38:495-501.

176. Ghazouani L, Abboud N, Khlifa SB, Perret C, Nicaud V, Cambien F, et al. P-selectin gene polymorphisms and risk of coronary heart disease among Tunisians. J Thromb Thrombolysis 2009;28:314-9.
177. Reiner AP, Carlson CS, Thyagarajan B, Rieder MJ, Polak JF, Siscovick DS, et al. Soluble P-selectin, SELP polymorphisms, and atherosclerotic risk in European-American and African-African young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:1549-55.
178. Marteau JB, Lambert D, Herbeth B, Marie B, Droesch S, Tregouet DA, et al. P-selectin polymorphisms' influences on P-selectin serum concentrations and on their familial correlation: the STANISLAS family study. J Thromb Haemost 2008;6:920-7.
179. Miller MA, Kerry SM, Dong Y, Strazzullo P, Cappuccio FP. Association between the Thr715Pro P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels in a multiethnic population in South London. Thromb Haemost 2004;92:1060-5.
180. Volcik KA, Catellier D, Folsom AR, Matijevic N, Wasserman B, Boerwinkle E. SELP and SELPLG genetic variation is associated with cell surface measures of SELP and SELPLG: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. Clin Chem 2009;55:1076-82.
181. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Mickielewicz A, Czlonkowska A, Mendel T, et al. Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke. Clin Appl Thromb Hemost 2001;7:346-50.
182. Hagstrom JN, Walter J, Bluebond-Langner R, Amatniek 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.
183. 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 1691 A mutation. J Child Neurol 2001;16:294-5.
184. Barreirinho S, Ferro A, Santos M, Costa E, Pinto-Basto J, Sousa A, et al. Inherited and acquired risk factors and their combined effects in pediatric stroke. Pediatr Neurol 2003;28:134-8.
185. Miller SP, Wu YW, Lee J, Lammer EJ, Iovannisci DM, Glidden DV, et al. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls. Stroke 2006;37:2678-83.

186. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Pieroni G, Torres AF, Mardaraz C, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation in children with cerebral thromboembolism. Am J Hematol 2003;73:81-6.

9. POPIS KRATICA

Kratica	Značenje
ACE	angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*)
ADP	adenozin difosfat (engl. *adenosine diphosphate*)
apo E	apolipoprotein E
AT	antitrombin
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
BSA	goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)
CADASIL	engl. *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infartcs and leucoencephalopathy*
cDNA	komplementarna doksiribonukleinska kiselina
CI	raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
CRP	C reaktivni protein
CVI	moždani udar, cerebrovaskularni inzult (engl. *cerebrovascular insult*)
iCVI	ishemijski moždani udar
CVP	cerebrovaskularni poremećaj
DIK	diseminirana intravaskularna koagulacija
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (engl. *deoxynucleotide triphosphate*)
EGF	epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)
FII G2010A	točkasta mutacija gena za protrombin na položaju 20210
FVL G1691A	točkasta mutacija gena za FV na položaju 1691
GP	glikoprotein
HPA	ljudski trombocitni antigeni (engl. *human platelet alloantigen*)
HRR	odnos omjera rizika (engl. *hazard rate ratios*)
ICD	međunarodna klasifikacija bolesti (engl. *international classification diseases*)
kb	kilobaza
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)
MELAS	engl. *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke*

Kratica	**Značenje**
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)
OR	omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*)
PAI	inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor*)
pb	parovi baza
PC	protein C
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
PCR-RFLP	lančana reakcija polimeraze s određivanjem polimorfizma duljine restrikcijskih odsječaka (engl. *polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism*)
PCR-SSP	lančana reakcija polimeraze s ishodnicama specifičnog slijeda (engl. *polymerase chain reaction with sequence specific primer*)
PS	protein S
PSEL	P-selektin
PSGL-1	P-selektin glikoprotein ligand-1
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
RR	relativni rizik (engl. *relative risk*)
SNP	pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (engl. *single nucleotide polymorphisms*)
TF	tkivni faktor (engl. *tissue factor*)
TIA	prolazni ishemijski napad (engl. *transient ischemic attack*)
TOAST	engl. *Trial of Org 10172 Acute Stroke Treatment*
VLA	vrlo kasni antigen (engl. *very late antigen*)
VNTR	varijabilni broj ponavljajućih nizova (engl. *variable number of tandem repeats*)
VWF	von Willebrandov faktor
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

