

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonela Bazina

**Genetski biljezi ateroskleroze u
cerebrovaskularnoj bolesti**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonela Bazina

**Genetski biljezi ateroskleroze u
cerebrovaskularnoj bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Zavodu za intenzivnu medicinu Klinike za neurologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb u okviru znanstvenog projekta “Funkcijska genomika i proteomika rizičnih čimbenika ateroskleroze” Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (šifra projekta: 108-1080134-0136) pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Jadranke Sertić.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Jadranka Sertić

Sadržaj

SADRŽAJ	1
POPIS UPOTRIJEBLJENIH KRATICA	1
1. UVOD.....	1
1.1. DEFINICIJA - CEREBROVASKULARNA BOLEST	1
1.2. KLASIFIKACIJE ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA (IMU):	4
1.3. EPIDEMIOLOGIJA MOŽDANOG UDARA	5
1.4. RIZIČNI ČIMBENICI RAZVOJA MOŽDANOG UDARA	6
1.4.1. <i>Promjenjivi rizični čimbenici</i>	6
1.4.1.1. Hipertenzija	6
1.4.1.2. Hiperkolesterolemija.....	7
1.4.1.3. Diabetes melitus	7
1.4.1.4. Atrijska fibrilacija.....	8
1.4.1.5. Debljina	9
1.4.1.6. Pušenje.....	10
1.4.2. <i>Nepromjenjivi rizični čimbenici</i>	10
1.4.2.1. Dob i spol	10
1.4.2.2. Rasa i etnička pripadnost	11
1.4.2.3. Nasljedni	11
1.5. KLINIČKA SLIKA.....	12
1.6. ATEROSKLEROZA	12
1.7. GENETIČKA ISTRAŽIVANJA CEREBROVASKULARNIH BOLESTI	14
1.7.1. <i>Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS)</i>	17
1.8. GENI KANDIDATI ODOBRENI ZA OVO ISTRAŽIVANJE.....	18
1.8.1. <i>Gen PPARγ</i>	18
1.8.2. <i>Gen IL-6</i>	20
1.8.3. <i>Gen sustava renin-angiotenzin, ACE</i>	22
1.8.4. <i>Gen APOE</i>	23
1.8.5. <i>Gen MTHFR</i>	24
2. HIPOTEZA	26
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
4. ISPITANICI I METODE.....	27
4.1. ISPITANICI	27
4.2. METODE.....	28
4.2.1. <i>Analitički uzorci</i>	28
4.2.2. <i>Biokemijske analize</i>	28
4.2.3. <i>Analiza DNA</i>	29
4.2.3.1. <i>Izdvajanje DNA metodom isoljavanja</i>	31

4.2.3.2. Genotipizacija.....	31
4. 3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	51
5. REZULTATI	53
5.1. OPIS UZORKA PREMA SOCIODEMOGRAFSKIM, KLINIČKIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA.....	53
5.2. MULTIVARIJATNA ANALIZA POVEZANOSTI NEGENTSKIH VARIJABLI S MU-OM	56
5.3. MULTIVARIJATNA ANALIZA POVEZANOSTI GENOTIPOVA S MU-OM	58
5.4. MEĐUSOBNA POVEZANOST POJEDINIH GENOTIPOVA U SKUPINI S MU-OM I U KONTROLNOJ SKUPINI	61
5.4.1. <i>PPAR-γ Pro12Ala</i>	61
5.4.2. <i>IL-6 -174G>C</i>	63
5.5. SVI BIOKEMIJSKI, KLINIČKI PARAMETRI I GENOTIPOVI KAO PREDIKTORI MU-A	65
5.6. POVEZANOST <i>PPAR-γ</i> GENOTIPOVA S KLINIČKIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA.....	66
5.7. POVEZANOST <i>IL-6 -174G>C</i> GENOTIPOVA S KLINIČKIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETARIMA	71
5.7.1. <i>Povezanost pojedinih genotipova IL-6 -174G>C i kliničkih i biokemijskih parametara</i>	78
5.7.1.1. Genotip <i>IL6 -174GG</i>	78
5.7.1.2. Genotip <i>IL6 -174CC</i>	84
5.7.1.3. Genotip <i>IL-6 -174GC</i>	90
5.8. POVEZANOST <i>ACE I/D</i> GENOTIPOVA I KLINIČKIH I BIOKEMIJSKIH PARAMETARA.....	96
5.8.1. <i>Povezanost pojedinog ACE genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima</i>	102
5.8.1.1. Genotip <i>ACE II</i>	102
5.8.1.2. Genotip <i>ACE ID</i>	108
5.8.1.3. Genotip <i>ACE DD</i>	114
5.9. POVEZANOST <i>MTHFR C677T</i> GENOTIPOVA S KLINIČKIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA	119
5.9.1. <i>Povezanost pojedinog MTHFR genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima</i>	126
5.9.1.1. Genotip <i>MTHFR CC</i>	126
5.9.1.2. Genotip <i>MTHFR C677T</i>	132
5.9.1.3. Genotip <i>MTHFR TT</i>	138
5.10. POVEZANOST <i>APOE E2/E3/E4</i> GENOTIPOVA S KLINIČKIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA	144
6. RASPRAVA	150
7. ZAKLJUČCI	158
8. SAŽETAK	160
9. SUMMARY.....	161
10. LITERATURA	162
11. ŽIVOTOPIS	181
12. BIBLIOGRAFIJA	182
12.1. ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA	182
12.2. SAŽECI SA ZNANSTVENIH SKUPOVA	183
12.3. TEKSTOVI U UDŽBENICIMA I PRIRUČNICIMA	186

POPIS UPOTRIJEBLJENIH KRATICA

ADIPOQ - gen za adiponektin

ACE - angiotenzin konvertirajući enzim

APOB - apolipoprotein B

APOE - apolipoprotein E

AT1R - angiotenzin II tip 1 receptor

BMI - (engl. Body Mass Index) – indeks tjelesne mase

CADASIL - (engl. Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) – cerebralna autosomno dominantna arteriopatija s subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom

CBF - (engl. Cerebral blood flow) – cerebralni protok

CVD - (engl. Cerebrovascular disease) – cerebrovaskularne bolesti

CT - (engl. Computed Tomography) – kompjutorizirana tomografija

DBP - (engl. Diastolic blood pressure) – dijastolički krvni tlak

GWAS - (engl. Genom-Wide Association Study) – cjelogenomske studije povezanosti

HcT - hematokrit

HDL - (engl. High-Density Lipoprotein) – lipoprotein visoke gustoće

ICAM-1 - (engl. Intercellular adhesion molecule) –intracelularna adhezijska molekula

ICH - (engl. Intracerebral hemorrhage) – intracerebralna hemoragija

IMT - (engl. Intimal medial thickness) – zadebljenje intimalnog zida

IMU - ishemijski moždani udar

IL-6 - interleukin 6

KVB - kardiovaskularne bolesti

LACS - lakunarni cirkulacijski sindrom

LDL - (engl. Low-Density Lipoprotein) – lipoprotein niske gustoće

LPL - lipoprotein lipaza

MTHFR - (engl. Methylene tetrahydrofolate reductase) – metilen tetrahidrofolat reduktaza

MELAS - (engl. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) – mitohondrijska encefalomijopatija, laktična acidoza i epizode poput moždanog udara

mRS - (engl. modified Rankin scale) – modificirana Rankinova skala

OCSP - (engl. The Oxford Community Stroke Project/ Bamford or Oxford) – Oxfordska klasifikacija moždanog udara

OS - opseg struka

PACS - parcijalni anteriorni cirkulacijski sindrom

PCR - (engl. Polymerase Chain Reaction) – lančana reakcija polimerazom

PCR-RFLP - (engl. Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphisms) – lančana reakcija polimerazom – polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka

POCS - posteriorni cirkulacijski sindrom

PPAR γ - (engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) – receptor za aktivator proliferacije peroksisoma γ

PUFA - (engl. Polyunsaturated Fatty Acids) – polinezasićene masne kiseline

RAS - renin angiotenzin sustav

SAH - (engl. Subarachnoid hemorrhage) – subarahnoidalna hemoragija

SBP - (engl. Systolic blood pressure) – sistolički krvni tlak

SCD - (engl. Sickle-cell disease) – anemija srpastih stanica

SNP - (engl. Single Nucleotide Polymorphism) – polimorfizam jednog nukleotida

SŽS - središnji živčani sustav

TACS - totalni anteriorni cirkulacijski sindrom

TIA - tranzitorna ishemijska ataka

TNF - α - čimbenik nekroze tumora α

TOAST - Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, classification – TOAST klasifikacija

T2DM - (engl. Type 2 Diabetes Mellitus) – šećerna bolest tip II

TZD - tiazolidindion

VCAM-1 - (engl. Vascular cell adhesion molecule) – vaskularna adhezijska molekula

VLDL - (engl. Very Low Density Lipoprotein) – lipoprotein vrlo niske gustoće

WHO - (engl. World Health Organization) – Svjetska zdravstvena organizacija

WHR - (engl. Waist to Hip ratio) – omjer struk/ bokovi

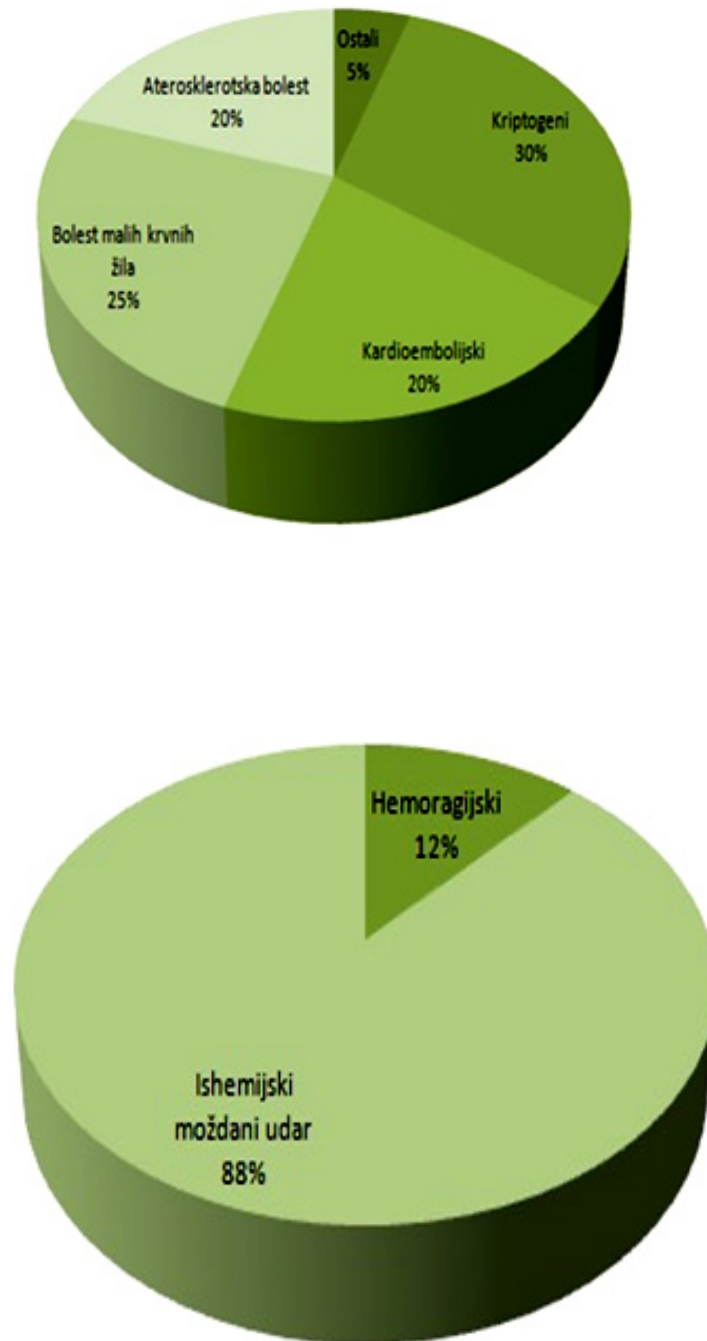
1. Uvod

Dosadašnja istraživanja o ulozi nasljednih poremećaja u razvoju cerebrovaskularnih bolesti i ateroskleroze otkrila su mnoštvo kliničkih stanja i rizičnih faktora koji, ne samo genskom ekspresijom već interakcijom s čimbenicima okoliša, utječu na porast broja slučajeva moždanog udara (1). Tradicionalno, najveći klinički pokušaj, tj. nastojanje u prevenciji moždanog udara, direktno je usmjeren prema modifikaciji glavnih rizičnih čimbenika ateroskleroze, uključujući simptomatsku terapiju hipertenzije, dijabetesa, hiperkolesterolemije i pušenja (2,3). Premda je prepoznata važnost naslijeđa u razvoju cerebrovaskularnih bolesti, uloga pojedinih gena te njihovih međusobnih interakcija uz različite čimbenike okoliša još u potpunosti nije jasna pa je to područje od velikog interesa kliničara i znanstvenika širom svijeta.

1.1. Definicija - Cerebrovaskularna bolest

Cerebrovaskularna bolest (engl. Cerebrovascular Disease, CVD) je zajednički naziv za svako oštećenje moždanog tkiva uzrokovano smetnjama moždane cirkulacije odnosno hipoperfuzije. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organization, WHO) moždani udar (MU) je naglo nastali žarišni ili, rjeđe, globalni gubitak moždane funkcije/funkcija sa simptomima koji traju duže od 24 sata ili dovode do smrti, a može se objasniti samo poremećajem moždane cirkulacije odnosno perfuzije. Nastaje zbog ishemije (nedostatak protoka krvi) ili krvarenja (istjecanja krvi) pa se prema mehanizmu nastanka dijeli na infarkt mozga (ishemijski moždani udar, IMU), intracerebralno krvarenje (intracerebralna hemoragija, ICH) i subarahnoidalno krvarenje (subarahnoidal hemoragija, SAH). Prema trajanju simptoma, ishemijski moždani udar dijeli se na tranzitornu ishemijsku ataku (TIA), moždani udar u razvoju i završeni moždani udar (4). U osnovi, moždani udar možemo podijeliti na ishemijski i hemoragijski. Ishemijski moždani udar je daleko češći te obuhvaća otprilike 88% svih moždanih udara. 12% moždanih udara su hemoragijski, odnosno u oko 9% slučajeva radi se o intracerebralnim hematomima nastalima rupturom (pucanjem) intrakranijske krvne žile uslijed već postojećih degenerativnih promjena stijenke žile uz hipertenziju, dok oko 3% hemoragijskih moždanih udara čine subarahnoidalna krvarenja uzrokovana rupturom aneurizme. (5-7).

Ishemijski moždani udar



SLIKA 1. UDJELI POJEDINIHR VRTA MOŽDANOG UDARA

Moždana cirkulacija dijeli se na prednju (karotidnu) i stražnju (vertebrobazilarnu). One se spajaju preko *circulus arteriosus Willisii* pomoću prednjih i stražnjih komunikantnih arterija i ujediniuju opskrbu mozga. Normalna perfuzija iznosi otprilike 60 mL/100 g mozga/min. Neuron i glija stanice kao funkcijske jedinice mozga zahtijevaju konstantan moždani protok te opskrbu energijom (glukozom) i kisikom. Prvi znakovi ishemije javljaju se kada perfuzija padne ispod 22 mL/100 g/min, pri čemu neuroni gube svoju funkciju i strukturno se oštećuju. Mozak se protiv poremećaja perfuzije bori autoregulacijom, koja omogućuje stalan protok unatoč oscilacijama sistemnog krvnog tlaka. Ona je učinkovita sve do pada tlaka ispod 70 mmHg. Kada je autoregulacija oštećena, cerebralna perfuzija prvenstveno ovisi o razlici sistemnog i intrakranijalnog tlaka. Akutni ishemijski moždani udar posljedica je okluzije krvne žile koja nastaje uslijed trombotičkog, embolijskog ili tromboembolijskog incidenta. Nastala ishemija dovest će do stanične hipoksije, gubitka staničnog ATP-a, pada energetske kapaciteta stanice, zbog čega dolazi do nemogućnosti održavanja, a zatim i gubitka ionskog gradijenta stanične membrane. Na koncu, uslijed ulaska iona natrija i kalcija u stanicu, dolazi do depolarizacije stanice, ulaska vode, što dovodi do smrti stanice odnosno razvoja citotoksičnog edema. Unutar 4-6 sati od razvoja ishemije, dolazi do oštećenja krvno-moždane barijere i razvoja vazogenog edema. Vazogeni edem unutar 3-5 dana dovodi do porasta intrakranijskog tlaka uslijed edema mozga, čime dolazi do pogoršanja kliničke slike, a njegova postupna regresija očekuje se unutar iduća 2-3 tjedna. Područja mozga s protokom (CBF) nižim od 10 mL/100 mg tkiva/min (središnje područje infarkta) su područja u kojima moždane stanice umiru unutar nekoliko minuta od nastupa okluzije. Zahvaljujući brzim fibrinolitičkim procesima unutar krvne žile koji pospješuju rekanalizaciju žile, kao i postojanju kolateralne cirkulacije u rubnim područjima oštećenog tkiva, dio moždanog tkiva (a ponekad i cijelo područje) uspijeva preživjeti i nekoliko sati (tzv. penumbra – odnosno područje gdje je CBF >25 mL/100mg/min). Penumbra predstavlja ciljno područje terapijskog djelovanja fibrinolitičkog liječenja. Zahvaljujući navedenim mehanizmima, ukoliko je rekanalizacija okludirane krvne žile dovoljno brza i učinkovita, klinički se deficit može manifestirati samo kao tranzitorna ishemijska ataka, s potpunim povlačenjem neurološke simptomatologije, te bez morfoloških oštećenja moždanog tkiva na neuroradiološkim slikovnim metodama, (6-7).

1.2. Klasifikacije ishemijskog moždanog udara (IMU):

Postoji nekoliko klasifikacija IMU od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke. Najčešće korištene su:

Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, TOAST classification: Temeljem anatomskih, morfoloških i etiopatogenetskih čimbenika, IMU možemo kategorizirati u nekoliko osnovnih podtipova (5):

1. Infarkt opskrbnih područja velikih arterija – ishemija moždanog tkiva kao posljedica aterosklerotskog procesa, tromboze i „in situ” okluzije velikih krvnih žila vrata (karotidnog i vertebrobazilarnog sliva), kao i intrakranijskih krvnih žila, primarno unutrašnje karotidne arterije. Ta vrsta moždanog udara rezultira teškom kliničkom slikom, visokim mortalitetom i invaliditetom.
2. Infarkt u području malih krvnih žila, takozvani „lakunarni” moždani udar koji je učestalo i subklinički.
3. Infarkt posljedično emboliji intrakranijskih krvnih žila – kada se najčešće radi o kardioemboličkom moždanom udaru. Taj oblik moždanog udara nalazi se u čak 20% bolesnika s ishemijskim moždanim udarom te se smatra da ima najvišu smrtnost unutar 30 dana od nastanka.
4. Ostali definirani uzroci (disekcija arterija, fibromuskularna displazija, vaskulitis, Moyamoya bolest, fokalna cerebralna arteriopatija)
5. Nepoznati uzroci – “Cryptogenic stroke”

The Oxford Community Stroke Project / Bamford or Oxford, (OCSP) classification prvenstveno temeljena na inicijalnim prezenirajućim neurološkim simptomima te daju informaciju o anatomskoj i vaskularnoj lokalizaciji lezije, etiologiji i prognozi:

1. TACS: totalni anteriorni cirkulacijski sindrom, u oko 20% slučajeva;
2. PACS: parcijalni anteriorni cirkulacijski sindrom, u oko 30% slučajeva;
3. LACS : lakunarni cirkulacijski sindrom, u oko 25% slučajeva;
4. POCS: posteriorni cirkulacijski sindrom, u oko 25% slučajeva.

1.3. Epidemiologija moždanog udara

Moždani udar je na prvom mjestu uzroka invaliditeta u svijetu i na drugom mjestu, u ovom trenutku, uzroka smrtnosti u svijetu. Svjedoci smo činjenice da moždani udar više ne zahvaća samo starije dobne skupine; zadnjih godina od moždanog udara sve više obolijevaju bolesnici u najproduktivnijim godinama života, što ga čini velikim kako zdravstvenim tako i ekonomskim problemom. Epidemiološki podaci iz zapadnih zemalja pokazuju smanjivanje morbiditeta i mortaliteta od moždanog udara u zadnjim desetljećima prošloga stoljeća, što je izravna posljedica preventivnih aktivnosti. Nasuprot tome, podaci za Hrvatsku pokazuju porast morbiditeta i mortaliteta od moždanog udara. Sličan nepovoljan trend porasta učestalosti moždanog udara bilježi se i u ostalim zemljama srednje i istočne Europe, kao i u većini zemalja u razvoju, pa se u dolazećim desetljećima predviđa epidemija moždanog udara (8). Gotovo 20% bolesnika s moždanim udarom umire unutar godinu dana od nastupa bolesti. Incidencija moždanog udara razlikuje se i između rasa (najveću incidenciju ima crna rasa, najnižu hispanska – uz napomenu da se kod te etničke skupine češće nalaze lakunarni moždani udari i udari u mlađoj životnoj dobi) i između spolova, gdje muškarci imaju veći rizik za nastup moždanog udara od žena (incidencija kod muškaraca je 62,8 na 100.000 uz smrtnost od 26,3% dok je kod žena incidencija 59 na 100.000 uz smrtnost od 39,2%). Jedna trećina moždanih udara javlja se u dobi mlađoj od 65 godina, iako rizik nastupa bolesti raste s dobi, te 75% moždanih udara nastupa u životnoj dobi višoj od 65 godina. Ukupna smrtnost od svih oblika moždanog udara unutar 30 dana je 28% (za ishemijski moždani udar ona iznosi 19%). Kod preživjelih bolesnika, 31% njih nije se sposobno samostalno brinuti za sebe, 20% ne može samostalno hodati, dok 71% oboljelih imaju poteškoće i mogu samostalno hodati, a 71% ima poteškoće u govoru odnosno nekom od oblika verbalne ekspresije. Osim toga, akutni ishemijski moždani udar vrlo je često povezan i s brojnim somatskim bolestima, prvenstveno znakovima zatajenja srčane funkcije i/ili srčanim aritmijama, ali i komplikacijama gastroenterološkog i urološkog sustava, odnosno metaboličkim i elektrolitskim poremećajima. Nakon moždanog udara trećina se oboljelih oporavi do potpune samostalnosti s lakšim posljedicama, kod trećine oboljelih je posljedica trajna invalidnost i ovisnost o drugima, a trećina pacijenata odmah umire. Svaki je moždani udar zaseban, ovisi o mnogo faktora, počevši od toga koja je moždana hemisfera pogođena, koliko su jaka oštećenja, ali i o općem stanju bolesnika.

1.4. Rizični čimbenici razvoja moždanog udara

Uzroci moždanog udara obuhvaćaju heterogenu grupu etiopatofizioloških čimbenika koji utječu na moždanu cirkulaciju dovodeći ili do morfoloških promjena (obično stijenki) krvnih žila ili do poremećaja moždane autoregulacije. Čimbenici rizika za nastanak moždanog udara se dijele na promjenjive i one na koje se ne može utjecati (na čemu se temelje principi prevencije moždanog udara). U čimbenike na koje ne možemo utjecati ubrajamo dob bolesnika, rasu, spol, etničku pripadnost, anamnezu migrenskih glavobolja, anemiju srpastih stanica fibromuskularnu displaziju, nasljednost. Čimbenici na koje možemo utjecati (pa ih je potrebno u mjerama primarne prevencije liječiti i pratiti) su hipertenzija, hiperlipidemija, šećerna bolest, kardiološke bolesti (fibrilacija atriya, valvularne bolesti, mitralna stenoza i strukturalne prirodene srčane anomalije), tranzitorna ishemijska ataka u anamnezi, stenoza karotidne arterije, hiperhomocisteinemija, uporaba hormonalne terapije, prvenstveno oralnih kontraceptiva, životne navike poput pušenja, ekscesivnog uživanja alkoholnih napitaka i/ili droga, povećane tjelesne težine, fizičke neaktivnosti (Slika 2). Smatra se da je visoki krvni tlak najvažniji promjenjivi čimbenik rizika za razvoj moždanog udara (9).

1.4.1. Promjenjivi rizični čimbenici

1.4.1.1. Hipertenzija

Jedan je od najvažnijih promjenjivih čimbenika za razvoj ateroskleroze i cerebrovaskularnih bolesti, na koje je moguće djelovati. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije hipertenzija se definira kao vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka iznad 140 mmHg, dijastoličkog iznad 90 mmHg. Dijeli se na primarnu (90-95% slučajeva), koja je posljedica genetskih i okolišnih čimbenika, te sekundarnu koja čini 2-10% slučajeva, a rezultat je vaskularnih, endokrinih i/ili renalnih poremećaja. Incidencija moždanog udara raste proporcionalno sa sistoličkim i dijastoličkim krvnim tlakom. Epidemiološke studije koje su analizirale skupine tretiranih i netretiranih pacijenata pokazale su porast incidencije mortaliteta od cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti s porastom vrijednosti arterijskog tlaka iznad 110/75 mmHg (10-12). Učestalost moždanog udara raste za 46% na svakih 7,5 mm Hg porasta dijastoličkog tlaka. U studiji Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP) pokazalo se kako liječenje izolirane sistoličke hipertenzije u osoba starijih

od 60 godina dovodi do smanjenja učestalosti moždanog udara za 36%. Kontrola krvnog tlaka (RR <140/90, dijabetičari RR <130/80) smanjila je morbiditet i mortalitet od moždanog udara za 40% (13,14). Studije HOPE i PROGRESS pokazale su veću prevenciju moždanog udara nego što se očekuje sniženjem krvnog tlaka (15,16). Meta-analiza 14 randomiziranih kliničkih pokusa pokazala je kako smanjenje dijastoličkog arterijskog tlaka od 5-6 mm Hg uzrokuje značajno smanjenje učestalosti moždanog udara za 42%. Ako je prisutan i neki drugi čimbenik rizika (npr. šećerna bolest), tada tlak treba održavati ispod 130/80 mm Hg. Usprkos naporu u edukaciji, značajan postotak populacije ima nedijagnosticiranu ili loše liječenu hipertenziju (17).

1.4.1.2. Hiperkolesterolemija

Brojnim su istraživanja već odavno pokazala izravnu povezanost između povećane koncentracije kolesterola, a posebno lipoproteina niske gustoće (LDL) (engl. *Low-Density Lipoprotein*) u plazmi i povećane učestalosti koronarne bolesti, infarkta miokarda, ishemijskog moždanog udara te smrtnosti od tih bolesti. Također je poznato da je smanjena koncentracija lipoproteina visoke gustoće (HDL) (engl. *High-Density Lipoprotein*) također povezana s većim rizikom od razvoja cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti (KVB). Prema provedenim velikim kliničkim studijama, normalne ili "poželjne" ciljane vrijednosti lipida u serumu su vrijednost ukupnog kolesterola < 5.0 mmol/L, a LDL-kolesterola < 3.0 mmol/L. Brojna ispitivanja pokazala su da primjena statina značajno smanjuje smrtnost od KVB i CVB te dokazano zaustavlja progresiju i čak dovodi do regresije aterosklerotičkih naslaga u arterijama, pridonosi stabiliziranju mekanih plakova, poboljšanju funkcije endotela, te smanjenju agregacije trombocita. U Skandinavskoj studiji preživljavanja sa simvastatinom (Scandinavian Simvastatin Survival Study 4S) naknadna analiza podataka otkrila je relativno smanjenje rizika za moždani udar i TIA za 28% (18). U studiji Cholesterol And Recurrent Events (CARE) pokazano je relativno smanjenje rizika od moždanog udara za 31%, a u studiji Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) relativno smanjenje rizika za moždani udar iznosilo je 19% (19,20).