10. SAŽETAK

Cerebrovaskularni poremećaji (CVP) su značajan medicinski problem u dječjoj i odrasloj dobi. Moždani udar (CVI) jedan je od vodećih uzroka smrtnosti, u odraslih je na trećem mjestu a u djece je među deset najčešćih. Poznati su brojni čimbenici rizika za nastanak CVI-a, a u posljednje vrijeme sve veću važnost dobiva i genetička komponenta. Polimorfizmi gena za HPA, gena za PSEL, kao i mutacije FV G1691A i FII G20210A su uključeni u različite faze evolucije aterotrombotične bolesti. Cilj istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u učestalostima polimorfizama gena za HPA, gena za PSEL, mutacija FV G1691A i FII G20210A u bolesnika s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu, te utvrditi eventualnu povezanost navedenih polimorfizama s nastankom bolesti.

Ovo istraživanje je obuhvatilo skupinu 300 bolesnika s CVP-om (ishemijski-iCVI, TIA), od toga 100 djece i 200 odraslih te kontrolnu skupinu od ukupno 200 ispitanika (100 djece, 100 odraslih). Za sve odrasle ispitanike prikupljeni su podaci o standardnim čimbenicima rizika (obiteljskoj anamnezi, hipertenziji, šećernoj bolesti, hiperkolesterolemiji, hipertrigliceridemiji, srčanoj bolesti, pušenju, alkoholizmu, pretilosti). Metodom PCR-SSP-a i PCR-om u stvarnom vremenu genotipizirani su polimorfizmi HPA (-1, -2, -3 i -5), metodom PCR-SSP-a polimorfizmi PSEL-a (S290N, N562D, V599L, T715P) a mutacije FV G1691A i FII G20210A metodom PCR-RFLP-a. Budući da između djece i odraslih postoje razlike u hemostazi, učestalosti tromboze i uključenosti pojedinih čimbenika rizika, ove dvije skupine obrađene su odvojeno.

Prema dobivenim rezultatima alelne učestalosti HPA u hrvatskoj populaciji slične su podacima za europsku populaciju. U odraslih s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu prisutna je značajno učestalija pozitivna obiteljska anamneza, hipertenzija, šećerna bolest, alkoholizam i alel HPA-2b. Multivarijantnom regresijskom analizom potvrđen je značaj spomenutih standardnih čimbenika rizika za razvoj CVP-a, ali ne i zaštitna uloga alela HPA-2b. U odraslih bolesnika s CVP-om je nađena povezanost kombinacije standardnih čimbenika rizika s genotipom u odnosu na bolesnike bez čimbenika rizika; u alkoholičara dobivena je povezanost s genotipom 715TP, u pretilih i sa srčanim poteškoćama s genotipom 562DD, a u pušača s HPA-1 (a/b + b/b). Također, u hipertenzivnih bolesnika s CVP-om u odnosu na hipertenzivne kontrolne ispitanike dobivena je povezanost s genotipom HPA-1 (a/b + b/b).

Dobiveni rezultati ispitivanih polimorfizama u dječjoj dobi ukazuju na značajno učestaliji genotip HPA-5a/b i alel HPA-5b u oboljelih od TIA-e u odnosu na iCVI, a u djece s CVP-om koja su nositelji genotipa GA ili s alelom A FV G1691A dokazana je 5 puta veća vjerojatnost oboljenja od CVP-a. Jedina razlika u ispitivanim polimorfizmima između djece i odraslih dobivena je za FV G1691A, odnosno, genotip GA i alel A FV G1691A značajno su učestaliji u djece u odnosu na odrasle s CVP-om, kao i s iCVI-om.

U zaključku, pomoć u predviđanju CVP-a u odraslih imaju standardni čimbenici rizika (anamneza, hipertenzija, šećerna bolest, alkoholizam) a u djece mutacija FV G1691A.

Ključne riječi: CVP, HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A

11. SUMMARY

Cerebrovascular disorders (CVD) are a significant medical problem in childhood and adulthood. Stroke (CVI) is one of the leading causes of death, the third most common death cause in adults and among top ten most common causes in children. There are many known risk factors for CVI and lately the genetic component is gaining more and more importance. HPA gene polymorphisms, PSEL gene polymorphisms, as well as FV G1691A and FII G20210A mutations are involved in different stages of development of atherotrombotic disease. The aim of this research was to examine whether there is a difference in the frequency of polymorphisms of HPA gene, PSEL gene, mutations of FV G1691A and FII G20210A in patients with CVD as compared to the control group, and to determine the possible association of these polymorphisms with the development of the disease.