1.4.1.3. Diabetes melitus

Šećerna bolest predstavlja neovisan čimbenik rizika za nastanak ateroskleroze i moždanog udara. U osoba sa šećernom bolešću utvrđena je dvostruko viša smrtnost nakon ishemijskog moždanog udara u odnosu na osobe bez iste. Nije dokazano da stroga kontrola koncentracije

glukoze u krvi djeluje povoljno na sprječavanje moždanog udara. Kod bolesnika s dijabetesom tipa II. pokazalo se kako terapija peroralnim hipoglikemicima i/ili inzulinom poboljšava sistemske mikrovaskularne komplikacije, ali ne i makrovaskularne komplikacije kao što je moždani udar. Smatra se da je preciznije određivanje neovisnog udjela šećerne bolesti u nastanku i razvoju moždanog udara otežano jer postoji niz drugih čimbenika rizika za nastanak moždanog udara koji su već prisutni pri otkrivanju šećerne bolesti (21-26).

1.4.1.4. Atrijska fibrilacija

Atrijska fibrilacija je jedan od najznačajnijih neovisnih čimbenika rizika za nastanak moždanog udara. Povećava pojavnost moždanog udara otprilike pet puta. Nakon ekstrasistolije je najčešća aritmija, a klinički je veoma važna. Prevalencija atrijske fibrilacije u populaciji je 1-2 %, osobito je zabilježen njen nagli rast u starijim dobnim skupinama, od <0,5 % u petom desetljeću pa do 5-15 % s 80 godina života. Češća je kod muškaraca nego kod žena (~1,5:1) (27,28). Među brojnim uzročnim čimbenicima fibrilacije atrijske koji se često isprepleću, dominantne su hipertenzivna i ishemijska bolest srca, s kardijalnom dekompenzacijom i mitralnom insuficijencijom. Reumatska bolest mitralne valvule i tireotoksikoza danas su već rjeđi uzroci. Gotovo sve bolesti srca mogu potaknuti fibrilaciju atrijske, ali i neki ekstrakardijalni čimbenici kao što su fluktuacije vagalne i adrenergičke stimulacije, opstruktivna apneja u snu, debljina i kronična opstruktivna plućna bolest. U novije vrijeme sve je više spoznaja o genetskoj sklonosti za fibrilaciju atrijske koja se fenotipski rijetko očituje spontano, ali često uz spomenute „egzogene čimbenike”. Tromboembolija iz akontraktilnih atrijske, najčešće cerebralna, česta je i zastrašujuća komplikacija. Rizik moždanog udara je u bolesnika s fibrilacijom atrijske povećan pet puta. Raspon rizika tromboembolijskih komplikacija fibrilacije atrijske je širok, od 2 do 30% godišnje, a u 2/3 do 9/10 slučajeva embolija je cerebralna. Rizik je malen u mlađih bolesnika s uglavnom zdravim srcem, velik u starijih s bolesnim srcem i komorbiditetom, a najveći u onih s reumatskom mitralnom greškom (29). Antikoagulantna terapija smanjuje rizik embolije za 2/3, obvezna je ako rizik embolije nadmašuje rizik krvarenja. Genetičko testiranje sklonosti atrijskoj fibrilaciji je uglavnom još predmet istraživanja, kako u tzv. „case controlled” studijama, tako i u velikim „genome wide association studies” (GWAS). Vrlo rijetko je genetička komponenta toliko jaka da se fibrilacija atrijske mendelijanski nasljeđuje u više članova obitelji, a pojavljuje se već u mladoj životnoj dobi kao izolirana pojava, ili uz druge aritmije i kardiomiopatije. Takvi slučajevi „familijarne atrijske fibrilacije” objašnjavaju se mutacijama gena, najčešće za ionske kanale kardiomiocita (30-32).

1.4.1.5. Debljina

Prekomjerna tjelesna masa i debljina ubrajaju se u najvažnije zdravstvene probleme širom svijeta. Prema definiciji WHO, debljina je oboljenje koje karakterizira povećanje masne mase tijela u mjeri koja dovodi do razvoja niza komplikacija. Uvrštena je u deset vodećih rizičnih čimbenika za razvoj bolesti na globalnoj razini (33,34). Nastaje kada unos izvora energije (kalorija) nadmaši energetske potrebe, odnosno kada su unos i stvaranje masti u tijelu veći od količine masti koja oksidira u tkivima. Prema istraživanju koje je provedeno 2009. godine 38,1% stanovnika Republike Hrvatske je imalo prekomjernu tjelesnu masu, a 20,3% je bilo debelo (35,36). Za visoku prevalenciju prekomjerne mase tijela i debljine postoje brojni razlozi. Prije svega, to su sjedilački način života i nedostatak tjelesne aktivnosti te velika promjena u načinu prehrane (veća energetska vrijednost hrane, povećana količina šećera i jestivog ulja kao i povećana konzumacija namirnica životinjskog porijekla). Osim najznačajnijih okolišnih čimbenika rizika, postoje i brojni genetički čimbenici koji utječu na debljinu. Procjenjuje se kako genetička osnova sudjeluje s 40–80% u patofiziologiji debljine (37,38). Mjere pomoću kojih se procjenjuje količina masnog tkiva su antropometrijske mjere: ITM – procjena opće uhranjenosti; opseg struka (OS), i/ili WHR (omjer struk/bokovi) – procjena debljine središnjeg, abdominalnog tipa. Danas se čini da je najbolja mjera OS jer se njime procjenjuje količina masnog tkiva unutar trbuha tj. intra-abdominalnog, visceralnog (lat. viscera, organ u šupljinama tijela) masnog tkiva koje najviše pridonosi metaboličkim promjenama koje se događaju kod osoba s prekomjernom debljinom. Prema SZO osobe muškog spola koje imaju OS 94 cm imaju povećan rizik, a OS \geq 102 cm jako povećan rizik za razvoj komorbiditeta, prije svega onih na kardiovaskularnom sustavu. Osobe ženskog spola koje imaju OS \geq 80 cm imaju povećan rizik, a OS \geq 88 cm jako povećan rizik za razvoj komorbiditeta debljine (40). Framinghamska studija pokazala je negativnu povezanost tjelesne aktivnosti i učestalosti moždanog udara u muškoj populaciji. Novija istraživanja pokazuju da je povećana tjelesna aktivnost povezana sa smanjivanjem rizika moždanog udara i kod žena te da je abdominalni tip pretilosti značajan neovisan čimbenik rizika za nastanak moždanog udara. Smatra se da je povoljan učinak povezane tjelesne aktivnosti na snižavanje rizika za nastanak moždanog udara posljedica učinka na snižavanje povišenih vrijednosti tlaka, smanjivanje tjelesne težine i poboljšanje tolerancije glukoze. Povećana tjelesna aktivnost također dovodi do povišenja HDL kolesterola i snižavanja LDL kolesterola, te do promicanja zdravog načina života (41).

1.4.1.6. Pušenje

Pušenje predstavlja važan rizični čimbenik odgovoran za razvoj moždanog udara te povećava rizik za 50% u svim dobnim skupinama (42). Aktivnim i pasivnim pušenjem u organizam se unosi nekoliko tisuća kemijskih sastojaka. Proveden je niz istraživanja mehanizama djelovanja pojedinih komponenti duhanskog dima na vaskularni sustav. Pokazalo se da kod pušača ovisno o količini popušanih cigareta dolazi do porasta razine ukupnog kolesterola, triglicerida, lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL), LDL-a, te snižavanja razine HDL-a i apolipoproteina A1 koji imaju angioprotektivno djelovanje. Zbog poremećene lipolize kod pušača nakon konzumiranja masnog obroka ne dolazi do porasta HDL-a, što se normalno događa kod nepušača. Ova se pojava objašnjava time što nikotin potiče oslobađanje adrenalina, povećava se koncentracija slobodnih masnih kiselina, koje potiču jetreno lučenje VLDL-a. Koncentracija HDL-a se mijenja obrnuto s koncentracijom VLDL-a. Uz to, kod pušača se bilježi i porast koncentracije tromboksana A2 i porast reaktivnost trombocita (43). Postoje istraživanja koja ukazuju na to da do oštećenja endotelne stanice dolazi pod utjecajem ugljičnog monoksida što ga sadrži duhanski dim, zbog čega se povećava propusnost stijenke i omogućuje veće infiltriranje lipida. Svi navedeni procesi doprinose aterogenezi. S farmakološkog stajališta nikotin, po svom kemijskom sastavu alkaloid, sastojak je duhanskog dima s najsnažnijim djelovanjem. Pušenje je u Hrvatskoj jedan od velikih javnozdravstvenih problema s obzirom na velik broj pušača. Za očekivati je da aktivnosti na području prevencije pušenja doprinesu i smanjenju pojavnosti moždanog udara.

1.4.2. Nepromjenjivi rizični čimbenici

1.4.2.1. Dob i spol

Dob je jedan od najznačajnijih čimbenika rizika za nastanak moždanog udara. Rizik za razvoj raste eksponencijalno s dobi (44). Poznato je da nakon šezdesete godine života rizik za nastanak moždanog udara raste za otprilike 10% sa svakim sljedećim desetljećem starosti. Poznato je da je moždani udar češći u muškaraca u generativnoj životnoj dobi. No nakon menopauze rizik od nastanka moždanog udara raste u ženskoj populaciji. Ta činjenica i podatak da je prosječni životni vijek žena duži dovodi do pojave da je u starijoj životnoj dobi u apsolutnom broju veći udio žena s moždanim udarom (45).

1.4.2.2. Rasa i etnička pripadnost

Češće se javlja u pripadnika crne rase nego u bijelaca (46).

1.4.2.3. Nasljedni

Interakcija genetskih čimbenika, čimbenika okoliša, stil života uvelike utječu na razvoj moždanog udara. Podatak o moždanom udaru u obiteljskoj anamnezi i/ili podatak o preboljelom moždanom udaru ili TIA u osobnoj anamnezi značajno povećavaju vjerojatnost pojave recidiva moždanog udara u pojedinca. Moždani udar može se javiti u sklopu monogenetskih bolesti, ali mnogo češće se javlja kao poligenetska bolest. Neki familijarni sindromi s poznatim monogenetskim nasljeđivanjem u sklopu kojih se javlja moždani udar su cerebralna autosomna dominantna arteriopatija s subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL); Fabrijeva bolest; Bolest srpastih stanica (engl. *Sickle-cell disease*, SCD); Homocistinurija; MELAS (engl. *Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*); poremećaji vezivnog tkiva: Marfan's syndrom, Ehlers-Danlos syndrome type IV, Osteogenesis imperfecta, pseudoxantoma elasticum, Moyamoya i niz druge. No pojava moždanog udara češće je rezultat djelovanja više genskih i okolišnih čimbenika (47-49).



SLIKA 2. ČIMBENICI RIZIKA ZA RAZVOJ MOŽDANOG UDARA

1.5. Klinička slika

Klinička slika ishemijskog moždanog udara prvenstveno ovisi o području koje je zahvaćeno ishemijom. Ovisno o funkciji navedenog dijela mozga nastaje jedan ili više žarišnih neuroloških deficita. Osnovna karakteristika simptomatologije svih moždanih udara je nagli nastanak kliničkih simptoma. Najčešći neurološki ispadi su motorički: hemipareza, monopareza ili kvadripareza, senzorni: hemihipestezija, vidni: hemianopsija, monokularni i binokularni gubitak vida ili dvoslike, smetnje govora: disfazije ili afazije, disartrije ili anartrije, odnosno disfonije ili afonije te smetnje gutanja. Rjeđe se javljaju znakovi oštećenja stražnje cirkulacije (vertebrobazilarnog sliva) kao što su: ataksija, vertigo, nistagmus, mučnina i/ili povraćanje. Poremećaj svijesti može biti znak pojedinih vrsta moždanog udara, odnosno oštećenja određenih struktura mozga, ali kod ishemijskog moždanog udara ne ubraja se u učestale prve, odnosno tipične, kliničke znakove bolesti. Dijagnoza IMU-a postavlja se temeljem navedene kliničke simptomatologije te neuroslikovnim metodama, prvenstveno nativnom kompjutoriziranom tomografijom mozga i magnetnom rezonancom mozga. U daljnjoj dijagnostičkoj obradi, uz praćenje i korekciju hemodinamskih čimbenika, svakako je potrebna hitna laboratorijska obrada (koagulacija, biokemija i hematologija), utvrđivanje prediktivnih rizičnih biljega u sklopu daljnje neurološke i kardiološke obrade.

1.6. Ateroskleroza

U podlozi većine ishemijskih moždanih udara nalazi se ateroskleroza. Ateroskleroza se klasično opisivala kao kronična progresivna bolest obilježena nakupljanjem lipida, fibroznog materijala i kalcija u stijenci arterija. Novije spoznaje ukazuju na središnje značenje upalnog procesa kako u nastanku ateroma tako i u nastanku tromba na ateromu. Upalni proces prisutan je u najranijim aterosklerotskim lezijama kao i u uznapredovalim lezijama (50). Mnogobrojni dokazi do sada ukazali su na činjenicu da upala i genski faktori imaju glavnu ulogu u razvoju aterosklerze, a time i razvoja moždanog udara. Danas definiramo aterosklerozu kao kroničnu upalnu bolest karakteriziranu oštećenjem stijenke arterija obilježenim lokalnim zadebljenjem intime koje se sastoji od umnoženih i izmijenjenih glatkih mišićnih satnica, makrofaga, lipida iz serumskih lipoproteina nakupljenih u stanicama i izvan njih, te umnoženoga veziva kolagena, elastina i mukopolisaharida. Radi se o poligenskoj i multifaktorskoj bolesti koja počinje u djetinjstvu, no klinički se očituje poslije u životu (51). Ateroskleroza se, kao podloga kardiovaskularnih,

cerebrovaskularnih i bubrežnih bolesti, smatra rastućim globalnim javnozdravstvenim problemom. Rizični čimbenici mogu se podijeliti na genetičke i vanjske, među kojima su hipertenzija, šećerna bolest tipa II, pretilost, pušenje, smanjena tjelesna aktivnost, stres, upalni proces i drugi. Upalni proces može biti «sterilan», a od mogućih uzročnika spominju se *Chlamydia pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Citomegalovirus, Herpes simplex virus, Epstein-Barrov virus. Ovi mikroorganizmi nađeni su u raznim aterosklerotskim lezijama, kao i u bolesnika s kliničkim komplikacijama ateroskleroze (infarkt miokarda, moždani udar). To govori u prilog uloge navedenih patogena u nastanku upale koja može dovesti do nastanka i progresije aterosklerotskih lezija. Ispituje se djelovanje antibiotika, uglavnom makrolida, u prevenciji nastanka i progresije aterosklerotskih lezija, no zasada nisu objavljeni rezultati koji bi potvrdili djelotvornost primjene antibiotika (52). Rutinska laboratorijska dijagnostika uključuje utvrđivanje biljega povećanog rizika za ateroskrozu kao što su ukupni kolesterol, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol, apoproteini, fibrinogen, interleukini, mijeloperoksidaza, hsCRP, Lp-PLA2, adiponektin, leptin i inzulin (53). Genomičkim, proteomičkim, transkriptomičkim i lipidomičkim profiliranjem dobiva se slika stanice te se identificiraju geni, njihove funkcionalne varijante i proteini koji su povezani s homeostazom lipida, upalnim procesima i hemostatskim statusom, kao i signalni putevi i biološki procesi uključeni u predispoziciju ateroskleroze. Ateroskleroza je temeljni uzrok pojavljivanja kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti. Unatoč poboljšanim farmakološkim i nutricionističkim pristupima, još uvijek je vodeći uzrok pobola i smrtnosti u razvijenim zemljama. Kronična endotelna disfunkcija ima bitnu ulogu u aterogenezi i mogla bi biti najranija dokaziva abnormalnost. Rizični čimbenici, bilo akutni (infekcije, imune lokalne reakcije) bilo stalni (hipertenzija, oksidacijski stres, dijabetes, dislipidemija, debljina, hiperhomocisteinemija, pušenje itd.) izazivaju endotelnu disfunkciju, ozljedu stanice te proupalnu okolinu koja rezultira lokalnim imunosnim reakcijama, kao i aktivaciju posredovanu tkivnim faktorom kaskade zgrušavanja. U ateromskoj okolini prokoagulacijske i antikoagulacijske sile određuju stvaranje naslaga zajedno s pro/antifibrinolitičkim čimbenicima. Specifičnije rečeno, postalo je jasno da imunosni sustav ima vodeću ulogu u razvoju i napredovanju ateroskleroze. Rizični biljezi ateroskleroze su biljezi upale, faktori rasta, interleukini IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1a, IL-1b, TNF α , hsCRP, HcT, Lp-PLA2, biološki regulatori adipoznoga tkiva leptin i adiponektin (54,55). Koncept atero-upale izranja kao mjesto sastajanja različitih bolesti uključujući dislipidemiju, debljinu, hipertenziju, oksidacijski stres, dijabetes, autoimunost, infekcije, hiperhomocisteinemiju, prehranu i pušenje. Postoje dokazi da su nuklearni receptori PPAR α i γ regulatori u metabolizmu lipida,

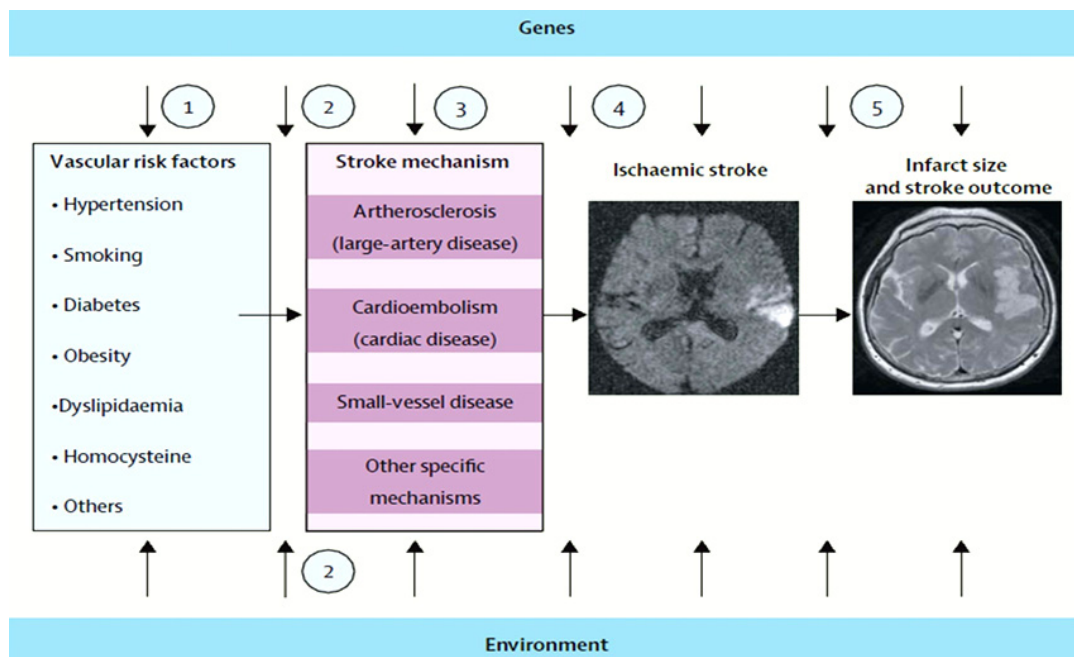
homeostazi glukoze i upalnim procesima. Povezanost varijabilnih gena kao što su *ACE*, *ATR1*, *ApoB*, *ApoE*, *MTHFR*, *ADIPOQ* glikoprotein, faktor II, te faktor V, IL-6 može u interakciji s *PPAR α* i γ utjecati na fenotipski izražaj različitih rizičnih čimbenika ateroskleroze. Dosadadašnja istraživanja su utvrdila interakciju gena *PPAR*, *IL-6* i *ATR1* kod mlađih bolesnika s moždanim udarom. Smatra se da su inhibicija ateroskleroze i poboljšanje kardiovaskularne funkcije ovisni o varijabilnim učincima navedenih gena koji reguliraju oksidacijski stres, lipidni metabolizam, inzulinsku rezistenciju te endotelnu funkciju. Polimorfni oblici spomenutih gena, kao i modificiranih gena, genske interakcije, interakcije gena i transkripcijskih faktora, interakcije gena i prehrane nedovoljno su istraženi. Spoznajom da su metabolizam lipida i upala povezani preko zajedničkih signalnih putova nuklearnih receptora, posebice u makrofagima, otvara se novo područje potencijalnog liječenja. Usprkos znatnom napretku u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti, potrebni su novi pristupi kako bi se smanjili nepovoljni zdravstveni trendovi. Prijašnja su istraživanja upozorila na pojedinačne genske i proteinske biljege koji mogu poslužiti kao pretkazatelji poremećaja u regulaciji brojnih metaboličkih procesa. Receptori su važni regulatori metabolizma i ujedno značajni farmakološki ciljevi u obrani od epidemije debljine, dijabetesa, cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti. Stoga je od interesa identifikacija relevantnih bioloških pokazatelja: novih ciljnih gena, regulacijskih sekvenci i genetičke mreže za aktivacijske receptore. Smatra se da bi pristup sistemne biologije, odnosno integrirane genetike i proteomike, za razumijevanje istodobne regulacije različitih genskih ciljeva mogao pospješiti razumijevanje etiopatogeneze ateroskleroze i pridruženih poremećaja te pridonijeti pronalaženju novih lijekova i regenerativnoj medicini (56).

1.7. Genetička istraživanja cerebrovaskularnih bolesti

Dosadašnja istraživanja o ulozi nasljednih poremećaja u razvoju cerebrovaskularnih bolesti otkrila su mnoštvo kliničkih stanja i rizičnih faktora koji utječu ne samo genskom ekspresijom već interakcijom s čimbenicima okoliša, na porast broja slučajeva moždanog infarkta (1). Tradicionalno, najveći klinički pokušaj tj. nastojanje u prevenciji moždanog udara direktno je usmjereno prema modifikaciji glavnih rizičnih čimbenika ateroskleroze, uključujući simptomatsku terapiju hipertenzije, dijabetesa, hiperkolesterolemije i pušenja (2,3). Istraživanja koja su se bavila genetičkom osnovom cerebrovaskularnih bolesti su brojna i ukazuju na činjenicu da je moždani udar poligenetska i multifaktorijalna bolest uvjetovana složenim međudjelovanjem brojnih gena i

čimbenika okoliša, zbog čega istraživanje njegove genetičke podloge predstavlja veliki izazov. Mnoge provedene humane i animalne studije dokazale su utjecaj gena na razvoj moždanog udara, no identifikacija pojedinačne uzročne genske mutacije u moždanom udaru zasad ostaje problem (57). Za razliku od dobro definiranih monogenetskih bolesti, s poznatom mutacijom jednog gena (single-gene defect), koje u svojoj prezentaciji rezultiraju između ostalog i kliničkom slikom moždanog udara u mlađoj životnoj dobi, bez prisutnih riziko faktora za razvoj cerebrovaskularnih bolesti, moždani udar mnogo češće se javlja u starijoj životnoj dobi kao rezultat interakcije više gena i čimbenika okoliša i krajnji je rezultat niza patoloških procesa od kojih svaki može biti pod utjecajem gena. Epidemiološke studije su analizirale pojavnost moždanog udara u jednojajčanih, dvojajčanih blizanaca i rodbinski povezanih pojedinaca te su pokazale da je koeficijent podudarnosti pojave inzulta kod jednojajčanih blizanaca 65% veći nego u dvojajčanih, no nedostatak studija je mali uzorak (58). U "case-control" studijama pokazalo se da pozitivna obiteljska anamneza moždanog udara povećava rizik za pojavu istog kod potomaka do 75%, što je gotovo u skladu sa studijama provedenima na blizancima (59). No, točnu procjenu vrlo je teško postići. Genetska predispozicija se razlikuje i ovisi o dobi kao i podtipu moždanog udara. I studije provedene na blizancima, kao i unutar familija, upućuju na jači utjecaj gena kod pacijenata mlađe životne dobi, <70 godina, nego kod osoba starije životne dobi (60). Također se pokazalo da je utjecaj genetskih čimbenika izraženiji kod infarkta u području velikih krvnih žila (engl. large-vessel stroke) i infarkta u području malih krvnih žila (engl. small-vessel stroke), nego u slučaju kriptogenog te kardioembolijskog moždanog udara. Daljnja epidemiološka istraživanja pokazala su da se obiteljska anamneza pozitivna na postojanje infarkta miokarda češće javlja kod infarkta u području velikih krvnih žila nego u drugim podtipovima moždanog udara (61). Ova spoznaja ukazuje na bitnost podtipova moždanog udara i podupire tezu da infarkt miokarda i moždani udar u području velikih krvnih žila dijele slične ili jednake patološke mehanizme kao i genetsku podlogu. Daljnja uočavanja i istraživanja dolaze iz studija na intermedijarnom ili prijelaznom fenotipu. Postoje jaki dokazi, na primjer, za genetsku komponentu u razvoju ateroskleroze kao neovisne značajke. Zadebljenje intimalnog zida karotide (engl. intima-medial wall thickness, IMT), u biti je mjera za subkliničku sliku ateroskleroze – i uveliko je kontrolirana utjecajem gena (62). Smatra se da je utjecaj nasljednosti u razvoju IMT oko 30 – 60% (63,64). Osim toga, postoje i dokazi genetskog utjecaja odnosno nasljednosti na pojavu ishemijskih lezija bijele tvari mozga – što u biti upućuje na bolest malih krvnih žila u stopi 55-70%, što nadalje ovisi o populaciji ispitanika (65). Sve gore navedeno govori u prilog tome da je moždani udar poligenetska bolest. Do sada je poznato i

analizirano niz gena kandidata koji potencijalno doprinose razvoju moždanog udara. Među najčešće istraživanim kandidatima gena u case-control studijama su geni uključeni u proces upale (interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor- α , C reaktivni protein, P-selektin, E-selektin); metabolizam lipida (apolipoprotein E, paraoksonaze, epoksid-hidrolaze); produkcije dušik-oksida; metabolizma homocisteina; renin-angiotenzin sustava; te ekstracelularnog matriksa (matriks metaloproteinaza) (66). Genetski čimbenici mogu djelovati na više razina. Mogu doprinijeti konvencionalnim faktorima rizika kao što su hipertenzija, dijabetes, razina homocisteina koji također imaju poznate genske komponente (67,68). Nadalje, mogu djelovati s okolišnim čimbenicima ili izravno pridonijeti intermedijarnom fenotipu poput ateroskleroze (69,70). U konačnici, genetski čimbenici mogu djelovati na vrijeme nastupa moždanog udara, utjecati na veličinu infarkta nakon okluzije krvne žile i u konačnici na sam ishod (71) (Slika 3.).



SLIKA 3. UTJECAJ GENETSKIH ČIMBENIKA NA RIZIK NASTANKA MOŽDANOG UDARA. MOGU DJELOVATI KROZ KONVENCIONALNE ČIMBENIKE RIZIKA (1), U INTERAKCIJI S KONVENCIONALNIM I OKOLIŠNIM ČIMBENIKICIMA RIZIKA (2), ILI IZRAVNO PRIDONIJETI RAZVOJU MOŽDANOG UDARA KROZ PROCES ATEROSKLEROZE I RAZVOJA “SMALL-VESSEL DISEASE” (3). GENETSKI FAKTORI MOGU UTJECATI NA RAZVOJ SLIKE LATENTNOG MOŽDANOG UDARA (4), NA VELIČINU INFARKTA I ISHOD MOŽDANOG UDARA (5). SLIČNO TOME, OKOLIŠNI ČIMBENICI I INTERAKCIJE IZMEĐU GENA I OKOLIŠA MOGU SE POJAVITI U RAZLIČITIM RAZINAMA. MR SLIKE JE USTUPILA KLINIKA ZA NEURORADIOLOGIJU, GROSSHADERN.(58)

1.7.1. Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS)

Genome-Wide Association Study (GWAS) - cjelogenomski test asocijacije: kojim se ispituje povezanost velikog broja genetičkih varijanti s različitim fenotipskim osobinama. GWAS procjena heritabilnosti pomoću Single nucleotide polymorphism (SNP). Prvi nacrt humanog genoma je publiciran u okviru Projekta humanog genoma (Human Genome Project), a prva sveobuhvatna mapa čestih haplotipova je objavljena u okviru Projekta HapMap. Većina parova baza u humanom genomu je zajednička svim ljudima, stoga se genetičke asocijacijske studije fokusiraju na razlike u pojavnosti varijantnih oblika gena, najčešće jednonukleotidnih polimorfizama (SNPs). Dovršetakom Projekta humanog genoma i Projekta HapMap 2003. godine te razvojem tehnika genotipizacije visoke protočnosti (engl. high-throughput genotyping techniques), uz sofisticirane statističke i računarske metode, postignuti su uvjeti za opsežne studije GWA, u kojima se ispituje povezanost velikog broja genetičkih varijanti s različitim fenotipskim osobinama (72). U svrhu prilagodbe za velik broj testova provedenih u studijama GWA, provodili su se postupci poput korekcija za multiplo testiranje te replikacijske studije s neovisnim uzorcima te je na taj način minimiziran broj pogrešnih zaključaka. Povezanosti između ispitivane osobine i SNP-a koje su se održale nakon provedbe navedenih postupaka smatrale su se značajnima na razini genoma (engl. genome-wide significant). Zasad se povezanosti s varijantama gena koje dosežu statističku značajnost $P \leq 5 \times 10^{-8}$ smatraju značajnima na razini genoma (engl. genome-wide). GWAS za moždani udar: ukupna heritabilnost za moždani udar 37,9%; bolesti velikih kr. žila (40,3%); kardioembolijski (32,6%), a bolest malih kr. žila (16,1%) (73). Gretarsdottir S i sur. u studiji provedenoj među islandskom populacijom (deCODE), pokazali su da gen koji kodira fosfodiesterazu 4D, a koji se nalazi na kromosomu 5q12, predstavlja rizični čimbenik za razvoj moždanog udara (74). Nekoliko kasnijih studija koje su pokušale pokazati isto, nisu uspjele (75). The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC) i International Stroke Genetics Consortium provele su GWAS koje su uključile 3548 slučajeva ishemijskog moždanog udara s repliciranjem potencijalnih signala u 5859 slučajeva (76). Provedena studija potvrdila je rezultate ranije provedenih: povezanost s kardioembolijskim moždanim udarom u blizini PITX2 i ZFH3, lokusa poznatih s rizikom razvoj fibrilacije atrijske (77). Studija je također pokazala povezanost moždanog udara u regiji velikih krvnih žila i gena HDAC9 na kromosomu 7p21.1. Meta-analiza METASTROKE analizom 12000 slučajeva i približno 60000 kontrola nije uspjela otkriti nove genske rizične čimbenike, već je uspjela potvrditi ranije identificirane gene PITX2, ZFH3 i HDAC9 (78). U tijeku je nekoliko pokušaja primjene GWAS

dokaza u svakodnevnoj kliničkoj praksi i individualnoj skrbi pacijenata. Genetski testovi pomažu kliničarima u testiranju pacijenata na postojanju mogućih genetskih rizičnih lokusa koji mogu doprinijeti razvoju bolesti, a samim time mogu utjecati na pravovremenu prevenciju istih. Iako su rezultati GWAS za moždani udar obećavajući, trenutno nemaju vrijednost u terapiji i predviđanju rizika za razvoj istog.

Cjelogenomske studije povezanosti (engl. genome-wide association studies)

Chr	Gene	Subtype	RA	RAF	OR(95%CI)	P Value
7p21.1	HDAC9	LVD	A	0.09	1.39 (1.27 to 1.53)	2.03×10 ⁻¹²
4q25	PITX2	CE	A	0.19	1.36 (1.27 to 1.47)	2.8×10 ⁻¹⁶
9p21.3	CDKN2A/B	LVD	G	0.51	1.17 (1.09 to 1.25)	2.93×10 ⁻⁵
12p13.33	NINJ2	All	A	0.23	1.41 (1.27 to 1.56)	2.3×10 ⁻¹⁰
16q22.3	ZFHX	CE	G	0.17	1.25 (1.15 to 1.35)	2.28×10 ⁻⁸
11q12	AGTRL1	All	G	-	1.3 (1.14 to 1.47)	6.66×10 ⁻⁵
-	CELSR1	All	G	-	1.85 (1.29 to 2.61)	1×10 ⁻⁴
5q12	PDE4D	CE and cryptogenic		0.16	-	1.5×10 ⁻⁶
13q12-13	ALOX5AP	All		0.15	1.67	9.5×10 ⁻⁵
-	PRKCH	SVD		-	1.4	5.1×10 ⁻⁷
6p21.1	rs556621	LVD			1.21	4.7×10 ⁻⁸

Chr, chromosome; CE, carotid embolism; LVD, large vessel disease; p, probability value; RA, risk allele; RAF, risk allele frequency; SVD, small vessel disease

1.8. Geni kandidati odobreni za ovo istraživanje

1.8.1. Gen *PPAR γ*

Transkripcijski faktori PPAR (*PPAR α* , *PPAR δ* i *PPAR γ*) pripadaju superporodici nuklearnih receptora. Nakon vezanja određenog liganda tvore heterodimere s još jednim nuklearnim receptorom, receptorom za retinoide X (*RXR*). Taj se heterodimer tada veže za elemente odgovora unutar promotorske regije specifičnih-ciljnih gena inducirajući gensku ekspresiju, između ostalih i gena uključenih u metabolizam lipida i glukoze, transport masnih kiselina, diferencijaciju adipocita

i upalu. Receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tip γ – *PPAR γ* (lociran je na kromosomu 3p25) kodira transkripcijski faktor uključen u ekspresiju velikog broja gena. Zbog alternativnog spajanja mRNA (engl. splicing) pojavljuju se dvije izoforme proteina *PPAR γ 1* i *PPAR γ 2*. Dok se *PPAR γ 1* nalazi posvuda u tijelu, *PPAR γ 2* je uglavnom prisutan u masnom tkivu i crijevima (79). U ligande *PPAR γ* ubrajamo ~~razne~~ endogene spojeve poput prostaglandina PGJ2, linolne i arahidonske kiseline te egzogene spojeve poput tiazolidindiona i nesteroidnih protuupalnih lijekova. Niz studija pokazalo je važnu ulogu PPAR-a u skladištenju lipida i diferencijaciji adipocita (80) te u regulaciji lipidne homeostaze i osjetljivosti na inzulin (81). *PPAR γ* je ciljno mjesto djelovanja tiazolidindiona (TZD), lijekova koji poboljšavaju inzulinsku osjetljivost, djeluju antiaterogeno na više razina, uključujući generalno poboljšavanje metabolizma kao i pozitivnim učinkom na komponente stijenke krvnih žila poput makrofaga, smanjuje pojavnost zadebljanja intime stijenki krvnih žila (IMT) (82). Samim time TZD smanjuje pojavnost riziko faktora za razvoj moždanog udara poput ateroskleroze, hipertenzije (83,84). Ozljeda neurona kao posljedica ishemijskog moždanog udara udružena je masivnom upalnom reakcijom, koja rezultira oštećenjem moždanog parenhima (85). Citokini su bitni molekularni signali na upalnu reakciju. Cerebralna ishemija potiče ekspresiju nekoliko proinflammatoryh citokina poput TNF- α ; interleukin (IL)-1beta; IL-6 i IL-12. Oni nadalje potiču ekspresiju adhezijskih molekula poput intracellular adhesion molecule (ICAM)-1; vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, E-selektin, P-selektin, na taj način potičući leukocite na strujanje prema mozgu, a u konačnici njihovu infiltraciju. Osim poznate činjenice da tijekom diferencijacije preadipocita u adipocite dolazi do indukcije *PPAR γ* koja je najizraženija u bijelom i smeđem masnom tkivu, postoje dokazi da je *PPAR γ* izražen u ključnim regijama mozga za kardiovaskularnu i autonomnu regulaciju. U odraslom mozgu *PPAR γ* pokazuje ekspresiju u hipokampalnoj regiji, girus dentatus, nucleus caudatus, putamen i globus pallidus, thalamus i piriformni korteks (86,87). Zadnje studije su pokazale da je ekspresija najznačajnija u mikroglijalnim stanicama i astrocitima, stanicama koje igraju značajnu ulogu u upalnom odgovoru središnjeg živčanog sustava (SŽS) (88). Studije su pokazale da je uloga aktivacije *PPAR γ* u protekciji od nastanka moždanog udara – endogenim ili sintetskim agonistima – u činjenici da aktivacija istih potiče relaksaciju endotela, reducira oksidativni stres i smanjuje ekspresiju VCAM-1 i ICAM-1 adhezijskih molekula. Nakon ishemijskog incidenta povećana je ekspresija *PPAR γ* u mozgu, osobito u peri-infarktnoj zoni. Također agonisti *PPAR γ* potiskuju transkripciju proinflammatoryh gena nakon ishemije, smanjuju ekspresiju citokina.

Na temelju ovih činjenica možemo pretpostaviti da PPAR γ agonisti imaju neuroprotektivnu ulogu u onim lezijama u kojima upala i slobodni radikali potiču smrt stanica. Izoforme PPAR γ , velik broj ciljnih gena koje regulira, ligandi i koregulatori doprinose složenosti njegove funkcije. Uz to i genska varijabilnost PPAR γ utječe na ekspresiju ciljnih gena. Između više varijanti PPAR γ najviše je u epidemiološkim studijama istraživani polimorfizam Pro12Ala (rs1801282) (89). Učestalost varijante 12 Ala ovisi o rasnoj kao i etničkoj pripadnosti i varira u rasponu od 2% do 18%. Za supstituciju prolina u alanin u kodonu 12 ustanovljeno je da doprinosi modulaciji transkripcijske aktivnosti. Varijanta Ala smanjuje afinitet prema elementu odgovora u ciljnim genima, što u konačnici rezultira manje efektivnom stimulacijom ciljnih gena (90). Dokazana je povezanost varijanti PPAR γ s debljinom, ITA i šećernom bolesti. Provedena meta -analiza povezanosti polimorfizma Pro12Ala i šećerne bolesti pokazale su smanjeni rizik za pojavu iste kod nosioca varijante 12Ala (91). Najnovija istraživanja uloge polimorfizama PPAR γ uključuju na važnost ispitivanja interakcija polimorfničkih varijanti gena s ciljnim genima (poput LPL, IL-6, AT1R, APOE). Nedostatak PPAR γ ima jak utjecaj na lipidnu homeostazu i time mijenja inzulinsku osjetljivost. Interakcije gena i gena i okoliša (dijeta, tjelovježba) mogu značajno modulirati učinke PPAR γ rezultirajući fenotip.

1.8.2. Gen IL-6

Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji posreduju pri djelovanju jedne stanice na drugu. Citokini djeluju lokalno i njihova je aktivnost kratkotrajna. Najčešće ih luče imunosne i upalne stanice, ali i mnoge druge stanice. Većina citokina potiče aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduje ili regulira imunoreakcije, djeluje kemotaktički i regulira upalne procese. Ostali citokini inhibiraju rast stanica ili djeluju citotoksično. Citokini mogu djelovati na nekoliko različitih vrsta stanica (pleotropizam), a nekoliko citokina može na istu stanicu imati isto djelovanje (redundancija). Citokini se obično svrstavaju u četiri glavne skupine: interleukine, interferone, citoksine i čimbenike poticanja rasta kolonija. Prema funkciji, moguće ih je podijeliti na proupalne, imunopoticajne, imunosupresijske (inhibicijske) i čimbenike rasta hematopoetskih stanica. TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-8 najvažniji su proupalni citokini koje uglavnom luče makrofagi nakon ozljede tkiva. Ti citokini uzrokuju nakupljanje upalnih i imunosnih stanica na mjestu ozljede aktivacijom endotela, poticanjem kemotaksije i povećanom ekspresijom adhezijskih molekula. U bolesnika s aterosklerozom utvrđene su povišene vrijednosti interleukina IL-6 i IL-10. Interleukin-6 (IL-6) citokin koji potječe iz različitih tkiva, različitih stanica uključujući fibroblaste, makofage,

adipocite i endotelne stanice, igra bitnu ulogu u akutnoj fazi upalnog odgovora i stimulira stanice jetre na produkciju reaktanata akutne rane faze upale među njima i CRP-a. Ovaj citokin ima važnu ulogu u smanjenju upalnih procesa poticanjem stvaranja protuupalnih citokina i negativnom regulacijom upalnih ciljeva pa se klasificira kao pro- i protuupalni, do određenog stupnja, te u akutnoj fazi djeluje obrambeno, dok u kasnijoj kroničnoj fazi ima proupalna svojstva. Visoke koncentracije IL-6 u serumu povezuju se s debljinom, šećernom bolešću, hipertenzijom. IL-6 je povezan s nekolicinom markera endotelne disfunkcije, kao što su kemokini i adhezijske molekule. Ovi citokini mogu biti i jesu osnova upalne patogeneze koronarne bolesti te intimo-medijalnog zadebljenja karotidnih arterija (IMT). Gen za *IL-6* smješten je na kratkom kromosoma 7 (7p21). Istraživani su različiti polimorfizmi u promotorskoj regiji, no najčešće je istraživani *IL6* -174G>C (rs1800795) zbog najveće učestalosti, ali i funkcije u transkripciji. Učestalost pojave varijantnog alela različita je u etničkim i rasnim skupinama. U bijelaca iznosi oko 0.5, dok u Afroamerikanaca iznosi 0.93 (92). Povezanost između pojedinih varijanti gena *IL-6* i moždanog udara su ispitivane u mnogim studijama. Najčešće analizirani polimorfizam je -174G>C. Moždani udar trigerira akutni upalni odgovor te su kod pacijenata u akutnoj fazi moždanog udara zabilježene povišene vrijednosti reaktanata akutne faze upale poput CRP-a i fibrinogena (93,94). Cerebralna ishemija inducira ekspresiju IL-6 u neuronima i astrocitima (95). Korelaciju između IL-6 i CRP, IL-6 i fibrinogena, IL-6 i porasta tjelesne temperature upućuju i podržavaju činjenicu uloge gena *IL-6* u regulaciji upalnog odgovora kod pacijenata s moždanim udarom (96). Već navedeni polimorfizam -174G>C pokazao se značajan u povezanosti s Alzheimerovom bolešću i lakunarnim moždanim udarom (97). Rundek T pokazali su statistički značajnu povezanost polimorfizma *IL-6* i IMT kod muškaraca homozigota za G alel kod kojih je učestalost IMT bila za 11% veća od nosioca C alela. Ovo potvrđuje povezanost -174G genotipa i učestalosti pojave IMT (98). No nasuprot navedenom, u studiji provedenoj na grupi Australaca (dobi <53godine) nađena je povezanost alela -174C i razvoja IMT (99). Studija provedena u Irskoj pokazala je da CC genotip ima ulogu protektivnog agenta kod bolesnika s moždanim udarom koji u ranijoj anamnezi nisu imali hipertenziju kao riziko faktor (100). Yeqing T i sur. su pokazali značajnu pojavnost polimorfizma -174G>C *IL-6* gena kod pacijenata s moždanim udarom (101). Objašnjenje ovih kontradiktornosti i dalje u potpunosti nije razjašnjeno te se eventualno pripisuje karakteristikama ispitivane populacije ili malom uzorku. Ukoliko buduće studije ne dokažu i ne razjasne ovu diskrepanciju, povezanost između polimorfizma gena *IL-6* i IMT, a samim time pojave inzulta, i dalje ostaje nerazriješena do kraja te su potrebna daljnja istraživanja.

1.8.3. Gen sustava renin-angiotenzin, *ACE*

Renin-angiotenzin sustav (RAS) ima više funkcija, no najvažnija je regulacija krvnog tlaka i intravaskularnog volumena. RAS predstavlja kompleksni hormonski sustav koji regulira promet tekućina, elektrolita i arterijski tlak (102). Molekularna genetika hipertenzije ide u nekoliko smjerova i dovela je do otkrivanja gena vezanih za ATP-azu i mehanizam poremećenoga membranskog transporta kationa, zatim renin-angiotenzinski sustav, kateholamine kao vazokonstriktore i vazodilatatore, kalikrein i atrijske natriuretske čimbenike. Većina značajnih učinaka RAS vrši se preko peptid angiotenzina II, koji nastaje nizom proteolitičkih reakcija iz angiotenzinogena. Renin je proteolitički enzim koji se sintetizira u jukstaglomerularnim stanicama bubrega i izlučuje u cirkulaciju. Angiotenzinogen se sintetizira u jetri djelovanjem renina i prelazi u inaktivni prohormon angiotenzin I. Angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) je dipeptid-karboksipeptidaza koja ima dvostruku funkciju: hidrolitički odcjepljuje dipeptid-histidil-leucin iz dekaeptida angiotenzina I stvarajući oktapeptid-angiotenzin II koji ima neposredno vazokonstriktivni učinak, a djeluje i na lučenje aldosterona. Slijedi hidrolitičko djelovanje na bradikinin tako što sekvencijalno odcjepljuje najprije terminalni dipeptid fenilalanin-arginin, a zatim seril-prolin i time inaktivira vazodilatacijsko djelovanje bradikinina. ACE se uglavnom nalazi na endotelu krvnih žila, epitelu, mononuklearima i makrofagima. Angiotenzin II i bradikinin dva glavna peptida bitna za modulaciju tonusa krvnih žila i proliferacije glatkih mišićnih stanica (103). Gen za *ACE* smješten je na kromosomu 17q23, obuhvaća 26 eksona i zauzima 21 kb genoma. Najčešća varijanta gena *ACE* je insercijsko/delecijski (I/D) polimorfizam (rs 4646994). Prisutnost (I) ili odsutnost (D) ulomka od 287 parova baza Alu ponavljajućeg slijeda unutar introna 16 određuje tri različita genotipa: I/I, I/D, D/D. *ACE*-delecijski alel povezan je s povećanom aktivnošću ACE u plazmi, limfocitima i u kardijalnome tkivu. Povećana koncentracija ACE u plazmi predstavlja bitan čimbenik koji utječe na pojavnost cerebro i kardiovaskularnih bolesti, s obzirom na to da kronična izloženost visokim razinama ACE u konačnici rezultira zadebljenjem i krutošću stijenke krvnih žila (104). Uočena je prevalencija genotipa *ACE* D/D u bolesnika s anamnezom infarkta miokarda, arterijskom hipertenzijom, ishemijskom kardiomiopatijom, s angiografski verificiranom koronarnom bolešću, restenozom nakon angioplastike i bolesnika sa šećernom bolešću, zadebljanjem karotidnih arterija i bubrežnom bolešću. U bolesnika s hipertrofijskom kardiomiopatijom, kao i u bolesnika s dilatacijskom kardimiopatijom potvrđeno je da pojedinci s genotipom *ACE* D/D imaju veću masu lijevoga ventrikula nego osobe s ostalim *ACE*-genotipovima. Također je pokazana pozitivna veza DD genotipa s ishemijskim moždanim udarom, težinom

kliničke slike, te s IMT (105). U središtu istraživanja je nadalje polimorfizam *ACE I/D* kao kandidat za kardiovaskularne, cerebrovaskularne bolesti, hipertenziju. Mnoge studije su analizirale povezanost pojave cerebrovaskularnih bolesti: moždanog udara, zadebljenja karotidnih arterija, lezija vidljivih na magnetskoj rezonanci i genotipa *ACE I/D*. Meta-analiza provedena u Kini koja je uključila 10070 pacijenata s moždanim udarom i 22103 kontrola a analizirala utjecaj polimorfizma *I/D* na pojavnost istog, pokazala je značajnu korelaciju (106). S druge strane, studija provedena u Španjolskoj nije uspjela dokazati isto, kao ni studija provedena u Poljskoj koja je također analizirala utjecaj polimorfizma *I/D ACE* gena na pojavnost moždanog udara (107). Uzevši u obzir multifaktorsku prirodu cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti, jedna genska varijanta neurohormonskog sustava nije dovoljna da bi se smatrala predominantnim uzorkom. Genska varijanta kao što je alel *D* mora se promatrati u kontekstu s drugim genima. Nadalje, ove različite etiološke komponente mogu stupati u interakciju jedna s drugom, rezultirajući neutralizacijom ili amplifikacijom genskih učinaka u ranoj fazi kardioresnalnog kontinuuma, ukazujući na mogućnost ranog liječenja i usporavanja razvoja hipertenzije, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti.

1.8.4. Gen *APOE*

Između niza gena kandidata za razvoj cerebrovaskularnih bolesti i ateroskleroze značajnu ulogu ima gen za apolipoprotein E. *E4* varijanta istog gena koja je udružena s porastom razine ukupnog kolesterola i LDL-a, smatra se potencijalnim rizičnim čimbenikom u razvoju IMT, a samim time i mogućeg razvoja moždanog udara (108). Apolipoprotein E (*ApoE*) sastavni je dio hilomikrona, VLDL-a, IDL-a i HDL-a. Riječ je o polipeptidu koji se primarno sintetizira u jetri i mozgu, ali i u drugim tkivima. Ima ulogu posredovanja u vezanju lipoproteina na LDL-receptor, receptor za hilomikrone i neke receptore na površini trombocita, time sudjeluje u homeostazi kolesterola i triglicerida. Apolipoprotein E utječe na unutarstanični transport lipoproteina zajedno s heparan-sulfat-proteoglikanima, a može stimulirati i proliferaciju limfocita T. Gen za *ApoE* smješten je na 19. kromosomu, a čine ga četiri eksona i tri introna od 3597 nukleotida. Genske varijacije *ApoE* lokusa (*E2*, *E3* i *E4*) razlikuju se u troslovnim zapisima gena i u skladu s tim i aminokiselinskoj sekvenci arginina i cisteina na mjestima 112 i 158. *ApoE3* ima cistein na mjestu 112 i arginin na mjestu 158, *Apo E2* ima cistein, a *ApoE4* arginin na oba mjesta, što rezultira sa šest zajedničkih fenotipova i genotipova, tri homozigotna i tri heterozigotna; *E2/2*, *E3/3*, *E4/4*, *E2/3*, *E2/4*, *E3/4*. Najčešći genotip je *ApoE3/3* i pojavljuje se kod otprilike 80% zdrave populacije (normalni genotip). *ApoE2/2* homozigotni genotip povezan je s hiperlipidemijom tipa III koja je uzrok koronarne bolesti u ranijoj

dobi u 5% slučajeva, dok se heterozigotne varijante Apo E2/3 i ApoE2/4 povezuju s obiteljskom hiperkolesterolemijom. Identifikacija alela ApoE2 kao rizičnog čimbenika kardiovaskularnih bolesti ima prediktivno značenje i pomaže u prevenciji bolesti. Homozigotni genotip ApoE4/4 i heterozigotni oblik ApoE3/4 povezani su s povišenim kolesterolom, koji pridonosi razvoju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti. Utvrđeno je češće pojavljivanje genotipa ApoE3/4 i ApoE4/4 kod infarkta miokarda u muškaraca srednje dobi, te kod angiografski utvrđene ateroskleroze i razvoja moždanog udara. Alel E4 znatno povećava koncentraciju kolesterola pridonoseći relativnoj predispoziciji za aterosklerozu, a pojavnost tog alela veća je u osoba s kardiovaskularnom bolešću. Mnoge studije analizirale su utjecaj i povezanost ovog gena s razvojem IMT, a samim time pojave moždanog udara, pri tome stavljajući naglasak na E4 alel. Elosua R i suradnici u studiji Framingham Offspring pronašli su da je alel E2 udružen s nižom stopom pojavnosti karotidne ateroskleroze, dok je alel E4 kod muškaraca s dijabetesom povezan s većom učestalošću IMT (109). Provedena meta-analiza od strane McCarron MO i sur. pokazala je značajnu povezanost E4 alela i moždanog udara (110). Studija provedena u Belgiji analizirala je povezanost gena *ApoE* i ishemijskog moždanog udara, odnosno intrakranijske subkliničke ateroskleroze. Ista je pokazala značajnu pozitivnu vezu između ApoE4 alela i intrakranijske ateroskleroze, a negativnu s pojavom moždanog udara (111). Nedavna studija provedena među mlađom populacijom Talijana pokazala je da ApoE E4 alel i pušenje cigareta djeluju sinergistički, povećavajući vjerojatnost za razvoj ishemičnog cerebralnog inzulata kod pojedinca (112). Szolnoki Z i suradnici u provedenoj studiji također su pokazali da prisutnost E4 alela djeluje sinergistički s pušenjem, hipertenzijom, dijabetesom, kao i konzumiranjem visokih količina alkohola na razvoj ishemičnog cerebralnog inzulata (113). Unatoč postojanju dokaza o povezanosti gena *ApoE* i razvoja cerebrovaskularnih bolesti, radi što preciznije procjene utjecaja istog potrebna su daljnja istraživanja.