This research comprised a group of 300 patients with CVD (ischemic-iCVI, TIA), 100 of which were children and 200 adults as well as a control group of 200 subjects (100 children, 100 adults). Data on standard risk factors was collected for all adult subjects (family history, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, heart disease, smoking, alcoholism, obesity). HPA polymorphisms (-1, -2, -3 and -5) were genotyped using a PCR-SSP and real-time PCR method, PSEL polymorphisms (S290N, N562D, V599L, T715P) using a PCR-SSP method and FV G1691A and FII G20210A mutations using a PCR-RFLP method. Because of the differences between children and adults in hemostasis, thrombosis rate and involvement of individual risk factors, these two groups were processed separately.

According to the results, data for allelic frequencies of HPA in the Croatian population is similar to the data for European population. In adults with CVD as compared to the control group, a positive family history, hypertension, diabetes, alcoholism and HPA-2b allele were present more often. Multivariate regression analysis confirmed the significance of these standard risk factors for the development of CVD, but not the protective role of HPA-2b allele. In adult patients with CVD a correlation of the combination of standard risk factors with genotype was found in comparison with patients without risk factors; in alcoholics a correlation with the 715TP genotype was found, in obese patients and patients with heart problems a correlation with the 562DD genotype, and in smokers a correlation with HPA-1 (a/b + b/b). In addition, a correlation with HPA-1 (a/b + b/b) genotype was found in hypertensive patients with CVD as compared to the control hypertensive subjects.

The obtained results of the examined polymorphisms in children indicate a significantly more frequent HPA-5a/b genotype and HPA-5b allele in patients with TIA as compared to iCVI. In children with CVD, which are carriers of GA genotype or A allele FV G1691A, a 5 times higher likelihood of CVD disease was proven. The only difference in the examined polymorphisms between children and adults was obtained for the FV G1691A, i.e., GA genotype and A allele FV G1691A were significantly more frequent in children than in adults with CVD, as well as iCVI.

In conclusion, help with predicting CVD in adults is provided by standard risk factors (family history, hypertension, diabetes, alcoholism), and in children by the FV G1691A mutation.

Key words: CVD, HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A

12. ŽIVOTOPIS

Marina Pavić, mag. med. biokemije, rođena je 13. 03. 1967. godine u Požegi gdje je završila osnovnu školu, a srednju školu u Zagrebu. Studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1986. godine. Diplomski rad pod naslovom „*Kinetički primarni deuterijski izotopni efekti u reakciji formaldehida i nitrozo spojeva"* pod mentorstvom dr. Stanka Uršića, brani u travnju 1991. godine. Poslijediplomski studij „Medicinske biokemije" upisuje 1991. godine na Farmaceutsko biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pripravnički staž obavlja 1991.-1992. godine u Kliničkoj bolnici "Merkur". Od 1993. godine do danas je u stalnom radnom odnosu u Klinici za traumatologiju, KBC „Sestre milosrdnice". Specijalistički ispit iz medicinske biokemije polaže 2001. godine. Sada radi na poslovima pročelnika Kliničke jedinice za medicinsku biokemiju u traumatologiji i ortopediji, Kliničkog zavoda za kemiju. U koautorstvu s drugim autorima objavila je 6 stručnih ili znanstvenih radova, od čega su dva citirana u bazi podataka Current Contents, a sudjelovala je i na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova s posterskim radovima. Član je Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

13. POPIS RADOVA

Radovi indeksirani u CC časopisima:

1. 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, or migraine. Pediatrics 2009;123:e653-60.
2. **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.

Radovi u ostalim časopisima:

1. Banovic M, Godec D, **Pavic M**, Balija M, Zadro M, Jernej B. A simple method for individual monitoring of rat platelet aggregation over time. U: Bulat M. i dr. ur., Pharmacological Communications. Zagreb, 1993:186-8.
2. **Pavić M**, Milevoj L. Praćenje broja trombocita u bolesnika s opeklinama. Biochemia Medica 2007;17:212-9.
3. **Pavic M**, Bronic A, Milevoj Kopcinovic L. Procalcitonin in systemic and localized bacterial infection. Biochemia Medica 2010;20:236-41.
4. Milevoj Kopcinovic L**, Pavic M**. Platelet satellitism in a trauma patient. Biochemia Medica 2012;22:130-4.

Popis kongresnih priopćenja:

1. Coen D, **Pavic M**, Zadro M, Zoran M. Clinical relevance of continuous monitoring of antithrombin III levels in trauma patients. Acta Anaest Scand 1996; 40 Supplement 109:248.
2. Coen D, **Pavic M**, Zadro M, Zoran M. Antithrombin levels in severe trauma patients. Thromb Haemost 1997; Supplement:435.
3. Bronić A, Coen D, **Pavić M**, Zoran M. Određivanje koncentracije D-dimera u traumatiziranih bolesnika. Biochem Med 1999;9:60-1.