1.8.5. Gen *MTHFR*

Hiperhomocisteinemija je rizični čimbenik za razvoj ateroskleroze i njenih komplikacija poput infarkta miokarda, moždanog udara, periferne bolesti krvnih žila. Studije in vitro pokazale su da homocistein dovodi do oštećenja endotela i potiče proliferaciju glatkih mišićnih stanica (114). Nadalje, utječe i na komponente ekstracelularnog matriksa, lipoproteinske oksidacije, utječe na funkcije trombocita i proces koagulacije. Enzim metilentetrahidrofolat-reduktaza (*MTHFR*) katalizira demetilaciju N¹⁰-metilentetrahidrofolata u N⁵-metiltetrahidrofolat, koji je glavni oblik

folata u cirkulaciji. Produkt ove reakcije, N5-metiltetrahydrofolat, glavni je donator metilne skupine pri remetilaciji homocisteina u metionin tako da je MTHFR jedan od regulacijskih enzima u metabolizmu tetrahydrofolata i sintezi nukleinskih kiselina. Poremećaj u aktivnosti enzima MTHFR dovodi do hiperhomocisteinemije i niske razine metionina. Blokiranje remetilacije homocisteina u metionin dovodi do poremećaja rasta, diferencijacije i funkcioniranja stanica zbog nemogućnosti sinteze nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Homocistein je jedan od metaboličkih produkata aminokiseline metionina. Nastaje demetilacijom metionina koji u organizam dopijeva hranom. Metionin je jedini izvor homocisteina. U cirkulaciji se nalazi većinom vezan za plazmatske proteine, najviše za albumin (70–90 %), manjim dijelom u obliku disulfida (10–30 %), a tek se 1–2 % nalazi slobodno u reduciranom obliku. Ako postoji potreba za metioninom, homocistein ulazi u remetilacijski ciklus i prelazi u metionin pomoću enzima metionin-sintaze uz vitamin B12 kao kofaktor i N5-metiltetrahydrofolat kao supstrat koji nastaje u reakciji koju katalizira MTHFR. U fiziološkim uvjetima svi oblici homocisteina filtriraju se u bubregu, reapsorbiraju i oksidacijski kataboliziraju, tako da se mokraćom ne izlučuju znatnije količine homocisteina. Uzrok povećane koncentracije homocisteina u plazmi može biti promjena aktivnosti enzima koji sudjeluju u njegovu metabolizmu, manjak folne kiseline i vitamina B12 i toksini (dim cigarete). Gen za *MTHFR* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1p36.3. Točkasta mutacija gena *MTHFR* C677T, zamjena u jednom paru baza (677C→T) prediktor je fenotipske ekspresije produkta s niskom enzimatskom aktivnošću, što je nadalje povezano s visokom koncentracijom homocisteina u plazmi i stoga se smatra idealnim kandidatom genskog polimorfizma za razvoj ishemijskog infarkta (115). Mnoge studije analizirale su polimorfizam ovog gena koji rezultira razvojem predispozicije za pojavu moždanog udara kao i IMT. Neke od njih dokazale su povezanost polimorfizma gena *MTHFR*, razvoja IMT i ishemijskog moždanog udara (116,117), dok su neke studije u tome bile neuspješne (118). Tri nedavno provedene studije otkrile su povezanost između alela T i rizika od moždanog udara, što nadalje podržava ulogu *MTHFR* gena koji svojim polimorfizmom povećava razinu homocisteina, a samim time utječe na pojavu moždanog udara (119,120). Nekoliko studija pokazalo je pozitivno ovisan odnos između serumske razine homocisteina i rizika razvoja moždanog udara (121). Točkasta mutacija C677T u genu *MTHFR* udružena je s povećanom razinom homocisteina u plazmi kao i s rizikom razvoja moždanog udara, prema objavljenim radovima (122–124). Najnovija su istraživanja pokazala da točkastu mutaciju C677T poremećaja *MTHFR* možemo smatrati rizičnim i epigenetskim biljekom u regenerativnoj medicini.

2. Hipoteza

Varijabilnost gena, kao što su *APOE* polimorfizam E2, E3, E4; *ACE* polimorfizam insercijsko/delecijski (I/D); *IL-6* polimorfizam -174G>C ; *MTHFR* točkasta mutacija C677T, može u interakciji s *PPAR γ* polimorfizam Pro12Ala utjecati na fenotipski izražaj različitih rizičnih čimbenika ateroskleroze, a posljedično cerebrovaskularnog inzulta.

3. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja je proširenje spoznaja o genomskim biljezima i njihovim međusobnim odnosima koji bi mogli imati važnu ulogu u nastanku i moduliranju rizičnih faktora u razvoju ateroskleroze i cerebrovaskularne bolesti – ishemijskog moždanog udara.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti prediktivnu vrijednost nekih varijabilnih oblika gena kao rizičnih čimbenika CVI.
2. Ispitati interakcije između varijanti gena transkripcijskog faktora *PPAR γ* i njegovih ciljnih gena *IL-6*, *ACE*, *APOE* i *MTHFR* te čimbenika okoliša i njihovu povezanost s razvojem ishemijskog moždanog udara.
3. Ustanoviti ulogu pojedinih i ukupnih genskih varijanti te interakcija gen – gen i gen – okoliš kao prediktivnih čimbenika rizika.

4. Ispitanici i metode

4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u razdoblju između rujna 2009. i siječnja 2012. godine. U istraživanju je sudjelovao ukupno 301 ispitanik (157 žena i 144 muškarca) hrvatskoga podrijetla, uključujući 114 bolesnika s ishemijskim moždanim udarom i 187 zdravih ispitanika. Grupa ispitanika uključila je pacijente hospitalizirane na Klinici za neurologiju, pod kliničkom slikom akutnog ishemijskog moždajnog udara, dok su zdravi ispitanici odabrani između članova bolničkog osoblja Kliničkog bolničkog centra koji su obavljali redoviti sistematski pregled, a koji su antropometrijski i sociodemografski bili što usklađeniji s ispitanicima. Provedeno istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb u okviru projekta "Funkcijska genomika i proteomika rizičnih čimbenika ateroskleroze". (108-1080134-0136) Svi ispitanici uključeni u istraživanje potpisali su obrazac o dobrovoljnom pristanku nakon detaljnog informiranja o svrsi i tijeku ispitivanja. U istraživanje su uključeni pacijenti koji su zadovoljavali sljedeće kriterije: 1) dob 18-65 godina, 2) Kompjutoriziranom tomografijom (Computed Tomography - CT) dokazan ishemijski moždani udar. Kriteriji za isključivanje bili su: 1) Diabetes mellitus (DM); 2) hemoragijski moždani udar 3) Dob > 65, te 4) indeks tjelesne mase (BMI) >30. Rizični faktori koje smo pratili unutar obiju skupina bili su:

1. hipertenzija, tj. vrijednost arterijskog krvnog tlaka RR >140/90 mmHg (prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji)
2. hiperlipidemije: vrijednost kolesterola iznad 5.0 mmol/L, LDL kolesterola iznad 3.0 mmol/L, te vrijednost triglicerida iznad 1.7 mmol/L
3. indeks tjelesne mase (BMI) > 30 kg/m² (The American Heart Association)
4. pušenje: aktivni pušači zadnjih 5 godina
5. tjelesne aktivnosti: manje od 30 min. dnevne aktivnosti 3-4 puta u tjednu (šetnja, brzo hodanje, vožnja biciklom, itd.) (The American Heart Association ili The American College of Sports Medicine)

U slučaju da su sudionici uzimali lijekove, primijenjene su formule radi korekcije onih biokemijskih i kliničkih parametara na koje su lijekovi mogli utjecati. Primijenjene formule su rezultat velikog broja kliničkih ispitivanja (125,126). Tako su vrijednosti sistoličkog (SBP) i dijastoličkog (DBP) krvnog tlaka za ispitanike koji su uzimali antihipertenzivnu terapiju korigirane

prema formuli: SBP +14.8 mmHG i DBP +10.5 mmHG. Vrijednosti triglicerida i HDL kolesterola korigirane su prema formuli: TG/(1-15.2/100) i HDL/(1+6.1/100). Svi anamnestički podaci ispitanika, podaci o obiteljskoj anamnezi (kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, debljina), podaci o uzimanju lijekova, nalazi fizikalnog pregleda, upisivani su u za to sastavljen obrazac prilagođen za računalnu obradu podataka. Svim ispitanicima zabilježeni su podaci o dobi, spolu, tjelesnoj težini, visini pojedinca, kao i sociodemografski podaci. Antropometrijska mjerenja su uključivala mjerenja tjelesne težine, visine te mjerenje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka. Indeks tjelesne mase (BMI) izračunat je tako da se tjelesna masa izražena u kilogramima podijelila s kvadratom tjelesne visine izražene u metrima. Učinjene su standardne hematološke, koagulacijske i biokemijske pretrage krvi, neuroradiološka obrada, te molekularno genetičke pretrage u sklopu specijalne laboratorijske dijagnostike rizičnih čimbenika ateroskleroze (ACE, APO-E, MTHFR, PPAR- γ , IL-6).

4.2. Metode

U istraživanju su korišteni sljedeći analitički postupci:

1. izdvajanje genomske DNA iz pune krvi; metoda isoljavanja
2. analiza DNA: PCR/RFLP; PCR u stvarnom vremenu; kapilarna elektroforeza

4.2.1. Analitički uzorci

Za biokemijsku analizu korišten je svježi serum, ispitanicima je uzeto 5 ml svježe krvi natašte u epruveti bez antikoagulansa. Za izdvajanje DNA korištena je puna krv s antikoagulansom EDTA, 5 ml svježe krvi, pohranjene na +4 °C ili pohranjene na -70 °C

4.2.2. Biokemijske analize

Koncentracije ukupnog kolesterola (TC), triglicerida (TG), HDL, LDL kolesterola i razina glukoze u serumu određivane su standardnim biokemijskim metodama na automatskom analizatoru Olympus AU2700 (Olympus, Tokyo, Japan). Vrijednost ukupnog kolesterola određivana je spektrofotometrijski s kolin-esterazom (CHOD-PAP metoda), enzimskim kolorimetrijskim testom za kliničko kemijske analizatore uz korištenje komercijalnog kompleta reagensa Olympus System reagent 800. Koncentracija HDL kolesterola je određivana iz seruma Qunatolip taložnom metodom na automatskom analizatoru uz korištenje komercijalnog Qunatolip Immuno AG kompleta

reagensa (Vienna, Austria). Koncentracija TG-a u serumu je određivana spektrofotometrijski s glicerolfosfat-oksidadom (GPO-PAP metoda), enzimskim kolorimetrijskim testom za kliničko-kemijske analizatore uz korištenje komercijalnog kompleta reagensa Olympus System reagent 800. Koncentracija LDL kolesterola u serumu određivana je računski neizravnom metodom prema Friedewaldovoj jednadžbi: $c(\text{LDL-C})=c(\text{TC})-[c(\text{TG})/2,2]-c(\text{HDL-C})$

Napomena:

Jednadžba se ne može primijeniti ako su u serumu prisutni hilomikroni i ako su koncentracije TG-a u serumu veće od 4.6 mmol L^{-1} (izračunate vrijednosti za LD kolesterol su preniske). U tom slučaju LDL-C je određen homogenom metodom s kolesterol-esterazom i kolesterol-oksidadom (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Koncentracija glukoze određivana je spektrofotometrijski (pri valnoj duljini od 500 nm) s glukoza-oksidadom (GOD-PAP metoda) uz korištenje kompleta reagensa Olympus System Reagent 800. Navedene biokemijske analize provedene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2.3. Analiza DNA

Pribor:

- Za izdvajanje DNA: sterilne plastične epruvete od 50 mL sa čepom (GE Healthcare, Švedska)
- Za izdvajanje i pohranu DNA: sterilne epruvete od 2 mL sa čepom (Eppendorf, Njemačka)
- Za umnožavanje DNA: sterilne polipropilenske epruvete od 0.2 ml (Eppendorf, Njemačka)
- Sterilna Pasteurova pipeta, sterilno stakleno posuđe: Erlenmayerova tikvica, čaša
- Automatske pipete volumena 1-100 μL (Eppendorf, Njemačka), sterilni nastavci za automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije za izdvajanje DNA:

- Za hemolizu (za pripremu 1000 mL otopine): NH_4Cl (155 mM) 82.9 g (Merk); KHCO_3 (10 mM) (Merk); Na_2EDTA (1 mM) 3.72 g (Kemika); Sterilna, destilirana H_2O , dopuniti do 1000 mL.
- Za raspršivanje staničnog taloga STE-otopina (S-sodium; T-tris; E-EDTA) (za pripremu 1000 mL otopine): Tris (10 mM) 12.1 g (Merk); NaCl (75 mM) 43.83 g (Merk); Na_2EDTA (24 mM) 89.33 g (Kemika); Sterilna, destilirana H_2O , dopuniti do 1000 mL.

- Zasićena otopina NaCl (100 mL otopine): NaCl 35 g; Sterilna, destilirana H₂O, dopuniti do 100 mL
- Enzim za razgradnju proteina (za pripremu 50 mL otopine), otopina pronaze: Na 1 g pronaze izdvojene iz vrste *Streptomyces griseus* (Roche) dodati sterilnu destiliranu vodu do volumena 50 mL. Autodigestirati u termostatu 2h na 37°C. Razdijeliti otopinu u plastične epruvete volumena 1.5 mL. Čuvati pri temperaturi -20°C.
- 10%-tna otopina natrijevog dodecil-sulfata (SDS) (za 500 mL otopine): SDS 50 g (Roche); Sterilna, destilirana H₂O, dopuniti do 500 mL.
- 100%-tni etanol.
- Tris-EDTA pufer (TE-pufer) (za pripremu 1000 mL pufera): Tris (10 mM) 1.21 g (Merk); Na₂EDTA (1 mM) 0.37 g (Kemika); Sterilna, destilirana H₂O, dopuniti do 1000 mL; Podesiti pH na 7.5 sa HCL.

Kemikalije za umnažanje DNA:

- *Taq* Dna polimeraza (Roche Diagnostics, Njemačka);
- 10x PCR pufer, 25 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics, Njemačka);
- dNTP smjesa: 100 mM ATP, 100 mM TTP, 100 mM GTP i 100 mM CTP (Roche Diagnostics, Njemačka);
- Početnice (Tib MolBiol, Njemačka);
- Restriksijske endonukleaze s pripadajućim puferom (Roche, NewEngland Biolabs);
- Molekularni biljeg XIII (Roche Diagnostics, Njemačka);
- Agaroza (Invitrogen, SAD);
- H₂O sterilna destilirana.

Oprema:

- Centrifuge 5810R (Eppendorf, Njemačka) – uređaj za centrifugiranje s hlađenjem;
- Termostat - Heratherm (Thermo Scientific, SAD);
- Centrifuga – Heraeus Biofuge Pico (Thermo Scientific, SAD);
- Termoblok GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD);
- Vibracijska miješalica, Techno Kartell (Koetterman, Njemačka);
- Uređaj za vorteksiranje (BioRad, SAD);

- Vodena kupelj, HumAqua 5 (Human, Njemačka);
- Sustav za elektroforezu (Sub-Cell 96, BioRad, SAD);
- Uređaj za vizualizaciju i snimanje gelova, G-Box (Syngene, Velika Britanija).

4.2.3.1. Izdvajanje DNA metodom isoljavanja

Izdvajanje genomske DNA iz pune krvi provedeno je prema metodi Millera i suradnika (127). Metoda se temelji na izdvajanju limfocita iz uzorka periferne krvi, lizi stanica te enzimskoj i kemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega slijedi taloženje DNA u apsolutnom etanolu.

Postupak:

U epruvetama sa čepom volumena 50 mL na 5 mL krvi dodano je 30 mL pufera za hemolizu. Sadržaj epruvete je pažljivo promiješan i inkubiran 20 min na ledu (-20°C). Zatim je uzorak centrifugiran 10 min na 4000 rpm pri temperaturi +4°C. Supernatant je odstranjen, a preostali talog je dobro ispran s 10 mL pufera za hemolizu 1x i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Čisti talog je zatim snažnim protresanjem raspršen u 3 mL STE-liza pufera. Potom je dodano 400 µL 10% otopine natrijevog dodecyl sulfata (SDS-a), te 200 µL pronaze. Smjesa je lagano promiješana i inkubirana na 37°C preko noći. Nakon inkubacije proteini i ostaci stanica uklonjeni su izoliranjem, koje je provedeno dodavanjem 1 mL zasićene otopine NaCl te snažnim miješanjem i centrifugiranjem 10 minuta na 4000 rpm. Supernatant je nakon centrifugiranja prenesen u čistu epruvetu od 50 mL i oprezno mu je dodano 10 ml hladnog apsolutnog etanola. Blagim okretanjem epruvete na površinu je isplivala DNA te je pažljivo uz pomoć Pasteurove pipete prenesena u semimikro epruvetu od 1,5 ml i stavljena na sušenje u termostatu na +37°C, 1 sat dok etanol ne ispari. DNA je zatim otopljena u 500 µL pufera Tris-EDTA (TE-pufer) i stavljena na inkubaciju preko noći na 37°C. Tako izdvojena DNA čuvana je na temperaturi od +4°C otopljena u TE-puferu ili na -20°C u apsolutnom etanolu.

4.2.3.2. Genotipizacija

Postupak:

Genotipizacija polimorfizama *PPARγ* Pro12Ala, *IL-6* -174G/C provedena je metodom PCR-reakcija polimerazom – (polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka)

Genotipizacija polimorfizama *MTHFR* C677T, *ACE* I/D i *APOE* E2/E3/E4 provedena je

metodom PCR (engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom)

Načelo PCR metode:

Glavni princip PCR reakcije je u eksponencijalnom umnažanju dijelova DNA koji sadrže gene od interesa. Analiza mogućih genskih promjena (mutacija, delecija, translokacija) provodi se na umnoženim produktima. Uz prisutnost enzima DNA-polimeraze, odgovarajućih oligonukleotidnih početnica, deoksiribonukleotid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i iona Mg^{2+} selektivno povećavamo količinu ciljanog fragmenta. PCR postupak sastoji se od tri faze:

1. Denaturacija DNA zagrijavanjem na 94-96°C, pri čemu nastaje jednolančana DNA
2. Vežanje (engl. *annealing*) početnica pri temperaturi 50-65°C
3. Sinteza novog lanca komplementarnih regija DNA omeđenoj početnicama pomoću termostabilne polimeraze na temperaturi od 72°C

U sljedećem ciklusu novostvorene molekule DNA postaju kalup. Da bi se dobilo dovoljno genetičkog materijala za sljedeće analize umnažanje se provodi kroz 25-35 ciklusa. Optimalni uvjeti za svaku PCR reakciju tj. koncentracije DNA-polimeraze, početnica, Mg^{2+} i genomske DNA, te temperature i vrijeme pojedinih faza ciklusa ovise o analitičkom sustavu i ispituju se za svaki pojedini ulomak DNA. Nakon umnažanja 5 μ L PCR umnoška analizira se u 2% agaroznom gelu s etidijevim bromidom. Kod PCR-RFLP metode pozitivni uzorci se podvrgavaju daljnoj analizi odnosno razgradnji inkubacijom s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama, što rezultira ulomcima različite duljine ovisno o genotipu. Heterozigotne osobe imaju ulomke tipične za "divlji tip" (engl. *wild type*) i mutirane alele. Digestirani uzorak razdvaja se u 2-4% gelu. Zajedno s uzorcima na gel se nanosi i molekularni biljeg od 50-750 pb (molekularni biljeg XIII) koji služi kao standard duljine ulomaka. Nakon provedene elektroforeze na uređaju za vizualizaciju gelova (G-box), uspoređuju se vrpce DNA uzoraka s vrpcama molekularnog biljega DNA. Reakcije PCR rađene su na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Genotipizacija polimorfizma PPAR γ Pro12Ala

Metoda PCR-RFLP korištena je za dokazivanje alela PPAR γ Pro i Ala (128).

Primarni uzorak / spremnik: venska krv/ epruveta s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA (ljubičasti čep) za vensku krv.

Tablica 1. Oprema i reagensi:

R. br.	Reagens	Proizvođač	Kataloški broj
1.	Taq DNA polymerase 5 U/ μ L ili Taq DNA polymerase 1 U/ μ L	Roche	11 146 165 001
	10X PCR buffer		11 647 687 001
2.	Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade, 100 mM	Roche	11 969 064 001
3.	DNA Molecular Weight Marker XIII (50-750 bp) 50 parova baza	Roche	11 721 925 001
4.	Agarosa GellyPhor LE	EuroClone	EMR010100
5.	10X NE2 buffer	BioLabs	R0518S
6.	BSTU1 10 U/ μ L	BioLabs	R0518S
Početnice:		Proizvođač:	
R F	5'- GCC AAT TCA AGC CCA GTC -3'	Tib MolBiol	
PPAR R	5'- GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC - 3'	Tib MolBiol	

Kao referentni materijal upotrebljavala se pozitivna kontrola (u ovom slučaju heterozigot) i slijepa proba (voda).

Faza postupka: DNA za analizu izolirana je iz primarnog uzoraka, venska krv. Reagensi za pripremu PCR reakcijske smjese izvađeni su iz zamrzivača, otopljeni na sobnoj temperaturi, promiješani na mućkalici, centrifugirani 3-5 sekundi na 3000 rpm (okretaja u minuti) i pipetirani. PCR reakcijska smjesa se lagano promiješala pipetom nakon što su dodani svi sastojci, i centrifugirala 3-5 sekundi na 3000 rpm. Nakon dodavanja DNA uzorka u PCR reakcijsku smjesu, tubice smo vorteksirali i stavili u PCR termoblok na program amplifikacije DNA koji odgovara navedenoj pretrazi.

Tablica 2. Reakcijska smjesa

PCR PPAR -Sastojci reakcijske smjese (25 μ L)		
Mix:	Volumen [μ L]	Konc. u reak smjesi
steril. dest. voda	15,75	
10X PCR pufer (15 mM MgCl ₂)	2,5	1.5 mM
dNTP mix (5 mM)	2,5	0.5 mM
PPAR R (5 μ M)	1	0.5 μ M
PPAR F (5 μ M)	1	0.5 μ M
DNA	1	200 ng
Taq DNA Polymerase		
1 U/ μ L	1,25	
ili		
5 U/ L	0,25	0,05 U/ μ L

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler su:

program: DENATURACIJA			
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	cycles
1	94	600	1
program: AMPLIFIKACIJA			
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	Cycles
1 denaturacija	94	60	30
2 annealing	60	35	
3 ekstenzija	72	60	
program: FINALNA EKSTENZIJA			
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	Cycles
1	72	600	1

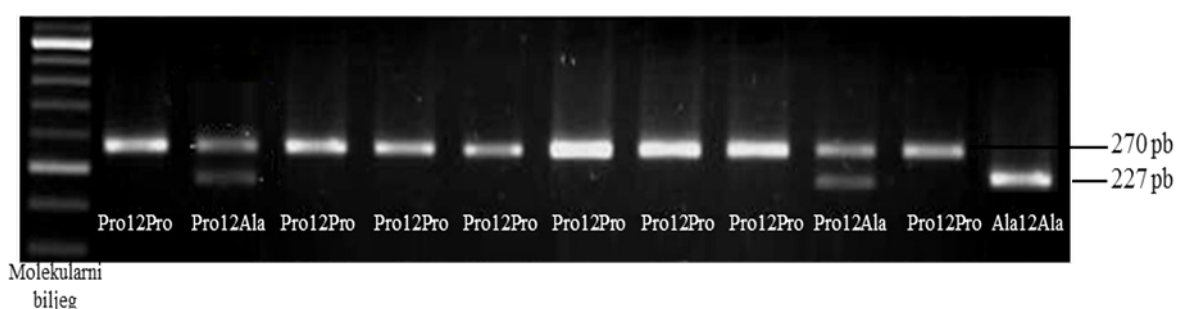
Analiza PCR produkta: provedena je na podlozi za elektroforezu koja se pripremila od 2% gela volumena 50 mL od GellyPhor EMR010100 agaroznog praha. U jačice gela nanijeli smo po 10 μ L PCR produkata uzoraka pomiješanih sa 2 μ L loading buffera. U jednu jačicu nanijeli smo 2 μ L molekularnog markera XIII pomiješanog sa 2 μ L loading buffera i 6 μ L destilirane vode ili 10X TBE pufera. Veličine DNA fragmenata određivali smo na G-box uređaju za snimanje gelova. Uz uzorke koji se ispituju nalazio se i kontrolni uzorak heterozigotnog genotipa. Elektroforeza je trajala oko 30 minuta na 110 V. Ako se PCR produkt umnožio, odnosno ako su se vidjeli DNA fragmenti na G-box uređaju, provodila se digestija PCR produkta. PCR produkt se preko noći digestira u vodenoj kupelji na 60°C.

Tablica 4. Reakcijska smjesa

Digestija PPAR Sastojci reakcijske smjese (10 μ L)		
Mix:	Volumen [μ L]	Konc. u reak smjesi
PCR produkt	5	
NE2 buffer	1	10X
BSTU1 (10 U/ μ L)	0,5	0,5 U/ μ L
ster. dest. voda	3,5	

Tablica 5. Interval izvještavanja rezultata

Genotip:	Broj baznih parova:
CC (Pro12Pro)	270
CG (Pro12Ala)	270/227
GG (Ala12Ala)	227



SLIKA 4. ANALIZA POLIMORFIZMA PPAR γ PRO12ALA

Genotipizacija polimorfizma IL-6 -174G>C

IL-6 genotipizacija provedena je PCR/RFLP metodologijom i elektroforezom u gelu agaroze (129).

Primarni uzorak/ spremnik: venska krv/ epruveta s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA (ljubičasti čep) za vensku krv.

Tablica 6. Oprema i reagensi

R. br.	Reagens	Proizvođač	Kataloški broj
1.	Taq DNA polymerase 5 U/μL ili Taq DNA polymerase 1 U/μL	Roche	11 146 165 001
	10X PCR buffer		11 647 687 001
2.	Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade, 100 mM	Roche	11 969 064 001
3.	DNA Molecular Weight Marker XIII (50-750 bp) 50 parova baza	Roche	11 721 925 001
4.	Agarosa GellyPhor LE	EuroClone	EMR010100
5.	10X NE4 buffer	BioLabs	R0125S
6.	Nla III 10 U/L	BioLabs	R0125S
7.	100X BSA (10 μg/μL)	BioLabs	R0125S
Početnice:		Proizvođač:	
IL-6 F	5'- TGA CTT CAG CTT TAC TCT TGT- 3'	Tib MolBiol	
IL-6 R	5'- CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG- 3'	Tib MolBiol	

Kao referentni materijal upotrebljava se pozitivna kontrola (u ovom slučaju heterozigot) i slijepa proba (voda). Da bi pretraga bila valjana, pozitivna kontrola mora biti proglašena pozitivnom, a slijepa proba mora biti bez znakova kontaminacije.

Faza postupka: DNA za analizu izolirana je iz primarnog uzorka, venska krv. Reagensi za pripremu PCR reakcijske smjese izvađeni su iz zamrzivača, otopljeni na sobnoj temperaturi, promiješani na mućkalici (osim enzima), centrifugirali su se 3-5 sekundi na 3000 rpm (okretaja u

minuti) i pipetirali. PCR reakcijske smjese su lagano promiješane pipetom nakon što su dodani svi sastojci, i centrifugirani 3-5 sekundi na 3000 rpm.

Tablica 7. Reakcijska smjesa

PCR IL-6 - Sastojci reakcijske smjese (25 µL)		
Mix:	Volumen [µL]	Konc. u reak smjesi
steril. dest. voda	15,75	
10X PCR pufer (15 mM MgCl ₂)	2,5	1.5 mM
dNTP mix (5 mM)	2,5	0.5 mM
IL-6 R (5 µM)	1	0.5 µM
IL-6 F (5 µM)	1	0.5 µM
DNA	1	100 ng
<u>Taq DNA Polymerase</u>		
1 U/ µL	1,25	
ili		0,05 U/L
5 U/ L	0,25	

Nakon dodavanja DNA uzorka u PCR reakcijsku smjesu, tubice smo vorteksirali i stavili u PCR termoblok na program amplifikacije DNA.

Tablica 8. Uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler su:

program: DENATURACIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	Cycles
1	94	600	1
program: AMPLIFIKACIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	Cycles
1 denaturacija	94	60	30
2 annealing	55	35	
3 ekstenzija	72	60	
program: FINALNA EKSTENZIJA			
broj segmenta	temperature target	hold time (sec)	Cycles
1	72	600	1

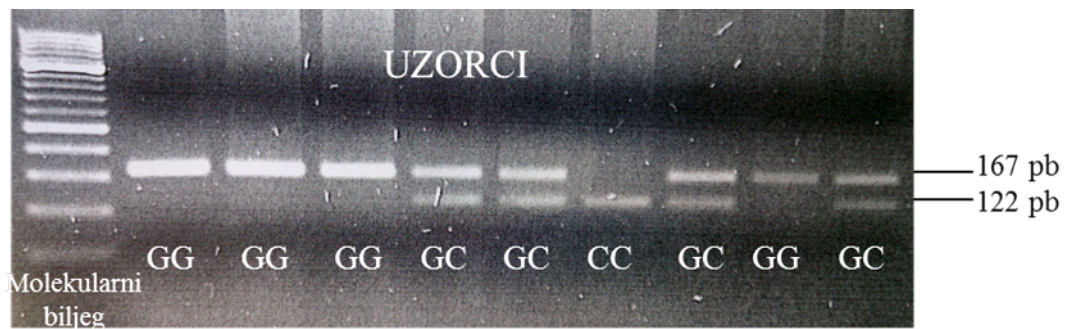
Analiza PCR produkta: provedena je na podlozi za elektroforezu koja se pripremila od 2% gela volumena 50 mL od GellyPhor EMR010100 agaroznog praha. U jačice gela nanijeli smo po 10 μ L PCR produkata uzoraka pomiješanih sa 2 μ L loading buffera. U jednu jačicu nanijeli smo 2 μ L molekularnog markera XIII pomiješanog sa 2 μ L loading buffera i 6 μ L destilirane vode ili 10X TBE pufera. Veličine DNA fragmenata određivali smo na G-box uređaju za snimanje gelova. Uz uzorke koji se ispituju, nalazio se i kontrolni uzorak heterozigotnog genotipa. Elektroforeza je trajala oko 30 minuta na 110 V. Ako se PCR produkt umnožio, odnosno ako su se vidjeli DNA fragmenti na G-box uređaju, provodili smo digestiju PCR produkta. PCR produkt se preko noći digestirao u termostatu na 37°C.

Tablica 9. Reakcijska smjesa

Digestija IL-6 Sastojci reakcijske smjese (10 μ L)		
Mix:	Volumen [μ L]	Konc. u reak smjesi
PCR produkta	5	
NE4 buffer	1	10X
Nla III (10 U/ μ L)	0,5	0,5 U/ μ L
10X BSA (1 μ M)	2	0,2 μ M
ster. dest. voda	1,5	

Tablica 10. Izvještaja rezultata

Genotip:	Broj baznih parova:
GG	167
GC	167/122
CC	122



SLIKA 5. ANALIZA POLIMORFIZMA IL-6 -174G>C

Genotipizacija polimorfizma ACE I/D

Utvrđivanje alela ACE I/D, provedeno je elektroforezom produkata PCR-a u agaroznom gelu.

Načelo mjerenja: Umnažanje odsječaka DNA od interesa PCR-om te njihova elektroforeza i vizualizacija u agaroznom gelu uz usporedbu s odgovarajućim molekularnim markerom kao standardom veličine.

Primarni uzorak: puna krv - stabilnost na 4°C 30 dana;

Sekundarni uzorak: vodena otopina

Tablica 11. Oprema i reagensi

Reagensi za PCR	Proizvođač	Pohrana i stabilnosti
Taq DNA polimeraza 5 U/μL 10X PCR reakcijski pufer sa 15 mM MgCl ₂	Roche	Pohraniti pri temperaturi od -15 do -25°C do datuma isteka roka trajanja označenog na kompletu reagenasa.
Set deoksinukleozid trifosfata, PCR Grade, 100 mM	Roche	Pohraniti pri temperaturi od -15 do -25°C do datuma isteka roka trajanja označenog na kompletu reagenasa.
Sterilna destilirana voda za PCR		
Početnice		
ACE-1-5'-CTG GAC ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' ACE-2-5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'	Tib- MolBiol	Dugotrajna pohrana u resuspendiranom i alikvotiranom obliku pri temperaturi -20 °C.

Koncentracija matičnih otopina početnica iznosi 100 μM (100 pmol/ μL).

Faza postupak: Reagensi su za pripremu reakcijske smjese PCR otopljeni na sobnoj temperaturi, promiješani u vrtložnoj mješalici (osim enzima), centrifugirani u mikrocentrifugi 3-5 sekundi kako bi se sadržaj bočica spustio na dno, te su pipetirani. Nakon što su dodani svi sastojci, PCR reakcijska smjesa lagano se promiješala protresanjem začepljene epruvete su potom centrifugirane u mikrocentrifugi 3-5 sekundi.

Tablica 12. Reakcijska smjesta

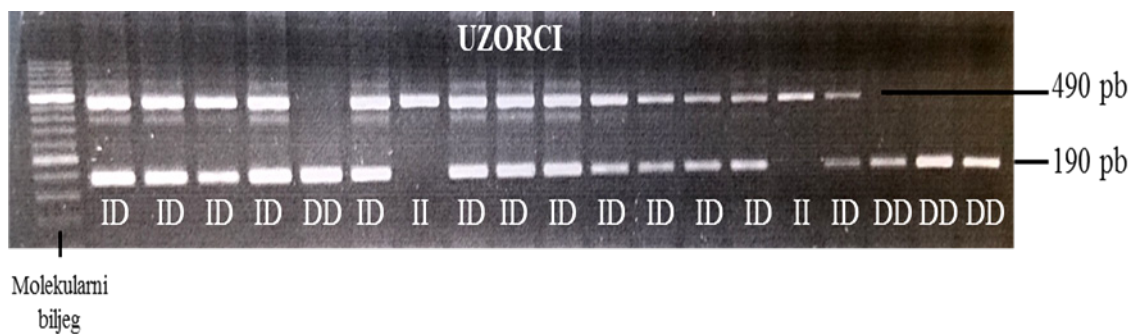
PCR ACE - Sastojci reakcijske smjese (Volumen 25 μ L)			
	Volumen [μ L]	Konačna koncentracija	
steril. dest. voda	12,3		
10X PCR pufer sa 15 mM MgCl ₂	2,5	1,5 mM	
Mješavina dNTP (5 mM ukupno)	2,5	0,5 mM	
ACE-1 (5 μ M)	2,5	0,5 μ M	
ACE-2 (5 μ M)	2,5	0,5 μ M	
DNA	2,5	200 ng	
Taq DNA polimeraza (5 U/ μ L)	0,2	1 U	

Nakon dodavanja uzorka DNA u PCR reakcijsku smjesu, PCR epruvete je začepljena, vorteksirana, kratko centrifugirana i stavljena u uređaj za PCR na program amplifikacije DNA pod nazivom ACE čiji su uvjeti navedeni u tablici:

Tablica 13. Uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler su:

program: DENATURACIJA			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusa
1	94	420	1
program: UMNOŽAVANJE			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusa
1 Denaturacija	94	60	25
2 Hibridizacija	58	60	
3 Ekstenzija	72	120	
program: FINALNA EKSTENZIJA			
Broj segmenta	Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Ciklusa
1	72	420	1

Za potrebe elektroforeze produkata PCR pripremili smo 1,5% agarozni gel volumena 100 mL. Kao standard veličine koristili smo molekularni marker XIII. Elektroforeza se odvijala u trajanju od 40 minuta pri uvjetima 110 V i 400 mA. Veličine i prisutnost odsječaka DNA određivali smo na uređaju za snimanje i analizu gelova G:BOX Syngene. Genotipizaciju smo provodili tako da smo u agaroznom gelu analizirali produkte reakcije PCR uspoređujući uzorak nepoznatog genotipa s odgovarajućim molekularnim markerom kao standardom veličinom i kontrolnim uzorkom DNA heterozigotnog genotipa za I/D polimorfizam. Veličine odsječaka DNA za I/D polimorfizam su: II genotip = 490 pb; DD genotip = 190 pb; ID genotip = 490 / 190 pb



SLIKA 6. ANALIZA POLIMORFIZMA ACE I/D

KRATICE: I - insercija, D - delecija ulomka od 287 parova baza Alu ponavljajućeg slijeda unutar introna 16

Genotipizacija polimorfizma *MTHFR* C677T

Genotipizacija točkaste mutacije C677T (Ala222Val) gena *MTHFR* provedena je umnažanjem DNA fragmenta od interesa lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time PCR) te njezinom detekcijom po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET) (engl. fluorescence resonance energy transfer).

Primarni uzorak / spremnik: venska krv / epruveta s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA (ljubičasti čep) za vensku krv.

Reagensi i oprema: Reagensi su pohranjivani na temperaturi od -15 do -25°C .

Tablica 14. Komplet reagensna

R. br.	Reagens	Proizvođač	Kat. broj
1.	LightCycler FastStart DNA Master Hyb Probe: LightCycler Fast-Start Enzim, 10X konc. LightCycler Fast-Start Reakcijska Smjesa HybProbe 10X konc.	Roche	03 003 248 001
2.	MgCl ₂ koncentrirana otopina (25 mM)	Roche	03 003 248 001
3.	Sterilna destilirana voda za PCR	Roche	03 003 248 001
4.	Početnice: MTH1: 5' CGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG 3' MTH2: 5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'	Tib- MolBiol	
5.	Probe: MTHFR-LC: 5`- LC Red640-CgggAgCCgATTTTCATCAT-PH (LC: LightCycler Red 640; PH: -3`- fosfat) MTHFR-FL:5`-TgACCTgAAgCACTTgAAggAgAAggTgTC- FL fluorescein)	Tib- MolBiol	

Prije uporabe LightCycler FastStart DNA Master Hyb Probe, otpipetirali smo 60 μL reakcijske smjese u tubicu koja sadrži Fast start enzim – konačna mješavina sadržavala je FastStart Taq DNA polimerazu, reakcijski pufer, dNTP smjesu (sa dUTP umjesto dTTP) i 10 mM MgCl₂.

Faza postupka: DNA za analizu izolirana je iz primarnog uzoraka: venska krv. Reagensi za pripremu PCR reakcijske smjese izvađeni su iz zamrzivača, otopljeni na sobnoj temperaturi, promiješani na mućkalici (osim enzima), centrifugirani 3-5 sekundi na 3000 rpm (okretaja u minuti) i pipetirani. PCR reakcijska smjesa lagano se promiješala pipetom nakon što su dodani svi sastojci, i centrifugirala 3-5 sekundi na 3000 rpm, potom se razdijelila u kapilare, dodao se pojedinačni DNA uzorak te, voda kao slijepa proba, kapilare smo zatvorili gumenim čepovima te ponovno centrifugirali 3-5 sekundi na 3000 rpm u metalnim adaptorima.

Tablica 15. Reakcijska smjesa

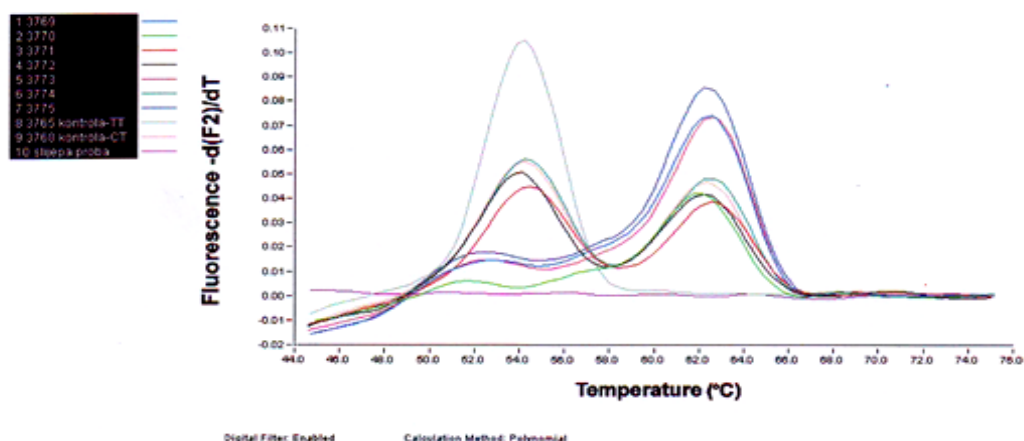
PCR MTHFR - Sastojci reakcijske smjese (20 μ L)		
<i>LC-kapilara</i>	<i>Volumen [μL]</i>	<i>Konc. u reak smjesi</i>
Steril. dest. voda	10,8	
MgCl ₂ (25mM)	1,20	1.5 mM
Master miks	2,00	
MTH1 (10 μ M radna otopina)	1,00	0.5 μ M
MTH2 (10 μ M)	1,00	0.5 μ M
MTHFR1 (4 μ M radna otopina)	1,00	0.2 μ M
MTHFR2 (4 μ M)	1,00	0.2 μ M
DNA	2,00	100 ng

Tablica 16. Uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler su:

program: DENATURACIJA				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	Cycles
1	95	600	20	1
program: AMPLIFIKACIJA				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	Cycles
1	95	5	20	40
2	55	10	20	
3	72	19	20	
program: MELTING CURVE ANALYSIS				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	Cycles
1	95	20	20	1
2	40	20	20	
3	80	0	0.2	
program: COOLING				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	cycles
1	40	30	20	1

Izračunavanje rezultata: Upotrebom hibridizacijskih proba ciljano smo otkrivali promjene u slijedu nukleotida u DNA, uključujući i promjene u samo jednom nukleotidu na temelju temperature taljenja (T_m , engl. melting temperature). T_m je ona kod koje je polovica helikalne strukture narušena. Vezanjem hibridizacijskih proba na jednolančanu molekulu DNA nastaje heterodupleks čija T_m (osim o duljini molekule i nukleotidnom sastavu) ovisi o stupnju homologije. Svaka hibridizacijska proba ima zasebnu ulogu. Jedna se veže na područje DNA u kojem se nalazi moguća mutacija, a druga se veže za susjedno područje. Genotipizacija se provodila tako da su rezultati analize u obliku krivulja T_m (karakteristične vrijednosti za normalni, odnosno mutirani alel), u kompjutorskom programu preračunavali u prve negativne derivacije promjene fluorescencije s temperaturom iz čijih se vršnih vrijednosti zatim iščitavao genotip analiziranog uzorka. Homozigotni genotip CC i specifična LightCycler-Red označena proba potpuno se sparuju,

rezultirajući višom T_m na oko 61.8°C . Heterozigotni genotip pokazuje dva vrha taljenja sa prikladnim T_m od oko 53.1°C i 61.8°C . Razlika temperature između ova dva vrha taljenja je 8.7°C . Homozigotni TT genotip i specifična LightCycler-Red označena proba ne sparuju se tako dobro, pa dolazi do snižavanja T_m , s izraženim samo jednim vrhom taljenja na T_m oko 53.1°C .



LightCycler Melting Analysis Report

User: LabSertic

LightCycler ID: 2453

Filename: C:\LightCycler3\Users\LabSertic\Data\19.02.2013.MTHFR.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.5.28

This experiment was run on Feb 19, 2013 by LabSertic.

Sample Information

Rot. Pos.	Sample Name	Rep. of ...	Sample Type*	Known Conc.	Tm1 (°C)	Area 1 (Units)	Tm2 (°C)	Area 2 (Units)	Tm3 (°C)	Area 3 (Units)	Sample Comments
1	3769		U		62.23	0.361					
2	3770		U		61.87	0.196					
3	3771		U		54.42	0.220	62.50	0.179			
4	3772		U		54.00	0.236	62.08	0.198			
5	3773		U		62.39	0.344					
6	3774		U		54.28	0.271	62.36	0.222			
7	3775		U		62.22	0.412					
8	3765 kontrola-TT		P		54.15	0.435					
9	3768 kontrola-CT		S		54.18	0.268	62.22	0.217			
10	sljepa proba		N								

* P = Positive, U = Unknown, N = Negative, S = Standard, <> = De-Selected

SLIKA 7. TEMPERATURE MEKŠANJA I KRIVULJE FLUORESCENCIJE UZORAKA ZA MTHFR (PREUZETO IZ KOMPJUTORSKOG PROGRAMA ZA LC).

GENOTIPIZACIJA GENA APOE

Genotipizacija točkastih mutacija u kodonu 112 i 158 gena *APOE* provedena je umnažanjem DNA fragmenta od interesa lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time PCR), te njihovom detekcijom po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET) (engl. fluorescence resonance energy transfer).

Primarni uzorak: venska krv; Komplet reagenasa pohranjen na temperaturi od –15 do –25°C.

Tablica 17. Komplet reagenasa

R. br.	Reagens	Proizvođač	Kat. broj
1.	<i>LightCycler Apo E Mutation Detection</i> komplet reagenasa (kodon 112 i 158)	Roche	3 004 716
2.	a) <i>LightCycler – Apo E Mutation</i> Detekcijska smjesa, 5X konc. početnica - neobilježena hibridizacijska proba 1 specifična za mutaciju kodona 112 obilježena LC Red 640 na 5` kraju i fosforilirana na 3` kraju hibridizacijska proba 2 specifična za mutaciju kodona 158 obilježena LC Red 705 na 5` kraju i fosforilirana na 3` kraju hibridizacijske probe 3 i 4 (anchor probe specifične za kodon 112 i 158) obilježene fluoresceinom na 3` kraju		
3.	b) <i>LightCycler – Apo E</i> Reakcijska smjesa, 10X konc. Taq polimeraza reakcijski pufer dNTP mix (sadrži dUTP umjesto dTTP)		
4.	c) Kontrolni DNA kalup (heterozigotna plazmidna DNA kodon 112 i kodon 158) (0.5 ng/μL)		
5.	d) Sterilna destilirana voda za PCR		

Kao referentni materijal upotrijebila se pozitivna kontrola (u ovom slučaju heterozigotna plazmidna DNA kodon 112 i kodon 158 iz kompleta reagenasa) i slijepa proba (voda). Da bi pretraga bila valjana, pozitivna kontrola je proglašena pozitivnom, a slijepa proba je bila bez znakova kontaminacije.

Faza postupka: DNA za analizu izolirala se iz primarnoga uzroka, venska krv. Reagensi za pripremu PCR reakcijske smjese izvadili su se iz zamrzivača, otopili na sobnoj temperaturi, promiješali na mućkalici (osim enzima), centrifugirali 3-5 sekundi na 3000 rpm (okretaja u minuti) i pipetirali. PCR reakcijska smjesa se lagano promiješala pipetom nakon što su dodani svi sastojci, i centrifugirala 3-5 sekundi na 3000 rpm.

Tablica 18. Reakcijska smijesa

PCR APOE -Sastojci reakcijske smjese (20 µL)		
<i>LC-kapilara</i>	<i>Volumen [µL]</i>	<i>Konc. u reak. smjesi</i>
steril. dest. voda	12,0	
Apo E Reak smjesa	2,0	1X
ApoE Mut Det smjesta	4,00	1X
DNA	2,00	100 ng

Tablica 19. Uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler su:

program: DENATURATION				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	cycles
1	95	60	20	1
program: AMPLIFICATION				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	cycles
1	95	0	20	45
2	60	10	20	
3	72	10	20	
program: MELTING CURVE ANALYSIS				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	Cycles
1	95	30	20	1
2	42	240	20	
3	80	0	0.1	
program: COOLING				
broj segmenta	temperature target (°C)	hold time (sec)	slope (°C/sec)	Cycles
1	40	30	20	1

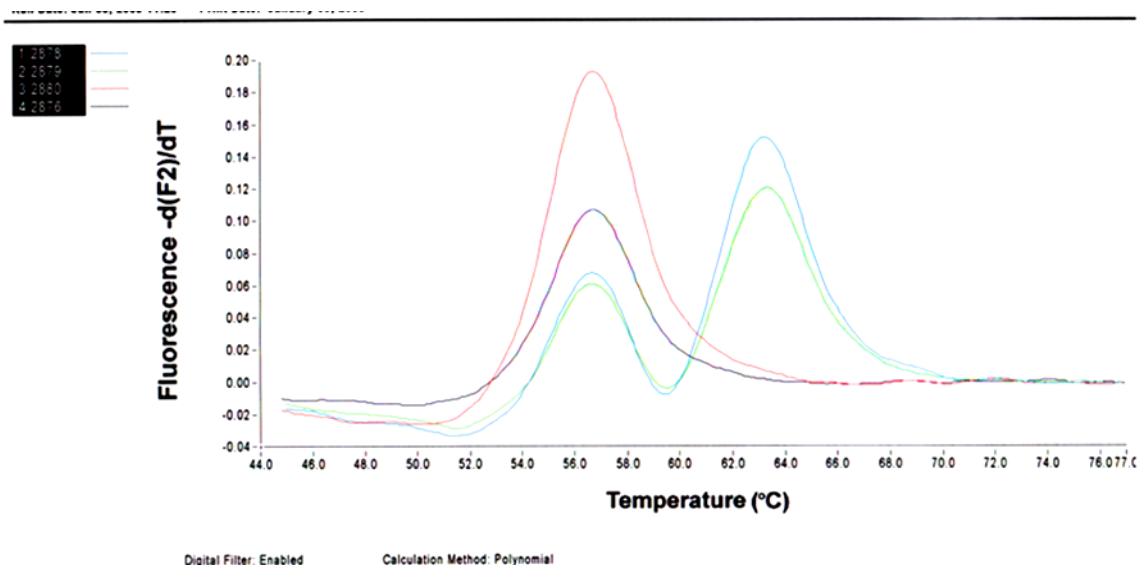
Izračunavanje rezultata: Upotrebom hibridizacijskih proba ciljano smo otkrivali promjene u slijedu nukleotida u DNA, uključujući i promjene u samo jednom nukleotidu, na temelju T_m . Vežanjem hibridizacijskih proba na jednolančanu molekulu DNA nastaje heterodupleks čija T_m (osim o duljini molekule i nukleotidnom sastavu) ovisi o stupnju homologije. Svaka proba ima zasebnu ulogu. Jedna se veže na područje DNA gdje se nalazi moguća mutacija, a druga za susjedno područje. Hibrid između DNA i hibridizacijske probe u kojem nema potpune homologije ima nižu T_m od hibrida s potpunom homologijom. Genotipizacija se dalje provodila tako da se rezultati analize u obliku krivulja T_m (karakteristične vrijednosti za normalni, odnosno mutirani alel) u kompjutorskom programu preračunavaju u prve negativne derivacije promjene fluorescencije s temperaturom iz čijih se vršnih vrijednosti zatim iščitava genotip analiziranog uzorka. Homozigotni CGC genotipovi (na kodonu 112 i kodonu 158) i specifične LightCycler-Red označene probe potpuno se sparuju, rezultirajući višom T_m na oko 62.5°C (kodon 112) odnosno

66°C (kodon 158). Kada je prisutan homozigotni TGC genotip (na kodonu 112 i kodonu 158), zbog slabijeg (nepotpunog) sparivanja proba s DNA dolazi do pomicanja T_m na otprilike 56.0°C (112) odnosno 57.5°C (158). Heterozigotni genotipovi pokazuju dvije vršne vrijednosti sa odgovarajućim T_m od oko 56.0°C i 62.5°C odnosno 57.5°C i 66.0°C. Razlika temperature taljenja između ove dvije vršne vrijednosti je 6.5°C odnosno 8.5°C. Kombinacijom rezultata analize krivulja fluorescencije i temp. taljenja na fluorescencijskom kanalu 2 (F2) i fluorescencijskom kanalu 3 (F3) određuje se alelna kombinacija ispitivanih uzoraka.

Tablica 20. Izvještaj rezultata

112	158	REZULTAT
TGC	TGC	E 2 / 2
TGC	CGC	E 3 E 3 / 3
CGC	CGC	E 4 / 4
TGC	CGC/TGC	E 2 / 3
CGC/TGC	CGC/TGC	E 2 / 4
CGC/TGC	CGC	E 3 / 4

112-F2:	CGC	62,5°C	158-F3:	CGC	66°C
	CGC/TGC	62,5°C/56°C		CGC/TGC	66°C/57°C
	TGC	56°C		TGC	57,5°C



LightCycler Melting Analysis Report

User: LabSertic

LightCycler ID: 2453

Filename: C:\LightCycler3\Users\LabSertic\Data\09.01.09.apoe.ABT

LC Run Version: 5.32

LCDA Version: 3.5.28

This experiment was run on Jan 09, 2009 by LabSertic.

Sample Information

Rot. Pos.	Sample Name	Rep. of ...	Sample Type*	Known Conc.	Tm1 (°C)	Area 1 (Units)	Tm2 (°C)	Area 2 (Units)	Tm3 (°C)	Area 3 (Units)	Sample Comments
1	2878		U		56.63	0.191	63.29	0.594			
2	2879		U		56.65	0.174	63.34	0.476			
3	2880		U		56.76	0.790					
4	2876		U		56.75	0.418					

* P = Positive, U = Unknown, N = Negative, S = Standard, < > = De-Selected

SLIKA 8. TEMPERATURE MEKŠANJA I KRIVULJE FLUORESCENCIJE UZORAKA ZA APOE KODON 112 NA KANALU F2 (PREUZETO IZ KOMPJUTORSKOG PROGRAMA ZA LC)

4. 3. Statistička obrada podataka

U istraživanju je korištena deskriptivna statistika za prikaz kliničkih podataka (SPSS v. 13.0). Povezanost sociodemografskih metoda i biokemijskih podataka provjerena je primjenom ANOVA ili t-testa (SPSSv. 13.0), a prediktivna vrijednost svih sociodemografskih podataka korištenjem binarne logističke regresije (SPSS v. 13.0). Program UNPHASED v. 3.0.10. korišten je za statističku obradu polimorfni varijanti gena i razina biokemijskih parametara. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže testirano je putem metode Markovljevi lanaca (Guo i Thompson, 1992) implementirane u programskog paketa Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier i Lischer, 2010). Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je pomoću testa Kolmogorov Smirnov. Kao mjera

centralne tendencije i raspršenja, korišteni su medijan i interkvartilni raspon, budući da su distribucije dobi i mRS-kod otpusta statistički značajno odstupale od normalne distribucije. Razlike u medijanima na ove dvije kontinuirane varijable između dviju nezavisnih kategorija nominalnih varijabli testirane su Mann - Whitney test uz koji je prikazan AUC kao standardizirana mjera veličine učinka. AUC izračunat je prema formuli: $U / (m * n)$, gdje je U rezultat testa Mann-Whitney, m i n su veličine dva uzorka. Razlike između nominalnih varijabli analizirane su testom Hi-kvadrat, s koeficijentom Cramer V kao standardiziranom mjerom veličine učinka za statistički značajne rezultate. Prediktivni doprinos pojedinog genotipa, kao i ostalih kliničkih i biokemijskih parametara, izračunat je najprije univarjatnom logističkom regresijom te nakon toga i konačnom multivarijatnom logističkom regresijom. Razina značajnosti postavljena je na 5% ($p < 0,05$), a svi intervali prikazani su na 95% razini. Sve analize provedene su pomoću SPSS 17,0 (SPSS Inc, Chicago, IL, SAD) statistički softver pakete (131,132).