4. Rogic D, Cvoriscec D, **Pavic M**, Ivandic M. Urine protein expert system applied for proteinuria interpretation in the population of an endemic nephropathy village in Croatia - a preliminary study. EMBODY 2000;96.
5. Bronić A, Zoran M, Coen D, **Pavić M**, Car D. Vrijednost određivanja koncentracije D-dimera u bolesnika s prijelomima bedrene kosti i ozljedama kuka starije životne dobi. Zbornik radova prvog hrvatskog traumatolološkog kongresa 2001;P13.
6. Bronic A, Coen D, **Pavic M**. Follow up of D-dimer values in patients with hip injuries. Clin Chem Lab Med 2002; Special Supplement: abstract T-EV-011,S197.
7. **Pavic M**, Milevoj L, Hreljac M, Bronic A. Anion gap and hypoalbuminemia. Clin Chem Lab Med 2003;41(Spec Suppl):S459.
8. Car D, Loncar Z, Tomicic H, Babic S, **Pavic M**. Hypercoagulability in burn patients. Bergen, Norway 2003. Abstract book.
9. **Pavić M**, Milevoj L, Hreljac M, Bronić A. Anionski procijep i hipoalbuminemija u bolesnika jedinice intenzivnog liječenja. Biochem Med 2003:13(Suppl 1-2);131.
10. **Pavic M**, Milevoj D, Galez D, Coen Herak D. Extracellular antioxidants in patients with burn trauma. Clin Chim Acta 2005;355 (Suppl. 1):WP1.12.
11. **Pavić M**, Milevoj L, Galez D, Coen Herak D. Određivanje vanstaničnih antioksidansa kod pacijenata s opeklinama. Knjiga sažetaka 2. Hrvatskog traumatološkog kongresa, Zagreb, 3-5.11.2005;146.
12. Coen Herak D, **Pavic M**, Radic Antolic M, Lenicek-Krleza J, Milos M, Basnec Brkic A, Dodig S, Duranovic V, Zadro R. Frequency of human platelet antigen genotypes in children with arterial ischemic stroke. Pathophysiol Haemost Thromb 2006;35:(No. 1-2) A40.
13. **Pavić M**, Milevoj L, Galez D, Bronić A. Praćenje broja trombocita u bolesnika s opeklinama. Biochem Med 2006;16(Suppl 1):S102.
14. Coen Herak D, **Pavić M**, Radić Antolić M, Leničekk-Krleža J, Bašnec Brkić A, Dodig S, Đuranović V, Zadro R. Učestalost genotipova ljudskih trombocitnih antigena u djece s arterijskim ishemijskim moždanim udarom. Biochem Med 2006;16(Suppl 1):S145.
15. Coen Herak D, Radic Antolic M, Lenicek-Krleza J, **Pavic M**, Dodig S, Duranovic V, Zadro R. Inherited prothrombotic risk factors in children with perinatal arterial stroke. Thromb Res 2007;119 (Suppl 1):S102.

16. Zadro R, Coen Herak D, Radic Antolic M, Basnec Brkic A, Lenicek-Krleza J, Duranovic V, **Pavic M**, Dodig S. Inherited prothrombotic risk factors in children with cerebrovascular disorders. J Thromb Haemost 2007;5(Suppl 2):P-W-584.
17. Bartolek D, Munjiza A, **Pavic M**, Tomicic H. Hypotonic polyuria syndrome after electrical burns: a case reports study. Neurologia Croatica 2007;56(Suppl 4):217.
18. Bronic A, Car D, Lenicek Krleza J, **Pavic M**, Milevoj L. D-dimer to fibrinogen ratio in geriatric patients with hip injuries. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2008;36(Suppl 1):P141.
19. **Pavić M**, Bronić A, Milevoj Kopčinović L. Prokalcitonin u sistemskoj i lokalnoj bakterijskoj infekciji. Biochem Med 2009;19 (Suppl 1):S173.
20. Bronic A, Car D, **Pavic M.** Different D-dimer cut off values in hip injury patients with high VTE risk. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2010;37(Suppl 1): P433.
21. Herak DC, **Pavic M**, Antolic MR, Krleza JL, Topic RZ, Dodig S, Zadro R.Association of P-selectin gene polymorphisms with arterial ischemic stroke in children. J Thromb Haemost 2011;9(Suppl 2): P-TU-348.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

POLIMORFIZMI GENA ZA TROMBOCITNE ANTIGENE I P-SELEKTIN U CEREBROVASKULARNIM POREMEĆAJIMA DJEČJE I ODRASLE DOBI

Klinički zavod za kemiju, Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“, Zagreb

Cerebrovaskularni poremećaji (CVP) su značajan medicinski problem u djece i odraslih. Cilj istraživanja bio je ispitati razlike u učestalostima polimorfizama gena za HPA (-1, -2, -3, -5), PSEL (S290N, N562D, V599L, T715P), mutacija FV G1691A (FVL) i FII G20210A u bolesnika s CVP-om u odnosu na kontrolnu skupinu, te utvrditi njihovu povezanost s bolešću.
Ukupno je ispitano 300 bolesnika s CVP-om (ishemijski moždani udar-iCVI, TIA) (djece-100, odraslih-200) i 200 ispitanika kontrolne skupine (djece-100, odraslih-100), uz podatke za odrasle o standardnim čimbenicima rizika. Polimorfizmi HPA genotipizirani su PCR-SSP-om i PCR-om u stvarnom vremenu, PSEL-a PCR-SSP-om, a FVL i FII G20210A PCR-RFLP-om.
U Hrvata alelne učestalosti HPA odgovaraju podacima za Europljane. Multivarijantnom regresijskom analizom u odraslih potvrđena je povezanost anamneze, hipertenzije, šećerne bolesti i alkoholizma s CVP-om, ali ne s alelom HPA-2b. U djece značajno je učestaliji genotip HPA-5a/b i alel HPA-5b u oboljelih od TIA-e u odnosu na iCVI, a u djece s genotipom GA ili s alelom A FVL, 5 puta je veća vjerojatnost oboljenja od CVP-a. Značajno učestaliji genotip GA i alel A FVL dobiven je u djece u odnosu na odrasle s CVP-om, te iCVI-om. Pomoć u predviđanju CVP-a u odraslih imaju anamneza, hipertenzija, šećerna bolest i alkoholizam, a u djece FVL.

Rad sadrži: 133 stranica, 16 slika, 52 tablice, 186 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CVP, HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A

Mentor: dr. sc. Renata Zadro, profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: dr. sc. Mirna Sučić, profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
dr. sc. Renata Zadro, profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
dr. sc. Mario Štefanović, znanstv. sur., Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“, Zagreb

Datum prihvaćanja rada: 23. svibnja 2012.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

PLATELET ANTIGEN AND P-SELECTIN GENE POLYMORPHISMS IN CEREBROVASCULAR DISORDERS IN CHILDREN AND ADULTS

University Department of Chemistry, **Medical School University Hospital Sestre Milosrdnice, Zagreb**

Cerebrovascular disorders (CVD) are a significant medical problem in children and adults. The aim of this research was to examine differences in the frequency of gene polymorphisms for HPA (-1, -2, -3, -5), PSEL (S290N, N562D, V599L, T715P), FV G1691A (FVL) and FII G20210A mutations in patients with CVD as compared to the control group, and to determine their correlation with the disease.
The research included 300 patients with CVD (ischemic stroke-iCVI, TIA) (children-100, adults-200), 200 control subjects (children-100, adult-100), as well as data for standard risk factors for adults. HPA polymorphisms were genotyped using PCR-SSP and real-time PCR, PSEL by PCR-SSP, and the FVL and FII G20210A by PCR-RFLP.
The allelic frequencies of HPA in Croats correspond to the data for Europeans. Multivariate regression analysis in adults confirmed the correlation between family history, hypertension, diabetes and alcoholism with CVD, but not with the HPA-2b allele. In children, HPA-5a/b genotype and HPA-5b allele is significantly more frequent in patients with TIA as compared to iCVI, and in children with GA genotype or with A allele FVL, there is a 5 times higher likelihood of CVD disease. Significantly more frequent GA genotype and A allele FVL was obtained in children than in adults with CVD and iCVI. Help in predicting CVD in adults is provided by family history, hypertension, diabetes and alcoholism, and in children by FVL.

Thesis includes: 133 pages, 16 figures, 52 tables, 186 references, original is in Croatian language.

Key words: CVD, HPA, PSEL, FV G1691A, FII G20210A

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

Reviewers: Mirna Sučić, Ph.D., Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Renata Zadro, Ph.D., Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Mario Štefanović, Ph.D., Senior Scientist, Medical School University Hospital Sestre Milosrdnice, Zagreb

Thesis accepted: May 23, 2012.

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