5. Rezultati

5.1. Opis uzorka prema sociodemografskim, kliničkim i biokemijskim parametrima

Dobivena je statistički značajna razlika u nizu parametara između skupina sudionika. Dobivena je statistički značajna razlika među grupama prema spolu ($\chi^2 = 21,43$; $ss=1$; $P<0,001$; $\phi=0,27$), pri čemu je među pacijentima zabilježen veći udio muškaraca u odnosu na kontrolnu grupu. Također, među pacijentima je zabilježen veći udio pretilih osoba nego u kontrolnoj skupini ($\chi^2 = 18,34$; $ss=1$; $P<0,001$; $\phi=0,25$). Kod grupe pacijenata zabilježi veći udio osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom nego u kontrolnoj grupi ($\chi^2 = 23,75$; $ss=1$; $P<0,001$; Cramerov $V=0,27$). Također, u grupi pacijenata zabilježen je statistički značajno veći udio osoba s hipertenzijom ($\chi^2 = 63,86$; $ss=1$; $P<0,001$; $\phi=0,25$). Od ostalih pretraga, statistički značajne razlike u učestalosti indikativnih krvnih parametara zabilježene su kod ukupnog kolesterola, LDL-a, triglicerida, HDL-a i C reaktivnog proteina, pri čemu su za sve parametre indikativne vrijednosti zabilježene češće u skupini pacijenata (Tablica 21).

Tablica 21. Dob, spol, klinički i biokemijski parametri prema grupama sudionika

n(%)	Grupa				P	ϕ
	Pacijenti		Kontrola			
Spol						
muški	74	(64.9)	70	(37.4)	<0.001	0.27
ženski	40	(35.1)	117	(62.6)		
ukupno	114	(100.0)	187	(100.0)		
Dob; medijan (IQR)	57	(52-60)	55	(50-61)	0.466*	
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	71	(62.3)	69	(36.9)	<0.001	0.25
nisu pretili	43	(37.7)	118	(63.1)		
ukupno	114	(100.0)	187	(100.0)		
Obiteljska anamneza						
nema	78	(68.4)	169	(90.4)	<0.001	0.27 [†]

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CVI	18	(15.8)	7	(3.7)		
druga srčana bolest	18	(15.8)	11	(5.9)		
ukupno	114	(100.0)	187	(100.0)		
Pušenje						
Da	38	(33.3)	38	(28.4)	0.397	
Ne	76	(66.7)	96	(71.6)		
ukupno	114	(100.0)	134	(100.0)		
Hipertenzija						
Da	58	(50,9)	18	(9,6)	<0,001	0,461
ne	56	(49,1)	169	(90,4)		
ukupno	114	(100,0)	187	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišeni (>5.0 mmol/L)	63	(55,3)	126	(67,4)	0,035	0,122
normalan	51	(44,7)	61	(32,6)		
ukupno	114	(100,0)	187	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	44	(40.0)	113	(63.1)	<0.001	0.23
normalan	66	(60.0)	66	(36.9)		
ukupno	110	(100.0)	179	(100.0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7; mmol/L)	32	(29.1)	30	(16.8)	0.013	0.015
normalni	78	(70.9)	149	(83.2)		
ukupno	110	(100.0)	179	(100.0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	37	(33.3)	8	(4.5)	<0.001	0.39
normalni	74	(66.7)	171	(95.5)		
ukupno	111	(100.0)	179	(100.0)		
C-reaktivni proteinaM						

povišen (>5.0 mg/L)	54	(47.4)	12	(10.5)	<0.001	0.41
normalan	60	(52.6)	102	(89.5)		
ukupno	114	(100.0)	114	(100.0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; ϕ = Phi koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon* Mann-Whitney U test † Cramerov V, standardizirana mjera učinka

Za testiranje učestalosti pojedinih genotipova korištena je Bonferronijeva korekcija. Dobivena je statistički značajna razlika u učestalosti nekoliko genotipova među skupinama sudionika (Tablica 22). Genotip Pro12Ala *PPAR- γ* je statistički značajno učestaliji u kontrolnoj skupini, dok je Pro12Pro genotip učestaliji među pacijentima. Statistički značajna razlika dobivena je i za genotip E3/E3 *Apo-E*, pri čemu je on bio češći u skupini pacijenata. Genotip -174G>C *IL-6* bio je statistički značajno češći u skupini pacijenata, dok je genotip -174CC *IL-6* češće zabilježen u kontrolnoj skupini.

Tablica 22. Raspodjela genotipova prema skupinama

n(%)	Grupa				P	C	specifični test *	
	Pacijenti		Kontrola				P _s	P _{sc}
PPAR-γ Pro12Ala								
Pro12Ala	28	(24.6)	140	(74.9)	<0.001	0.44	<0,001	<0,001
Pro12Pro	83	(72.8)	44	(23.5)			<0,001	<0,001
Ala12Ala	3	(2.6)	3	(1.6)			0,536	>0,999
total	114	(100.0)	187	(100.0)				
MTHFR C677T								
CC	56	(49.1)	79	(42.5)	0.513		0,245	0,735
CT	45	(39.5)	81	(43.5)			0,512	>0,999
TT	13	(11.4)	26	(14.0)			0,531	>0,999
total	114	(100.0)	186	(100.0)				
ACE I/D								
II	27	(23.7)	38	(20.3)	0.705		0,492	>0,999

ID	57	(50.0)	93	(49.7)			0,964	>0,999
D.D.	30	(26.3)	56	(29.9)			0,499	>0,999
total	114	(100.0)	187	(100.0)				
APO-E E2/E3/E4								
2/3	17	(14.9)	18	(9.7)	0.787		0,165	0,495
3/3	97	(85.1)	93	(50.3)			<0,001	<0,001
total	114	(100.0)	111	(100.0)				
bez podataka			76	(40.6)				
IL-6 -174G>C								
GG	40	(35.1)	63	(34.1)	<0.001	0.37	0,804	>0,999
CC	21	(18.4)	96	(51.9)			<0,001	<0,001
GC	53	(46.5)	26	(14.1)			<0,001	<0,001
total	114	(100.0)	185	(100.0)				

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazana samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon*testiranje učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na ostale; ss=1 za Fisherov egzaktni test; Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije

5.2. Multivarijatna analiza povezanosti negentskih varijabli s MU-om

Rezultati multivarijatne logističke regresije pokazuju kako su muški spol, hipertenzija, sniženi HDL i povišeni CRP statistički značajno povezani s pripadnošću skupini pacijenata. Sva četiri parametra povećavaju vjerojatnost pojave MU-a (Tablica 23).

Tablica 23. Spol, dob, klinički i biokemijski parametri kao prediktori MU-a; logistička regresija, omjeri izgleda za pripadnost grupi pacijenata

n(%)	Grupa				Ukupno	OR _{UNW} (95%CI)	OR _{ADJ} (95%CI)	
	Pacijenti		Kontrola					
Spol								
muški	74	(51.4)	70	(48.6)	144	(100.0)	3.1 (1.9-5.0)	5.1 (2.1-12.6)*
ženski	40	(25.5)	117	(74.5)	157	(100.0)	1	1
Dob	57	(52-60)	55	(50-61)			1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.1)
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	71	(50.7)	69	(49.3)	140	(100.0)	2.8 (1.7-4.6)	1.2 (0.5-2.9)
nisu pretili	43	(26.7)	118	(73.3)	161	(100.0)	1	1
Obiteljska anamneza								
Nemah	78	(31.6)	169	(68.4)	247	(100.0)	1	1
CVI	18	(72.0)	7	(28.0)	25	(100.0)	5.6 (2.2-13.9)	1.3 (0.3-5.9)
druga srčana bolesti	18	(62.1)	11	(37.9)	29	(100.0)	3.5 (1.6-7.9)	1.9 (0.6-5.8)
Pušenje								
da	38	(50.0)	38	(50.0)	76	(100.0)	1.3 (0.7-2.2)	1.5 (0.5-3.7)
ne	76	(44.2)	96	(55.8)	172	(100.0)	1	1
Hipertenzija								
da	58	(76,3)	18	(23,7)	76	(100,0)	9,7 (5.3-17.9)	59.4 (6.9-506.4)*
ne	56	(24,9)	169	(75,1)	225	(100,0)	1	1
Ukupni kolesterol								
povišen (>5.0 mmol/L)	63	(33,3)	126	(66,7)	189	(100,0)	0.6 (0.4-0.9)	1.6 (0.5-5.5)
normalan	51	(45,5)	61	(54,5)	112	(100,0)	1	1

LDL								
povišen (>3.0mmol/L)	44	(28.0)	113	(72.0)	157	(100.0)	0.4 (0.2-0.6)	0.6 (0.2-1.9)
normalan	66	(50.0)	66	(50.0)	132	(100.0)	1	1
Trigliceridi								
povišeni (>1.70mmol/L)	32	(51.6)	30	(48.4)	62	(100.0)	2.0 (1.2-3.6)	0.5 (0.1-1.2)
normalni	78	(34.4)	149	(65.6)	227	(100.0)	1	1
HDL								
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	37	(82.2)	8	(17.8)	45	(100.0)	10.7 (4.7-24.1)	5.1 (1.5-16.3)*
normalni	74	(30.2)	171	(69.8)	245	(100.0)	1	1
C-reaktivni proteina								
povišen (>5.0 mg/L)	54	(81.8)	12	(18.2)	66	(100.0)	7.7 (3.8-15.4)	3.0 (1.1-8.2)*
normalan	60	(37.0)	102	(63.0)	162	(100.0)	1	1

KRATICE: ORUNW = univarijantni omjer izgleda logističke regresije; ORADJ= multivarijantni omjer izgleda logističke regresije; 95%CI = 95% interval pouzdanosti za omjer izgleda

* statistički značajni multivarijantni omjeri izgleda na razini značajnosti $p < 0,05$

5.3. Multivarijantna analiza povezanosti genotipova s MU-om

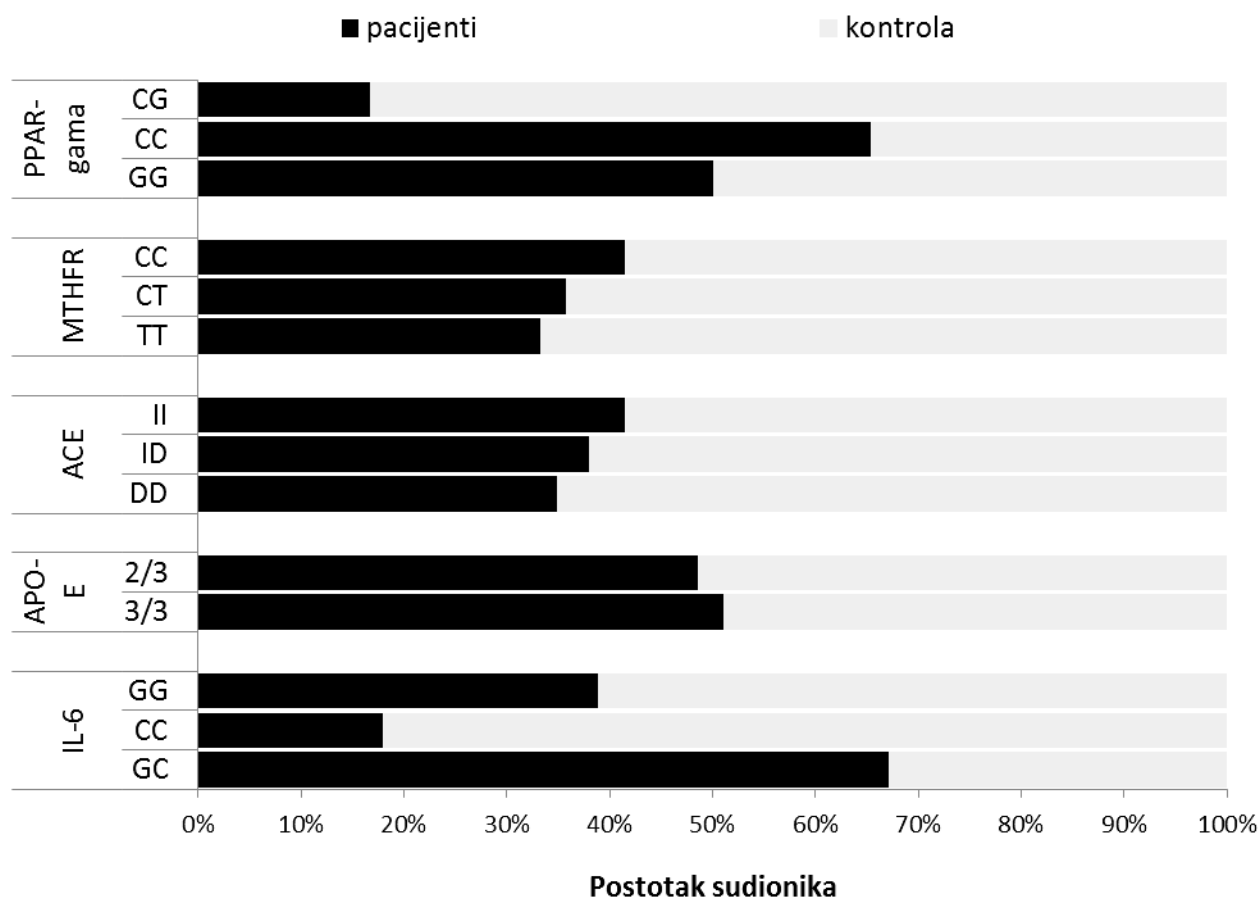
U multivarijantnoj logističkoj analizi u koju su bili uključeni svi mjereni genotipovi, dobivena je statistički značajna povezanost genotipova *PPAR-γ* Pro12Pro i Pro12Ala i *IL6 -174CC* i *GC* s pripadnošću skupini pacijenata. U slučaju *PPAR-γ* genotip Pro12Pro povećava vjerojatnost pojave MU-a, dok kod *IL-6* genotipova, -174CC genotip za 70% umanjuje vjerojatnost, a genotip -174GC vjerojatnost pripadanja skupini pacijenata povećava 2.5 puta (*Tablica 24., Grafički prikaz 1.*).

Tablica 24. Genotipovi kao prediktori MU-a; logistička regresija, omjeri izgleda za pripadnost skupini pacijenata

n(%)	Grupa				Ukupno		OR _{UNW} (95%CI)	OR _{ADJ} (95%CI)
	pacijenti		Kontrolna					
PPARγ Pro12Ala								
Pro12Ala	28	(16.7)	140	(83.3)	168	(100.0)	1	1
Pro12Pro	83	(65.4)	44	(34.6)	127	(100.0)	9.4 (5.5-16.3)	9.6 (4.8-19.4)*
Ala12Ala	3	(50.0)	3	(50.0)	6	(100.0)	5.0 (1.0-26.1)	12.2 (1.1-141.7*)
MTHFR C677T								
CC	56	(41.5)	79	(58.5)	135	(100.0)	1	1
CT	45	(35.7)	81	(64.3)	126	(100.0)	0.8 (0.5-1.3)	0.8 (0.4-1.6)
TT	13	(33.3)	26	(66.7)	39	(100.0)	0.7 (0.2-1.5)	0.8 (0.3-2.6)
ACE I/D								
II	27	(41.5)	38	(58.5)	65	(100.0)	1	1
ID	57	(38.0)	93	(62.0)	150	(100.0)	0.9 (0.5-1.6)	0.7 (0.3-1.6)
DD	30	(34.9)	56	(65.1)	86	(100.0)	0.8 (0.4-1.5)	0.8 (0.3-2.3)
APOE E2/E3/E4								
2/3	17	(48.6)	18	(51.4)	35	(100.0)	1	1
3/3	97	(51.1)	93	(48.9)	190	(100.0)	1.1 (0.5-2.3)	1.3 (0.5-3.2)
IL-6 -174G>C								
GG	40	(38.8)	63	(61.2)	103	(100.0)	1	1
CC	21	(17.9)	96	(82.1)	117	(100.0)	0.3 (0.2-0.6)	0.3 (0.1-0.6)*
GC	53	(67.1)	26	(32.9)	79	(100.0)	3.2 (1.7-5.9)	2.5 (1.1-6.0)*

KRATICE: OR_{UNW} = univarijatni omjer izgleda logističke regresije; OR_{ADJ} = multivarijatni omjer izgleda logističke regresije; 95%CI = 95% interval pouzdanosti za omjer izgleda

* statistički značajni multivarijatni omjeri izgleda na razini značajnosti p<0,05



GRAFIČKI PRIKAZ 1. PREVALENCIJA MU-A KOD POJEDINIH GENOTIPOVA

5.4. Međusobna povezanost pojedinih genotipova u skupini s MU-om i u kontrolnoj skupini

5.4.1. PPAR- γ Pro12Ala

Nije dobivena statistički značajna povezanost PPAR- γ genotipova s ostalim praćenim genotipovima u skupini pacijenata ni u kontrolnoj skupini (*Tablica 25, Tablica 26*).

Tablica 25. Povezanost PPAR- γ genotipova s ostalim genotipovima; skupina pacijenata M

n(%)	PPAR- γ						ukupno	P	
	Pro12Ala		Pro12Pro		Ala12Ala				
MTHFR C677T									
CC	14	(25.0)	41	(73.2)	1	(1.8)	56	(100.0)	0.891
CT	11	(24.4)	32	(71.1)	2	(4.4)	45	(100.0)	
TT	3	(23.1)	10	(76.9)			13	(100.0)	
ACE I/D									
II	7	(25.9)	19	(70.4)	1	(3.7)	27	(100.0)	0.855
ID	12	(21.1)	44	(77.2)	1	(1.8)	57	(100.0)	
DD	9	(30.0)	20	(66.7)	1	(3.3)	30	(100.0)	
APOE E2/E3/E4									
2/3	3	(17.6)	14	(82.4)			17	(100.0)	0.559
3/3	25	(25.8)	69	(71.1)	3	(3.1)	97	(100.0)	
IL-6 -174G>C									
GG	11	(27.5)	27	(67.5)	2	(5.0)	40	(100.0)	0.276
CC	7	(33.3)	13	(61.9)	1	(4.8)	21	(100.0)	
GC	10	(18.9)	43	(81.1)			53	(100.0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat test (χ^2) vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 26. Povezanost PPAR- γ genotipova s ostalim genotipovima; kontrolna skupina

n(%)	PPAR- γ						Ukupno	P	
	Pro12Ala		Pro12Pro		Ala12Ala				
MTHFR C677T									
CC	63	(79.7)	16	(20.3)			79	(100.0)	0.254
CT	58	(71.6)	20	(24.7)	3	(3.7)	81	(100.0)	
TT	18	(69.2)	8	(30.8)			26	(100.0)	
ACE I/D									
II	28	(73.7)	8	(21.1)	2	(5.3)	38	(100.0)	0.351
ID	69	(74.2)	23	(24.7)	1	(1.1)	93	(100.0)	
DD	43	(76.8)	13	(23.2)			56	(100.0)	
APOE E2/E3/E4									
2/3	15	(83.3)	3	(16.7)			18	(100.0)	0.723
3/3	70	(75.3)	22	(23.7)	1	(1.1)	93	(100.0)	
IL-6 -174G>C									
GG	43	(68.3)	20	(31.7)			63	(100.0)	0.286
CC	75	(78.1)	19	(19.8)	2	(2.1)	96	(100.0)	
GC	20	(76.9)	5	(19.2)	1	(3.8)	26	(100.0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat test (χ^2) vjerojatnost pogreške tipa I.

5.4.2. IL-6 -174G>C

Nije dobivena statistički značajna povezanost IL-6 genotipova s ostalim praćenim genotipovima u skupini pacijenata, ni u kontrolnoj skupini (*Tablica 27., Tablica 28.*).

Tablica 27. Povezanost IL-6 genotipova s ostalim praćenim genotipovima; skupina pacijenata

n(%)	IL-6						ukupno	P	
	GG		CC		GC				
PPARγ									
Pro12Ala	11	(39,3)	7	(25,0)	10	(35,7)	28	(100,0)	0,276
Pro12Pro	27	(32,5)	13	(15,7)	43	(51,8)	83	(100,0)	
Ala12Ala	2	(66,7)	1	(33,3)	0	(0,0)	3	(100,0)	
MTHFR C677T									
CC	19	(33,9)	11	(19,6)	26	(46,4)	56	(100,0)	0,174
CT	19	(42,2)	9	(20,0)	17	(37,8)	45	(100,0)	
TT	2	(15,4)	1	(7,7)	10	(76,9)	13	(100,0)	
ACE I/D									
II	12	(44,4)	4	(14,8)	11	(40,7)	27	(100,0)	0,066
ID	13	(22,8)	11	(19,3)	33	(57,9)	57	(100,0)	
D.D.	15	(50,0)	6	(20,0)	9	(30,0)	30	(100,0)	
APOE E2/E3/E4									
2/3	4	(23,5)	3	(17,6)	10	(58,8)	17	(100,0)	0,491
3/3	36	(37,1)	18	(18,6)	43	(44,3)	97	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat test (χ^2) vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 28. Povezanost IL-6 genotipova s ostalim praćenim genotipovima; skupina pacijenata

n(%)	IL-6						ukupno	P	
	GG		CC		GC				
PPAR									
Pro12Ala	43	(31,2)	75	(54,3)	20	(14,5)	138	(100,0)	0,286
Pro12Pro	20	(45,5)	19	(43,2)	5	(11,4)	44	(100,0)	
Ala12Ala			2	(66,7)	1	(33,3)	3	(100,0)	
MTHFR C677T									
CC	24	(31,2)	43	(55,8)	10	(13,0)	77	(100,0)	0,831
CT	28	(34,6)	42	(51,9)	11	(13,6)	81	(100,0)	
TT	11	(42,3)	11	(42,3)	4	(15,4)	26	(100,0)	
ACE I/D									
II	9	(24,3)	24	(64,9)	4	(10,8)	37	(100,0)	0,137
ID	38	(41,3)	39	(42,4)	15	(16,3)	92	(100,0)	
DD	16	(28,6)	33	(58,9)	7	(12,5)	56	(100,0)	
APOE E2/E3/E4									
2/3	4	(22,2)	10	(55,6)	4	(22,2)	18	(100,0)	0,567
3/3	27	(29,7)	52	(57,1)	12	(13,2)	91	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat test (χ^2) vjerojatnost pogreške tipa I

5.5. Svi biokemijski, klinički parametri i genotipovi kao prediktori MU-a

Svi parametri (klinički i biokemijski) i genotipovi uvršteni su u stupnjevitu multivarijatnu logističku regresiju (Tablica 29.). Statistički značajnim prediktorima pokazali su se spol, hipertenzija te genotipovi Pro12Ala *PPAR-γ*, -174G>C *IL-6*. Muški spol, u odnosu na ženski, povećava vjerojatnost MU-a za 10%, dok prisutnost hipertenzije, vjerojatnost za pripadanje u grupu pacijenata povećavaju za 37.3 puta. Genotip Pro12Ala *PPAR-γ* ima protektivni učinak, tj. umanjuje vjerojatnost za pojavu MU-a za 90%, dok genotip -174G>C *IL-6* povećava vjerojatnost pripadanja grupi pacijenata za 9,3 puta.

Tablica 29. Stupnjevita multivarijatna logistička regresija svih biokemijskih, kliničkih parametara i genotipova kao prediktora pripadnosti skupini pacijenata

n(%)	OR _{ADJ} (95%CI)	P
Spol		
Muških	1,1(1.0-1,2)	0,040
Ženskih	1	
Hipertenzija		
da	37,3 (4.0-345.2)	0.001
ne	1	
<i>PPAR-γ</i>		
Pro12Ala	0.1 (0.1-0.5)	0,002
ostali	1	
<i>IL-6 -174G>C</i>		
GC	9,3 (1,7-49,7)	0,009
ostali	1	

KRATICE: ORADJ= multivarijatni omjer izgleda logističke regresije; 95%CI = 95% interval pouzdanosti za omjer izgleda

5.6. Povezanost *PPAR-γ* genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima

Nije dobivena statistički značajna povezanost *PPAR-γ* genotipova s niti jednim od kliničkih i biokemijskih parametara u skupini pacijenata (*Tablica 30, Tablica 31*). U kontrolnoj skupini dobivena je statistički značajna povezanost *PPAR-γ* genotipova i CRP-a ($\chi^2=5,139$, $df=1$, $P=0,034$; $\phi=0,208$), pri čemu su sudionici s Pro12Pro genotipom češće imali povišenu razinu CRP-a (*Tablica 32*).

Tablica 30. Povezanost *PPARγ* genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametarima u skupini pacijenata ($n=114$)

n(%)	<i>PPARγ</i>				P	C
	Pro12Ala ili Ala12Ala		Pro12Pro			
Spol						
Muških	18	(58,1)	56	(67,5)	0,383	
Ženskih	13	(41,9)	27	(32,5)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(52-60)	57	(53-60)	0,363*	
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	16	(51,6)	55	(66,3)	0,193	
nisu pretili	15	(48,4)	28	(33,7)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
Nemah	19	(61,3)	59	(71,1)	0,508	
CVI	7	(22,6)	11	(13,3)		
druga srčana bolest	5	(16,1)	13	(15,7)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		
Pušenje						
Da	10	(32,3)	28	(33,7)	>0,999	
Ne	21	(67,7)	55	(66,3)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

Fizička aktivnost					
Da	22	(71,0)	49	(59,0)	0,283
Ne	9	(29,0)	34	(41,0)	
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	
Hipertenzija					
Da	16	(51,6)	42	(50,6)	>0,999
Ne	15	(48,4)	41	(49,4)	
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	
Ukupni kolesterol					
povišen (>5.0 mmol/L)	19	(61,3)	44	(53,0)	0,527
Normalna	12	(38,7)	39	(47,0)	
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinke, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon* Mann Whitney U Test

Tablica 31. Povezanost PPAR- γ genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	PPAR- γ				P	C
	Pro12Ala ili Ala12Ala		Pro12Pro			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	14	(46,7)	30	(37,5)	0,513	
Normalan	16	(53,3)	50	(62,5)		
Ukupno	30	(100,0)	80	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (> 1.70mmol/L)	11	(35,5)	21	(26,6)	0,484	
Normalni	20	(64,5)	58	(73,4)		
Ukupno	31	(100,0)	79	(100,0)		
HDL						
snižen (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	8	(26,7)	29	(35,8)	0,497	
Normalan	22	(73,3)	52	(64,2)		
Ukupno	30	(100,0)	81	(100,0)		
C-reaktivni proteini						
povišen (>5.0 mg/L)	14	(45,2)	40	(48,2)	0,835	
Normalan	17	(54,8)	43	(51,8)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	4	(12,9)	11	(13,3)	0,542	
prednji desni	11	(35,5)	24	(28,9)		
prednji plijevi	6	(19,4)	20	(24,1)		
stražnji desni	4	(12,9)	12	(14,5)		
stražnji plijevi	5	(16,1)	6	(7,2)		
ishemija u moždanom deblu	1	(3,2)	10	(12,0)		
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida					
Uredna	10	(32,3)	23	(27,7)	0,868
bez stenozem	4	(12,9)	13	(15,7)	
značajna stenozna	5	(16,1)	10	(12,0)	
aterosklerotske promjene	12	(38,7)	37	(44,6)	
Ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	
UZV srca					
nije rađen	16	(51,6)	32	(38,6)	0,553
uredan	12	(38,7)	35	(42,2)	
perzistentan foramen ovale	1	(3,2)	4	(4,8)	
ostali	2	(6,5)	12	(14,5)	
ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	
Holter EKG					
nije rađen	6	(19,4)	12	(14,5)	0,858
sinus ritma	23	(74,2)	66	(79,5)	
Fibrilacija atrijsa	2	(6,5)	5	(6,0)	
ukupno	31	(100,0)	83	(100,0)	
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(1-2)	1	(1-2)	0,844*

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Mann Whitney U Test

Tablica 32. Povezanost PPAR- γ genotipova sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	PPAR- γ		P	C	
	Pro12Ala ili Ala12Ala	Pro12Pro			
Spol					
Muških	53	(37,1)	17	(38,6)	0,860
Ženski	90	(62,9)	27	(61,4)	
Ukupno	143	(100,0)	44	(100,0)	
Dob; medijan (IQR)	54	(50-60)	59	(52-63)	0,079*
BMI					
pretili (>25 kg/m ²)	53	(37,1)	16	(36,4)	>0,999
nisu pretili	90	(62,9)	28	(63,6)	
Ukupno	143	(100,0)	44	(100,0)	
Obiteljska anamneza					
Nemah	128	(89,5)	41	(93,2)	0,751
CVI	6	(4,2)	1	(2,3)	
druga srčana bolest	9	(6,3)	2	(4,5)	
Ukupno	143	(100,0)	44	(100,0)	
Pušenje					
Da	34	(32,1)	4	(14,3)	0,097
Ne	72	(67,9)	24	(85,7)	
Ukupno	106	(100,0)	28	(100,0)	
Hipertenzija					
Da	16	(11,2)	2	(4,5)	0,251
Ne	127	(88,8)	42	(95,5)	
Ukupno	143	(100,0)	44	(100,0)	
Ukupni kolesterol					
povišen (>5.0 mmol/L)	95	(66,4)	31	(70,5)	0,714

Normalna	48	(33,6)	13	(29,5)		
ukupno	143	(100,0)	44	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	86	(63,2)	27	(62,8)	>0,999	
normalan	50	(36,8)	16	(37,2)		
ukupno	136	(100,0)	43	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (> 1.70mmol/L)	23	(16,9)	7	(16,3)	>0,999	
normalni	113	(83,1)	36	(83,7)		
ukupno	136	(100,0)	43	(100,0)		
HDL						
snižen (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	6	(4,4)	2	(4,7)	>0,999	
normalan	130	(95,6)	41	(95,3)		
ukupno	136	(100,0)	43	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	6	(6,9)	6	(22,2)	0,034	0,208
normalan	81	(93,1)	21	(77,8)		
ukupno	87	(100,0)	27	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspona * Mann Whitney U Test

5.7. Povezanost *IL-6* -174G>C genotipova s kliničkim i biokemijskim parametarima

Dobivena je statistički značajna povezanost u skupini bolesnika između *IL-6* genotipa i razine CRP-a ($\chi^2 = 9.728$; $df = 2$, $P = 0,009$; $\phi = 0.292$). Početni C RP je najčešći kod pacijenata s genotipom -174GC (Tablica 33.). Nije bilo statistički značajne povezanosti između *IL-6* genotipova i bilo kojeg drugog kliničkog ili biokemijskog parametara u skupini bolesnika (Tablica 34.). Nismo našli statistički značajnu povezanost *IL-6* genotipova i kliničkih i biokemijskih parametara u kontrolnoj skupini (Tablica 35.). Provedena je daljnja analiza svakog pojedinog genotipa.

Tablica 33. Povezanost IL-6 -174 G>C genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6						P	C
	GG		CC		GC			
Spol								
muški	23	(57,5)	14	(66,7)	37	(69,8)	0,518	
ženski	17	(42,5)	7	(33,3)	16	(30,2)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(52-61)	57	(54-60)	57	(52-60)	0,989*	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	22	(55,0)	11	(52,4)	38	(71,7)	0,179	
nisu pretili	18	(45,0)	10	(47,6)	15	(28,3)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	33	(82,5)	15	(71,4)	30	(56,6)	0,118	
CVI	3	(7,5)	3	(14,3)	12	(22,6)		
druga srčana bolest	4	(10,0)	3	(14,3)	11	(20,8)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Pušenje								
da	10	(25,0)	6	(28,6)	22	(41,5)	0,225	
ne	30	(75,0)	15	(71,4)	31	(58,5)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Fizička aktivnost								
da	26	(65,0)	13	(61,9)	32	(60,4)	0,935	
ne	19	(47,5)	11	(52,4)	26	(49,1)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Hipertenzija								
da	21	(52,5)	10	(47,6)	27	(50,9)	0,969	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ne	19	(47,5)	11	(52,4)	26	(49,1)	
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)	
Ukupni kolesterol							
povišen (>5.0 mmol/L)	19	(47,5)	12	(57,1)	32	(60,4)	0,471
normalan	21	(52,5)	9	(42,9)	21	(39,6)	
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

Tablica 34. Povezanost IL-6 -174G>C genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6						P	C
	GG		CC		GC			
LDL								
povišen (>3.0 mmol/L)	15	(39,5)	5	(25,0)	24	(46,2)	0,271	
normalan	23	(60,5)	15	(75,0)	28	(53,8)		
ukupno	38	(100,0)	20	(100,0)	52	(100,0)		
Trigliceridi								
povišeni (>1,7 mmol/L)	10	(26,3)	8	(40,0)	14	(26,9)	0,561	
normalni	28	(73,7)	12	(60,0)	38	(73,1)		
ukupno	38	(100,0)	20	(100,0)	52	(100,0)		
HDL								
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	15	(38,5)	7	(35,0)	15	(28,8)	0,628	
normalni	24	(61,5)	13	(65,0)	37	(71,2)		
ukupno	39	(100,0)	20	(100,0)	52	(100,0)		
C-reaktivni protein								
povišen (>5.0 mg/L)	12	(30,0)	9	(42,9)	33	(62,3)	0,009	0,292
normalan	28	(70,0)	12	(57,1)	20	(37,7)		
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		
Moždani udar								
bez ishemije	2	(5,0)	5	(23,8)	8	(15,1)	0,454	
prednji desni	14	(35,0)	7	(33,3)	14	(26,4)		
prednji lijevi	8	(20,0)	3	(14,3)	15	(28,3)		
stražnji desni	6	(15,0)	4	(19,0)	6	(11,3)		
stražnji lijevi	6	(15,0)	0	(0,0)	5	(9,4)		
ishemija moždanoga debla	4	(10,0)	2	(9,5)	5	(9,4)		
Ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida							
Uredna	12	(30,0)	4	(19,0)	17	(32,1)	0,895
bez stenozе	6	(15,0)	3	(14,3)	8	(15,1)	
značajna stenozа	6	(15,0)	4	(19,0)	5	(9,4)	
aterosklerotske promjene	16	(40,0)	10	(47,6)	23	(43,4)	
Ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)	
UZV srca							
nije građen	10	(25,0)	12	(57,1)	26	(49,1)	0,143
Uredna	23	(57,5)	6	(28,6)	18	(34,0)	
perzistentan foramen ovale	1	(2,5)	1	(4,8)	3	(5,7)	
Dostalo	6	(15,0)	2	(9,5)	6	(11,3)	
Ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)	
Holter EKG							
nije rađen	7	(17,5)	5	(23,8)	6	(11,3)	0,471
sinus ritam	32	(80,0)	15	(71,4)	42	(79,2)	
Fibrilacija atriја	1	(2,5)	1	(4,8)	5	(9,4)	
ukupno	40	(100,0)	21	(100,0)	53	(100,0)	
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-2)	1	(0-2,5)	1	(1-3)	0,302*

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

Tablica 35. Povezanost IL-6 -174G>C genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	IL-6						P	C
	GG		CC		GC			
Spol								
muški	22	(34,9)	37	(38,5)	10	(38,5)	0,891	
ženski	41	(65,1)	59	(61,5)	16	(61,5)		
ukupno	63	(100,0)	96	(100,0)	26	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	54	(51-59)	55	(49-63)	56	(50-62)	0,922	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	22	(34,9)	35	(36,5)	12	(46,2)	0,591	
nisu pretili	41	(65,1)	61	(63,5)	14	(53,8)		
ukupno	63	(100,0)	96	(100,0)	26	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	56	(88,9)	88	(91,7)	23	(88,5)	0,968	
CVI	3	(4,8)	3	(3,1)	1	(3,8)		
druga srčana bolest	4	(6,3)	5	(5,2)	2	(7,7)		
ukupno	63	(100,0)	96	(100,0)	26	(100,0)		
Pušenje								
da	12	(28,6)	18	(25,4)	8	(38,1)	0,523	
ne	30	(71,4)	53	(74,6)	13	(61,9)		
ukupno	42	(100,0)	71	(100,0)	21	(100,0)		
Hipertenzija								
da	10	(15,9)	5	(5,2)	3	(11,5)	0,073	
ne	53	(84,1)	91	(94,8)	23	(88,5)		
ukupno	63	(100,0)	96	(100,0)	26	(100,0)		
Ukupni kolesterol								
povišen (>5.0 mmol/L)	46	(73,0)	65	(67,7)	14	(53,8)	0,203	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	17	(27,0)	31	(32,3)	12	(46,2)	
ukupno	63	(100,0)	96	(100,0)	26	(100,0)	
LDL							
povišen (>3.0 mmol/L)	37	(60,7)	59	(63,4)	16	(69,6)	0,751
normalan	24	(39,3)	34	(36,6)	7	(30,4)	
ukupno	61	(100,0)	93	(100,0)	23	(100,0)	
Trigliceridi							
povišeni (>1,7 mmol/L)	8	(13,1)	17	(18,3)	4	(17,4)	0,692
normalni	53	(86,9)	76	(81,7)	19	(82,6)	
ukupno	61	(100,0)	93	(100,0)	23	(100,0)	
HDL							
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	2	(3,3)	5	(5,4)	1	(4,3)	0,828
normalni	59	(96,7)	88	(94,6)	22	(95,7)	
ukupno	61	(100,0)	93	(100,0)	23	(100,0)	
C-reaktivni protein							
povišen (>5.0 mg/L)	4	(12,1)	6	(9,2)	2	(14,3)	0,817
normalan	29	(87,9)	59	(90,8)	12	(85,7)	
ukupno	33	(100,0)	65	(100,0)	14	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

5.7.1. Povezanost pojedinih genotipova IL-6 -174G>C i kliničkih i biokemijskih parametara

Jedina statistički značajna povezanost u skupini bolesnika nađena je između -174GG genotipa i CRP-a ($\chi^2 = 7.456$; $df = 1$, $P = 0.010$; Bonferronijeva korekcija $P = 0.030$). Normalne razine CRP-a bile su češće kod pacijenata s GG genotipom. Svi ostali parametri nisu bili statistički značajno povezani s GG genotipom IL-6. Nije dobivena statistički značajna povezanost GG genotipa i kliničkih i biokemijskih parametara u kontrolnoj skupini. CC genotip nije bio statistički značajno povezan s bilo kojim od testiranih parametara u obje skupine, pacijenata i kontrolne.

Dobivena je statistički značajna povezanost u skupini bolesnika između GC genotipa i CRP-a ($\chi^2 = 8.815$; $df = 1$, $P = 0.005$; Bonferronijeva korekcija $P = 0,015$). Povišene razine CRP-a su bile češće kod pacijenata s GC genotipom. Svi ostali parametri nisu bili statistički značajno povezani s GC genotipom IL-6 u skupini bolesnika. Nije dobivena statistički značajna povezanost između GC genotipa i kliničkih i biokemijskih parametara u kontrolnoj skupini.

5.7.1.1. Genotip IL6 -174GG

Tablica 36. Povezanost IL-6 -174 GG genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata ($n=114$)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	GG		Ostali			
Spol						
muški	23	(57,5)	51	(68,9)	0,304	0,912
ženski	17	(42,5)	23	(31,1)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(52-61)	57	(53-60)	0,901	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	22	(55,0)	49	(66,2)	0,312	>0,999
nisu pretili	18	(45,0)	25	(33,8)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Obiteljska anamneza						

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

nema	33	(82,5)	45	(60,8)	0,60	>0,999
CVI	3	(7,5)	15	(20,3)		
druga srčana bolest	4	(10,0)	14	(18,9)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Pušenje						
da	10	(25,0)	28	(37,8)	0,213	0,639
ne	30	(75,0)	46	(62,2)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	26	(65,0)	45	(60,8)	0,691	>0,999
ne	14	(35,0)	29	(39,2)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Hipertenzija						
da	21	(52,5)	37	(50,0)	0,846	>0,999
ne	19	(47,5)	37	(50,0)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	19	(47,5)	44	(59,5)	0,220	0,660
normalan	21	(52,5)	30	(40,5)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 37. Povezanost IL-6 -174 GG genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima prema GG genotipu u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	GG		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	15	(39,5)	29	(40,3)	>0,999	>0,999
normalan	23	(60,5)	43	(59,7)		
ukupno	38	(100,0)	72	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1,7 mmol/L)	10	(26,3)	22	(30,6)	0,667	>0,999
normalni	28	(73,7)	50	(69,4)		
ukupno	38	(100,0)	72	(100,0)		
HDL						
snižen (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	15	(38,5)	22	(30,6)	0,527	>0,999
normalan	24	(61,5)	50	(69,4)		
ukupno	39	(100,0)	72	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	12	(30,0)	42	(56,8)	0,010	0,030
normalan	28	(70,0)	32	(43,2)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	2	(5,0)	13	(17,6)	0,349	>0,999
predni desni	14	(35,0)	21	(28,4)		
prednji olijevi	8	(20,0)	18	(24,3)		
stražnji desni	6	(15,0)	10	(13,5)		
stražnji lijevi	6	(15,0)	5	(6,8)		
ishemija moždanog debla	4	(10,0)	7	(9,5)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	12	(30,0)	21	(28,4)	0,974	>0,999
bez stenozе	6	(15,0)	11	(14,9)		
značajna stenozа	6	(15,0)	9	(12,2)		
aterosklerotske promjene	16	(40,0)	33	(44,6)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	10	(25,0)	38	(51,4)	0,025	0,075
uredan	23	(57,5)	24	(32,4)		
perzistentan foramen ovale	1	(2,5)	4	(5,4)		
ostalo	6	(15,0)	8	(10,8)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	7	(17,5)	11	(14,9)	0,586	>0,999
sinus ritam	32	(80,0)	57	(77,0)		
Fibrilacija atrija	1	(2,5)	6	(8,1)		
ukupno	40	(100,0)	74	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-2)	1	(1-3)	0,186	0,558

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * Mann Whitney U Test

Tablica 38. Povezanost IL-6 -174 GG genotipova sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	GG		ostali			
Spol						
muški	22	(34,9)	48	(38,7)	0,635	>0,999
ženski	41	(65,1)	76	(61,3)		
ukupno	63	(100,0)	124	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	54	(51-59)	55	(49-63)	0,880	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	22	(34,9)	47	(37,9)	0,750	>0,999
nisu pretili	41	(65,1)	77	(62,1)		
ukupno	63	(100,0)	124	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	56	(88,9)	113	(91,1)	0,856	>0,999
CVI	3	(4,8)	4	(3,2)		
druga srčana bolest	4	(6,3)	7	(5,6)		
ukupno	63	(100,0)	124	(100,0)		
Pušenje						
Da	12	(28,6)	26	(28,3)	>0,999	>0,999
Ne	30	(71,4)	66	(71,7)		
ukupno	42	(100,0)	92	(100,0)		
Hipertenzija						
Da	10	(15,9)	8	(6,5)	0,063	0,189
Ne	53	(84,1)	116	(93,5)		
Ukupno	63	(100,0)	124	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	46	(73,0)	80	(64,5)	0,254	0,762
normalan	17	(27,0)	44	(35,5)		
ukupno	63	(100,0)	124	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	37	(60,7)	76	(64,4)	0,628	>0,999
normalan	24	(39,3)	42	(35,6)		
ukupno	61	(100,0)	118	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	8	(13,1)	22	(18,6)	0,404	>0,999
normalni	53	(86,9)	96	(81,4)		
ukupno	61	(100,0)	118	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	2	(3,3)	6	(5,1)	0,718	>0,999
normalni	59	(96,7)	112	(94,9)		
ukupno	61	(100,0)	118	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	4	(12,1)	8	(9,9)	0,742	>0,999
normalan	29	(87,9)	73	(90,1)		
ukupno	33	(100,0)	81	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.7.1.2. Genotip IL6 -174CC

Tablica 39. Povezanost IL-6 -174 CC genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	CC		ostali			
Spol						
muški	14	(66,7)	60	(64,5)	>0,999	>0,999
ženski	7	(33,3)	33	(35,5)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	57	(54-60)	56	(52-60)	0,994	<0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	11	(52,4)	60	(64,5)	0,327	0,981
nisu pretili	10	(47,6)	33	(35,5)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	15	(71,4)	63	(67,7)	>0,999	>0,999
CVI	3	(14,3)	15	(16,1)		
druga srčana bolest	3	(14,3)	15	(16,1)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Pušenje						
da	6	(28,6)	32	(34,4)	0,798	>0,999
ne	15	(71,4)	61	(65,6)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	13	(61,9)	58	(62,4)	>0,999	>0,999
ne	8	(38,1)	35	(37,6)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

Hipertenzija						
da	10	(47,6)	48	(51,6)	0,812	>0,999
ne	11	(52,4)	45	(48,4)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	12	(57,1)	51	(54,8)	>0,999	>0,999
normalan	9	(42,9)	42	(45,2)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 40. Povezanost IL-6 -174 CC genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	CC		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	5	(25,0)	39	(43,3)	0,206	0,618
Normalan	15	(75,0)	51	(56,7)		
Ukupno	20	(100,0)	90	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	8	(40,0)	24	(26,7)	0,279	0,837
Normalni	12	(60,0)	66	(73,3)		
Ukupno	20	(100,0)	90	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	7	(35,0)	30	(33,0)	>0,999	>0,999
Normalni	13	(65,0)	61	(67,0)		
Ukupno	20	(100,0)	91	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	9	(42,9)	45	(48,4)	0,809	>0,999
Normalan	12	(57,1)	48	(51,6)		
Ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	5	(23,8)	10	(10,8)	0,291	0,873
prednji desni	7	(33,3)	28	(30,1)		
prednji plijevi	3	(14,3)	23	(24,7)		
stražnji desni	4	(19,0)	12	(12,9)		
stražnji plijevi	0	(0,0)	11	(11,8)		
ishemija u moždanome deblu	2	(9,5)	9	(9,7)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
CDFI karotida						
Uredna	4	(19,0)	29	(31,2)	0,661	>0,999
bez stenozе	3	(14,3)	14	(15,1)		
značajna stenozа	4	(19,0)	11	(11,8)		
aterosklerotske promjene	10	(47,6)	39	(41,9)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	12	(57,1)	36	(38,7)	0,474	>0,999
uredan	6	(28,6)	41	(44,1)		
perzistentan foramen ovale	1	(4,8)	4	(4,3)		
ostalo	2	(9,5)	12	(12,9)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	5	(23,8)	13	(14,0)	0,546	>0,999
sinus ritma	15	(71,4)	74	(79,6)		
Fibrilacija atriја	1	(4,8)	6	(6,5)		
ukupno	21	(100,0)	93	(100,0)		
mRS- kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-2,5)	1	(1-2)	0,751	>0,999

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * Mann Whitney U Test

Tablica 41. Povezanost IL-6 -174 CC genotipova sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima prema CC genotipu u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	IL-6				P	Psc
	CC		ostali			
Spol						
muški	37	(38,5)	33	(36,3)	0,765	>0,999
ženski	59	(61,5)	58	(63,7)		
ukupno	96	(100,0)	91	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(49-63)	54	(51-59)	0,992	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	35	(36,5)	34	(37,4)	>0,999	>0,999
nisu pretili	61	(63,5)	57	(62,6)		
ukupno	96	(100,0)	91	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	88	(91,7)	81	(89,0)	0,804	>0,999
CVI	3	(3,1)	4	(4,4)		
druga srčana bolest	5	(5,2)	6	(6,6)		
ukupno	96	(100,0)	91	(100,0)		
Pušenje						
da	18	(25,4)	20	(31,7)	0,447	>0,999
ne	53	(74,6)	43	(68,3)		
ukupno	71	(100,0)	63	(100,0)		
Hipertenzija						
da	5	(5,2)	13	(14,3)	0,047	0,141
ne	91	(94,8)	78	(85,7)		
ukupno	96	(100,0)	91	(100,0)		
Ukupni kolesterol						

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

povišen (>5.0 mmol/L)	65	(67,7)	61	(67,0)	>0,999	>0,999
normalan	31	(32,3)	30	(33,0)		
ukupno	96	(100,0)	91	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	59	(63,4)	54	(62,8)	>0,999	>0,999
normalan	34	(36,6)	32	(37,2)		
ukupno	93	(100,0)	86	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	17	(18,3)	13	(15,1)	0,690	>0,999
normalni	76	(81,7)	73	(84,9)		
ukupno	93	(100,0)	86	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	5	(5,4)	3	(3,5)	0,722	>0,999
normalni	88	(94,6)	83	(96,5)		
ukupno	93	(100,0)	86	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	6	(9,2)	6	(12,2)	0,760	>0,999
normalan	59	(90,8)	43	(87,8)		
ukupno	65	(100,0)	49	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * Mann Whitney U Test

5.7.1.3. Genotip IL-6 -174GC

Tablica 42. Povezanost IL-6 -174 GC genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	GC		ostali			
Spol						
muški	37	(69,8)	37	(60,7)	0,332	0,996
ženski	16	(30,2)	24	(39,3)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	57	(52-60)	56	(53-60)	0,899	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	38	(71,7)	33	(54,1)	0,081	0,243
nisu pretili	15	(28,3)	28	(45,9)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	30	(56,6)	48	(78,7)	0,032	0,096
CVI	12	(22,6)	6	(9,8)		
druga srčana bolest	11	(20,8)	7	(11,5)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Pušenje						
da	22	(41,5)	16	(26,2)	0,111	0,333
ne	31	(58,5)	45	(73,8)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	32	(60,4)	39	(63,9)	0,704	>0,999
ne	21	(39,6)	22	(36,1)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Hipertenzija						
da	27	(50,9)	31	(50,8)	>0,999	>0,999
ne	26	(49,1)	30	(49,2)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	32	(60,4)	31	(50,8)	0,348	>0,999
normalan	21	(39,6)	30	(49,2)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 43. Povezanost IL-6 -174 GC genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	IL-6				P	P _{sc}
	GC		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	24	(46,2)	20	(34,5)	0,245	0,735
normalan	28	(53,8)	38	(65,5)		
ukupno	52	(100,0)	58	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7;mmol/L)	14	(26,9)	18	(31,0)	0,678	>0,999
normalni	38	(73,1)	40	(69,0)		
ukupno	52	(100,0)	58	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	15	(28,8)	22	(37,3)	0,421	>0,999
normalni	37	(71,2)	37	(62,7)		
ukupno	52	(100,0)	59	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	33	(62,3)	21	(34,4)	0,005	0,015
Normalan	20	(37,7)	40	(65,6)		
ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	8	(15,1)	7	(11,5)	0,751	>0,999
prednji desni	14	(26,4)	21	(34,4)		
prednji lijevi	15	(28,3)	11	(18,0)		
stražnji desni	6	(11,3)	10	(16,4)		
stražnji lijevi	5	(9,4)	6	(9,8)		
ishemija u moždanome deblu	5	(9,4)	6	(9,8)		
Ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI						
Uredna	17	(32,1)	16	(26,2)	0,716	>0,999
bez stenozе	8	(15,1)	9	(14,8)		
značajna stenozа	5	(9,4)	10	(16,4)		
aterosklerotske promjene	23	(43,4)	26	(42,6)		
Ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
UZV sirca						
nije građen	26	(49,1)	22	(36,1)	0,425	>0,999
Uredna	18	(34,0)	29	(47,5)		
perzistentni foramen ovale	3	(5,7)	2	(3,3)		
Dostalo	6	(11,3)	8	(13,1)		
Ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
Holter EKG						
nije građen	6	(11,3)	12	(19,7)	0,243	0,729
sinus ritma	42	(79,2)	47	(77,0)		
Fibrilacija atriја	5	(9,4)	2	(3,3)		
Ukupno	53	(100,0)	61	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(1-3)	1	(0-2)	0,132	0,396

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * Mann Whitney U Test

Tablica 44. Povezanost IL-6 -174 G>C genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	IL-6				P	Psc
	GC		ostali			
Spol						
Muških	10	(38,5)	60	(37,3)	0,907	>0,999
Ženskih	16	(61,5)	101	(62,7)		
Ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(49-62)	54	(50-60)	0,688	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m²)	12	(46,2)	57	(35,4)	0,381	>0,999
nisu pretili	14	(53,8)	104	(64,6)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	23	(88,5)	146	(90,7)	>0,999	>0,999
CVI	1	(3,8)	6	(3,7)		
druga srčana bolest	2	(7,7)	9	(5,6)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Pušenje						
da	8	(38,1)	30	(26,5)	0,299	0,897
ne	13	(61,9)	83	(73,5)		
ukupno	21	(100,0)	113	(100,0)		
Hipertenzija						
da	3	(11,5)	15	(9,3)	>0,999	>0,999
ne	23	(88,5)	146	(90,7)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	14	(53,8)	112	(69,6)	0,120	0,360

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	12	(46,2)	49	(30,4)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	16	(69,6)	97	(62,2)	0,644	>0,999
normalan	7	(30,4)	59	(37,8)		
ukupno	23	(100,0)	156	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7; mmol/L)	4	(17,4)	26	(16,7)	>0,999	>0,999
normalni	19	(82,6)	130	(83,3)		
ukupno	23	(100,0)	156	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	1	(4,3)	7	(4,5)	>0,999	>0,999
normalni	22	(95,7)	149	(95,5)		
ukupno	23	(100,0)	156	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	2	(14,3)	10	(10,0)	0,641	>0,999
normalan	12	(85,7)	90	(90,0)		
ukupno	14	(100,0)	100	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.8. Povezanost ACE I/D genotipova i kliničkih i biokemijskih parametara

Nije dobivena statistički značajna povezanost ACE genotipova s niti jednim od kliničkih i biokemijskih parametara, kako u skupini pacijenata, tako ni u kontrolnoj skupini. Provedena je i analiza povezanosti svakog pojedinog gena s kliničkim i biokemijskim parametrima.

Tablica 45. Povezanost ACE genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE						P	C
	II		ID		DD			
Spol								
muški	19	(70,4)	40	(70,2)	15	(50,0)	0,157	
ženski	8	(29,6)	17	(29,8)	15	(50,0)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(51-60)	57	(54-61)	57	(52-60)	0,424*	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	14	(51,9)	36	(63,2)	21	(70,0)	0,384	
nisu pretili	13	(48,1)	21	(36,8)	9	(30,0)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	21	(77,8)	36	(63,2)	21	(70,0)	0,245	
CVI	3	(11,1)	8	(14,0)	7	(23,3)		
druga srčana bolest	3	(11,1)	13	(22,8)	2	(6,7)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		
Pušenje								
da	6	(22,2)	24	(42,1)	8	(26,7)	0,122	
ne	21	(77,8)	33	(57,9)	22	(73,3)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

Fizička aktivnost							
da	16	(59,3)	38	(66,7)	17	(56,7)	0,657
ne	11	(40,7)	19	(33,3)	13	(43,3)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	
Hipertenzija							
da	13	(48,1)	30	(52,6)	15	(50,0)	0,912
ne	14	(51,9)	27	(47,4)	15	(50,0)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	
Ukupni kolesterol							
povišen (>5.0 mmol/L)	10	(37,0)	35	(61,4)	18	(60,0)	0,104
normalan	17	(63,0)	22	(38,6)	12	(40,0)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon* Kruskal Wallis Test

Tablica 46. Povezanost ACE genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE						P	C
	II	ID	DD					
LDL								
povišen (>3.0 mmol/L)	9	(36,0)	20	(36,4)	15	(50,0)	0,460	
normalan	16	(64,0)	35	(63,6)	15	(50,0)		
ukupno	25	(100,0)	55	(100,0)	30	(100,0)		
Trigliceridi								
povišeni (>1.7 mmol/L)	7	(26,9)	12	(21,8)	13	(44,8)	0,084	
normalni	19	(73,1)	43	(78,2)	16	(55,2)		
ukupno	26	(100,0)	55	(100,0)	29	(100,0)		
HDL								
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	4	(15,4)	20	(36,4)	13	(43,3)	0,075	
normalni	22	(84,6)	35	(63,6)	17	(56,7)		
ukupno	26	(100,0)	55	(100,0)	30	(100,0)		
C-reaktivni protein								
povišen (>5.0 mg/L)	13	(48,1)	28	(49,1)	13	(43,3)	0,880	
normalan	14	(51,9)	29	(50,9)	17	(56,7)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		
Moždani udar								
bez ishemije	4	(14,8)	9	(15,8)	2	(6,7)	0,245	
prednji desni	10	(37,0)	16	(28,1)	9	(30,0)		
prednji lijevi	5	(18,5)	18	(31,6)	3	(10,0)		
stražnji desni	2	(7,4)	6	(10,5)	8	(26,7)		
stražnji lijevi	3	(11,1)	4	(7,0)	4	(13,3)		
ishemija u moždanom deblu	3	(11,1)	4	(7,0)	4	(13,3)		
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)		
CDFI karotida								

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

uredan	10	(37,0)	16	(28,1)	7	(23,3)	0,831
bez stenozе	3	(11,1)	10	(17,5)	4	(13,3)	
značajna stenozа	4	(14,8)	8	(14,0)	3	(10,0)	
aterosklerotske promjene	10	(37,0)	23	(40,4)	16	(53,3)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	
UZV srca							
nije rađen	12	(44,4)	24	(42,1)	12	(40,0)	0,371
uredan	11	(40,7)	27	(47,4)	9	(30,0)	
perzistentan foramen ovale	1	(3,7)	1	(1,8)	3	(10,0)	
ostalo	3	(11,1)	5	(8,8)	6	(20,0)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	
Holter EKG							
nije rađen	6	(22,2)	6	(10,5)	6	(20,0)	0,613
sinus ritam	19	(70,4)	48	(84,2)	22	(73,3)	
Fibrilacija natrija	2	(7,4)	3	(5,3)	2	(6,7)	
ukupno	27	(100,0)	57	(100,0)	30	(100,0)	
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-2)	1	(1-2)	1	(1-3)	0,737*

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

Tablica 47. Povezanost ACE genotipova sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	ACE						P	A
	II		ID		D.D.			
Spol								
muški	14	(36,8)	35	(37,6)	21	(37,5)	0,996	
ženski	24	(63,2)	58	(62,4)	35	(62,5)		
ukupno	38	(100,0)	93	(100,0)	56	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(51-59)	54	(50-61)	55	(49-62)	0,996*	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	17	(44,7)	35	(37,6)	17	(30,4)	0,379	
nisu pretili	21	(55,3)	58	(62,4)	39	(69,6)		
ukupno	38	(100,0)	93	(100,0)	56	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	36	(94,7)	80	(86,0)	53	(94,6)	0,399	
CVI	1	(2,6)	5	(5,4)	1	(1,8)		
druga srčana bolest	1	(2,6)	8	(8,6)	2	(3,6)		
ukupno	38	(100,0)	93	(100,0)	56	(100,0)		
Pušenje								
da	6	(22,2)	24	(35,8)	8	(20,0)	0,163	
ne	21	(77,8)	43	(64,2)	32	(80,0)		
ukupno	27	(100,0)	67	(100,0)	40	(100,0)		
Hipertenzija								
da	3	(7,9)	12	(12,9)	3	(5,4)	0,298	
ne	35	(92,1)	81	(87,1)	53	(94,6)		
ukupno	38	(100,0)	93	(100,0)	56	(100,0)		
Ukupni kolesterol								
povišen (>5.0 mmol/L)	23	(60,5)	64	(68,8)	39	(69,6)	0,612	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	15	(39,5)	29	(31,2)	17	(30,4)	
ukupno	38	(100,0)	93	(100,0)	56	(100,0)	
LDL							
povišen (>3.0 mmol/L)	24	(66,7)	56	(63,6)	33	(60,0)	0,823
normalan	12	(33,3)	32	(36,4)	22	(40,0)	
ukupno	36	(100,0)	88	(100,0)	55	(100,0)	
Trigliceridi							
povišeni (>1.7 mmol/L)	9	(25,0)	11	(12,5)	10	(18,2)	0,223
normalni	27	(75,0)	77	(87,5)	45	(81,8)	
ukupno	36	(100,0)	88	(100,0)	55	(100,0)	
HDL							
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	2	(5,6)	3	(3,4)	3	(5,5)	0,801
normalni	34	(94,4)	85	(96,6)	52	(94,5)	
ukupno	36	(100,0)	88	(100,0)	55	(100,0)	
C-reaktivni protein							
povišen (>5.0 mg/L)	3	(12,0)	5	(9,1)	4	(11,8)	0,928
normalan	22	(88,0)	50	(90,9)	30	(88,2)	
ukupno	25	(100,0)	55	(100,0)	34	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

5.8.1. Povezanost pojedinog ACE genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima

Nije dobivena statistički značajna povezanost pojedinih genotipova ACE s kliničkim i biokemijskim parametrima.

5.8.1.1. Genotip ACE II

Tablica 48. Povezanost ACE II genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE				P	Psc
	II		ostali			
Spol						
muški	19	(70,4)	55	(63,2)	0,645	>0,999
ženski	8	(29,6)	32	(36,8)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(51-60)	57	(53-60)	0,249*	0,747
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	14	(51,9)	57	(65,5)	0,256	0,768
nisu pretili	13	(48,1)	30	(34,5)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	21	(77,8)	57	(65,5)	0,573	>0,999
CVI	3	(11,1)	15	(17,2)		
druga srčana bolest	3	(11,1)	15	(17,2)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Pušenje						
da	6	(22,2)	32	(36,8)	0,242	0,726
ne	21	(77,8)	55	(63,2)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Fizička aktivnost						

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

da	16	(59,3)	55	(63,2)	0,821	>0,999
ne	11	(40,7)	32	(36,8)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Hipertenzija						
da	13	(48,1)	45	(51,7)	0,827	>0,999
ne	14	(51,9)	42	(48,3)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	10	(37,0)	53	(60,9)	0,045	0,135
normalan	17	(63,0)	34	(39,1)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 49. Povezanost ACE II genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE		P	Psc		
	II	ostali				
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	9	(36,0)	35	(41,2)	0,817	>0,999
normalan	16	(64,0)	50	(58,8)		
ukupno	25	(100,0)	85	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7mmol/L)	7	(26,9)	25	(29,8)	0,812	>0,999
normalni	19	(73,1)	59	(70,2)		
ukupno	26	(100,0)	84	(100,0)		
HDL						
sníženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	4	(15,4)	33	(38,8)	0,032	0,096
normalni	22	(84,6)	52	(61,2)		
ukupno	26	(100,0)	85	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	13	(48,1)	41	(47,1)	0,926	>0,999
normalan	14	(51,9)	46	(52,9)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Moždani udar (regija)						
bez ishemije	4	(14,8)	11	(12,6)	0,855	>0,999
prednji desni	10	(37,0)	25	(28,7)		
prednji lijevi	5	(18,5)	21	(24,1)		
stražnji desni	2	(7,4)	14	(16,1)		
stražnji lijevi	3	(11,1)	8	(9,2)		
ishemija u moždanome deblu	3	(11,1)	8	(9,2)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	10	(37,0)	23	(26,4)	0,701	>0,999
bez stenozе	3	(11,1)	14	(16,1)		
značajna stenozа	4	(14,8)	11	(12,6)		
aterosklerotske promjene	10	(37,0)	39	(44,8)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
UZV srca						
nije orađen	12	(44,4)	36	(41,4)	0,989	>0,999
uredan	11	(40,7)	36	(41,4)		
perzistentan foramen ovale	1	(3,7)	4	(4,6)		
ostalo	3	(11,1)	11	(12,6)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	6	(22,2)	12	(13,8)	0,585	>0,999
sinus ritam	19	(70,4)	70	(80,5)		
Fibrilacija atriја	2	(7,4)	5	(5,7)		
ukupno	27	(100,0)	87	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-2)	1	(1-2)	0,575*	>0,999

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* MannWhitney U Test

Tablica 50. Povezanost ACE II genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	ACE				P	Psc
	II		ostali			
Spol						
muški	14	(36,8)	56	(37,6)	0,933	>0,999
ženski	24	(63,2)	93	(62,4)		
ukupno	38	(100,0)	149	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(51-59)	55	(50-61)	0,982*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	17	(44,7)	52	(34,9)	0,346	>0,999
nisu pretili	21	(55,3)	97	(65,1)		
ukupno	38	(100,0)	149	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	36	(94,7)	133	(89,3)	0,656	>0,999
CVI	1	(2,6)	6	(4,0)		
druga srčana bolest	1	(2,6)	10	(6,7)		
ukupno	38	(100,0)	149	(100,0)		
Pušenje						
da	6	(22,2)	32	(29,9)	0,484	>0,999
ne	21	(77,8)	75	(70,1)		
ukupno	27	(100,0)	107	(100,0)		
Hipertenzija						
da	3	(7,9)	15	(10,1)	0,772	>0,999
ne	35	(92,1)	134	(89,9)		
ukupno	38	(100,0)	149	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	23	(60,5)	103	(69,1)	0,336	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	15	(39,5)	46	(30,9)		
ukupno	38	(100,0)	149	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	24	(66,7)	89	(62,2)	0,701	>0,999
normalan	12	(33,3)	54	(37,8)		
ukupno	36	(100,0)	143	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	9	(25,0)	21	(14,7)	0,201	>0,999
normalni	27	(75,0)	122	(85,3)		
ukupno	36	(100,0)	143	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	2	(5,6)	6	(4,2)	0,663	>0,999
normalni	34	(94,4)	137	(95,8)		
ukupno	36	(100,0)	143	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	3	(12,0)	9	(10,1)	0,724	>0,999
normalan	22	(88,0)	80	(89,9)		
ukupno	25	(100,0)	89	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.8.1.2. Genotip ACE ID

Tablica 51. Povezanost ACE ID genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE				P	P _{sc}
	ID		ostali			
Spol						
muški	40	(70,2)	34	(59,6)	0,327	0,981
ženski	17	(29,8)	23	(40,4)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	57	(54-61)	56	(51-60)	0,248*	0,744
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	36	(63,2)	35	(61,4)	0,847	>0,999
nisu pretili	21	(36,8)	22	(38,6)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	36	(63,2)	42	(73,7)	0,144	0,432
CVI	8	(14,0)	10	(17,5)		
druga srčana bolest	13	(22,8)	5	(8,8)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Pušenje						
da	24	(42,1)	14	(24,6)	0,073	0,219
ne	33	(57,9)	43	(75,4)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	38	(66,7)	33	(57,9)	0,440	>0,999
ne	19	(33,3)	24	(42,1)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

Hipertenzija						
da	30	(52,6)	28	(49,1)	0,852	>0,999
ne	27	(47,4)	29	(50,9)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	35	(61,4)	28	(49,1)	0,258	0,774
normalan	22	(38,6)	29	(50,9)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 52. Povezanost ACE ID genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE				P	Psc
	ID		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	20	(36,4)	24	(43,6)	0,560	>0,999
normalan	35	(63,6)	31	(56,4)		
ukupno	55	(100,0)	55	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	12	(21,8)	20	(36,4)	0,141	0,423
normalni	43	(78,2)	35	(63,6)		
ukupno	55	(100,0)	55	(100,0)		
HDL						
sníženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	20	(36,4)	17	(30,4)	0,550	>0,999
normalni	35	(63,6)	39	(69,6)		
ukupno	55	(100,0)	56	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	28	(49,1)	26	(45,6)	0,851	>0,999
normalan	29	(50,9)	31	(54,4)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	9	(15,8)	6	(10,5)	0,199	0,597
prednji desni	16	(28,1)	19	(33,3)		
prednji lijevi	18	(31,6)	8	(14,0)		
stražnji desni	6	(10,5)	10	(17,5)		
stražnji lijevi	4	(7,0)	7	(12,3)		
ishemija u moždanome deblu	4	(7,0)	7	(12,3)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	16	(28,1)	17	(29,8)	0,880	>0,999
bez stenozе	10	(17,5)	7	(12,3)		
značajna stenozа	8	(14,0)	7	(12,3)		
aterosklerotske promjene	23	(40,4)	26	(45,6)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	24	(42,1)	24	(42,1)	0,256	0,768
uredan	27	(47,4)	20	(35,1)		
perzistentan foramen ovale	1	(1,8)	4	(7,0)		
ostalo	5	(8,8)	9	(15,8)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	6	(10,5)	12	(21,1)	0,284	0,852
sinus ritma	48	(84,2)	41	(71,9)		
Fibrilacija atriја	3	(5,3)	4	(7,0)		
ukupno	57	(100,0)	57	(100,0)		
mRS-at discharge; medijan (IQR)	1	(2-2)	1	(1-2)	0,895*	>0,999

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* MannWhitney U Test

Tablica 53. Povezanost ACE ID genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	ACE				P	Psc
	ID		ostali			
Spol						
muški	35	(37,6)	35	(37,2)	0,955	>0,999
ženski	58	(62,4)	59	(62,8)		
ukupno	93	(100,0)	94	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)						
	54	(50-61)	55	(50-60)	0,954*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	35	(37,6)	34	(36,2)	0,880	>0,999
nisu pretili	58	(62,4)	60	(63,8)		
ukupno	93	(100,0)	94	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	80	(86,0)	89	(94,7)	0,137	0,411
CVI	5	(5,4)	2	(2,1)		
druga srčana bolest	8	(8,6)	3	(3,2)		
ukupno	93	(100,0)	94	(100,0)		
Pušenje						
da	24	(35,8)	14	(20,9)	0,084	0,252
ne	43	(64,2)	53	(79,1)		
ukupno	67	(100,0)	67	(100,0)		
Hipertenzija						
da	12	(12,9)	6	(6,4)	0,131	0,393
ne	81	(87,1)	88	(93,6)		
ukupno	93	(100,0)	94	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	64	(68,8)	62	(66,0)	0,677	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	29	(31,2)	32	(34,0)		
ukupno	93	(100,0)	94	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	56	(63,6)	57	(62,6)	0,890	>0,999
normalan	32	(36,4)	34	(37,4)		
ukupno	88	(100,0)	91	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	11	(12,5)	19	(20,9)	0,163	0,489
normalni	77	(87,5)	72	(79,1)		
ukupno	88	(100,0)	91	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	3	(3,4)	5	(5,5)	0,721	>0,999
normalni	85	(96,6)	86	(94,5)		
ukupno	88	(100,0)	91	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	5	(9,1)	7	(11,9)	0,764	>0,999
normalan	50	(90,9)	52	(88,1)		
ukupno	55	(100,0)	59	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.8.1.3. Genotip ACE DD

Tablica 54. Povezanost ACE DD genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE				P	Psc
	DD		ostali			
Spol						
muški	15	(50,0)	59	(70,2)	0,073	0,219
ženski	15	(50,0)	25	(29,8)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	57	(52-60)	57	(53-60)	0,869*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	21	(70,0)	50	(59,5)	0,383	>0,999
nisu pretili	9	(30,0)	34	(40,5)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	21	(70,0)	57	(67,9)	0,195	0,585
CVI	7	(23,3)	11	(13,1)		
druga srčana bolest	2	(6,7)	16	(19,0)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Pušenje						
da	8	(26,7)	30	(35,7)	0,499	>0,999
ne	22	(73,3)	54	(64,3)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	17	(56,7)	54	(64,3)	0,514	>0,999
ne	13	(43,3)	30	(35,7)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

Hipertenzija						
da	15	(50,0)	43	(51,2)	0,911	>0,999
ne	15	(50,0)	41	(48,8)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	18	(60,0)	45	(53,6)	0,670	>0,999
normalan	12	(40,0)	39	(46,4)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 55. Povezanost ACE DD genotipa kliničkim i biokemijskim parametrima prema DD genotipu u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	ACE				P	Psc
	DD		ostali			
LDL						
povišeni (>3.0 mmol/L)	15	(50,0)	29	(36,3)	0,274	0,822
normalan	15	(50,0)	51	(63,8)		
ukupno	30	(100,0)	80	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	13	(44,8)	19	(23,5)	0,035	0,105
normalni	16	(55,2)	62	(76,5)		
ukupno	29	(100,0)	81	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	13	(43,3)	24	(29,6)	0,257	0,771
normalni	17	(56,7)	57	(70,4)		
ukupno	30	(100,0)	81	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	13	(43,3)	41	(48,8)	0,673	>0,999
normalan	17	(56,7)	43	(51,2)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	2	(6,7)	13	(15,5)	0,075	0,225
prednji desni	9	(30,0)	26	(31,0)		
prednji lijevi	3	(10,0)	23	(27,4)		
stražnji desni	8	(26,7)	8	(9,5)		
stražnji lijevi	4	(13,3)	7	(8,3)		
ishemija u moždanome deblu	4	(13,3)	7	(8,3)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	7	(23,3)	26	(31,0)	0,624	>0,999
bez stenozе	4	(13,3)	13	(15,5)		
značajna stenozа	3	(10,0)	12	(14,3)		
aterosklerotske promjene	16	(53,3)	33	(39,3)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	12	(40,0)	36	(42,9)	0,097	0,291
uredan	9	(30,0)	38	(45,2)		
perzistentan foramen ovale	3	(10,0)	2	(2,4)		
ostalo	6	(20,0)	8	(9,5)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	6	(20,0)	12	(14,3)	0,785	>0,999
sinus ritam	22	(73,3)	67	(79,8)		
Fibrilacija atrija	2	(6,7)	5	(6,0)		
ukupno	30	(100,0)	84	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(1-3)	1	(1-2)	0,491*	>0,999

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

Psc – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije * MannWhitney U Test

Tablica 56. Povezanost ACE DD genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	ACE				P	Psc
	DD		ostali			
Spol						
muški	21	(37,5)	49	(37,4)	0,990	>0,999
ženski	35	(62,5)	82	(62,6)		
ukupno	56	(100,0)	131	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(49-62)	54	(50-60)	0,931*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	17	(30,4)	52	(39,7)	0,250	0,750
nisu pretili	39	(69,6)	79	(60,3)		
ukupno	56	(100,0)	131	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	53	(94,6)	116	(88,5)	0,454	>0,999
CVI	1	(1,8)	6	(4,6)		
druga srčana bolest	2	(3,6)	9	(6,9)		
ukupno	56	(100,0)	131	(100,0)		
Pušenje						
da	8	(20,0)	30	(31,9)	0,210	0,630
ne	32	(80,0)	64	(68,1)		
ukupno	40	(100,0)	94	(100,0)		
Hipertenzija						
da	3	(5,4)	15	(11,5)	0,281	0,843
ne	53	(94,6)	116	(88,5)		
ukupno	56	(100,0)	131	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	39	(69,6)	87	(66,4)	0,735	>0,999

normalan	17	(30,4)	44	(33,6)		
ukupno	56	(100,0)	131	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	33	(60,0)	80	(64,5)	0,616	>0,999
normalan	22	(40,0)	44	(35,5)		
ukupno	55	(100,0)	124	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	10	(18,2)	20	(16,1)	0,829	>0,999
normalni	45	(81,8)	104	(83,9)		
ukupno	55	(100,0)	124	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	3	(5,5)	5	(4,0)	0,703	>0,999
normalni	52	(94,5)	119	(96,0)		
ukupno	55	(100,0)	124	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	4	(11,8)	8	(10,0)	0,779	>0,999
normalan	30	(88,2)	72	(90,0)		
ukupno	34	(100,0)	80	(100,0)		

5.9. Povezanost *MTHFR C677T* genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima

U skupini pacijenata nije dobivena statistički značajna povezanost *MTHFR C677T* genotipova s niti jednim kliničkim ili biokemijskim parametrom. Unutar kontrolne skupine dobivena je statistički značajna povezanost s pušenjem ($\chi^2 = 8,808$; $df = 2$, $P = 0.011$; $C = 0.245$), pri čemu su pušači bili češći među sudionicima s TT genotipom. Provjerena je i povezanost svakog pojedinog genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima.

Tablica 57. Povezanost MTHFR genotipova sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	MTHFR						P	C
	CC		CT		TT			
Spol								
muški	36	(64,3)	30	(66,7)	8	(61,5)	0,922	
ženski	20	(35,7)	15	(33,3)	5	(38,5)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(52-60)	58	(53-61)	56	(44-59)	0,445*	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	31	(55,4)	30	(66,7)	10	(76,9)	0,260	
nisu pretili	25	(44,6)	15	(33,3)	3	(23,1)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	39	(69,6)	28	(62,2)	11	(84,6)	0,663	
CVI	9	(16,1)	8	(17,8)	1	(7,7)		
druga srčana bolest	8	(14,3)	9	(20,0)	1	(7,7)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Pušenje								
da	13	(23,2)	19	(42,2)	6	(46,2)	0,084	
ne	43	(76,8)	26	(57,8)	7	(53,8)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Fizička aktivnost								
da	35	(62,5)	27	(60,0)	9	(69,2)	0,862	
ne	21	(37,5)	18	(40,0)	4	(30,8)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Hipertenzija								
da	30	(53,6)	24	(53,3)	4	(30,8)	0,330	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ne	26	(46,4)	21	(46,7)	9	(69,2)	
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	
Ukupni kolesterol							
povišen (>5.0 mmol/L)	29	(51,8)	27	(60,0)	7	(53,8)	0,687
normalan	27	(48,2)	18	(40,0)	6	(46,2)	
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Kruskal Wallis Test

Tablica 58. Povezanost MTHFR genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	MTHFR						P	C
	CC	CT	TT					
LDL								
povišen (>3.0 mmol/L)	19	(35,2)	20	(46,5)	5	(38,5)	0,529	
normalan	35	(64,8)	23	(53,5)	8	(61,5)		
ukupno	54	(100,0)	43	(100,0)	13	(100,0)		
Trigliceridi								
povišeni (>1.7 mmol/L)	16	(29,1)	12	(27,9)	4	(33,3)	0,953	
normalni	39	(70,9)	31	(72,1)	8	(66,7)		
ukupno	55	(100,0)	43	(100,0)	12	(100,0)		
HDL								
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	19	(35,8)	15	(33,3)	3	(23,1)	0,693	
normalni	34	(64,2)	30	(66,7)	10	(76,9)		
ukupno	53	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
C-reaktivni protein								
povišen (>5.0 mg/L)	27	(48,2)	23	(51,1)	4	(30,8)	0,450	
normalan	29	(51,8)	22	(48,9)	9	(69,2)		
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)		
Moždani udar								
bez ishemije	6	(10,7)	6	(13,3)	3	(23,1)	0,745	
prednji desni	15	(26,8)	18	(40,0)	2	(15,4)		
prednji lijevi	15	(26,8)	8	(17,8)	3	(23,1)		
stražnji desni	8	(14,3)	6	(13,3)	2	(15,4)		
stražnji lijevi	7	(12,5)	2	(4,4)	2	(15,4)		
ishemija u moždanome deblu	5	(8,9)	5	(11,1)	1	(7,7)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	
CDFI karotida							
uredan	15	(26,8)	13	(28,9)	5	(38,5)	0,786
bez stenozе	9	(16,1)	6	(13,3)	2	(15,4)	
značajna stenozа	6	(10,7)	6	(13,3)	3	(23,1)	
aterosklerotske promjene	26	(46,4)	20	(44,4)	3	(23,1)	
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	
UZV srca							
nije rađen	24	(42,9)	19	(42,2)	5	(38,5)	0,472
uredan	22	(39,3)	21	(46,7)	4	(30,8)	
perzistentni foramen ovale	2	(3,6)	1	(2,2)	2	(15,4)	
ostalo	8	(14,3)	4	(8,9)	2	(15,4)	
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	
Holter EKG							
nije rađen	11	(19,6)	6	(13,3)	1	(7,7)	0,461
sinus ritam	40	(71,4)	37	(82,2)	12	(92,3)	
Fibrilacija atrija	5	(8,9)	2	(4,4)	0	(0,0)	
ukupno	56	(100,0)	45	(100,0)	13	(100,0)	
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(1-3)	1	(0-2)	1	(0-3)	0,395*

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

** Kruskal Wallis Test*

Tablica 59. Povezanost MTHFR genotipova sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	MTHFR						P	C
	CC		CT		TT			
Spol								
muški	27	(34,2)	28	(34,6)	14	(53,8)	0,157	
ženski	52	(65,8)	53	(65,4)	12	(46,2)		
ukupno	79	(100,0)	81	(100,0)	26	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(49-63)	54	(51-58)	59	(52-63)	0,197*	
BMI								
pretili (>25 kg/m ²)	29	(36,7)	31	(38,3)	8	(30,8)	0,796	
nisu pretili	50	(63,3)	50	(61,7)	18	(69,2)		
ukupno	79	(100,0)	81	(100,0)	26	(100,0)		
Obiteljska anamneza								
nema	70	(88,6)	75	(92,6)	23	(88,5)	0,913	
CVI	4	(5,1)	2	(2,5)	1	(3,8)		
druga srčana bolest	5	(6,3)	4	(4,9)	2	(7,7)		
ukupno	79	(100,0)	81	(100,0)	26	(100,0)		
Pušenje								
da	9	(16,1)	19	(33,9)	10	(47,6)	0,014	0,249
ne	47	(83,9)	37	(66,1)	11	(52,4)		
ukupno	56	(100,0)	56	(100,0)	21	(100,0)		
Hipertenzija								
da	8	(10,1)	6	(7,4)	3	(11,5)	0,778	
ne	71	(89,9)	75	(92,6)	23	(88,5)		
ukupno	79	(100,0)	81	(100,0)	26	(100,0)		
Ukupni kolesterol								
povišen (>5.0 mmol/L)	54	(68,4)	55	(67,9)	17	(65,4)	0,974	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	25	(31,6)	26	(32,1)	9	(34,6)	
ukupno	79	(100,0)	81	(100,0)	26	(100,0)	
LDL							
povišen (>3.0 mmol/L)	48	(63,2)	49	(63,6)	16	(61,5)	>0,999
normalan	28	(36,8)	28	(36,4)	10	(38,5)	
ukupno	76	(100,0)	77	(100,0)	26	(100,0)	
Trigliceridi							
povišeni (>1.7; mmol/L)	18	(23,7)	8	(10,4)	4	(15,4)	0,089
normalni	58	(76,3)	69	(89,6)	22	(84,6)	
ukupno	76	(100,0)	77	(100,0)	26	(100,0)	
HDL							
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	3	(3,9)	4	(5,2)	1	(3,8)	>0,999
normalni	73	(96,1)	73	(94,8)	25	(96,2)	
ukupno	76	(100,0)	77	(100,0)	26	(100,0)	
C-reaktivni protein							
povišen (>5.0 mg/L)	6	(10,9)	6	(12,8)	0	(0,0)	0,489
normalan	49	(89,1)	41	(87,2)	12	(100,0)	
ukupno	55	(100,0)	47	(100,0)	12	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon.* Kruskal Wallis Test

5.9.1. Povezanost pojedinog *MTHFR* genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima

Dobivena je statistički značajna povezanost između CC genotipa i pušenja u kontrolnoj skupini ($\chi^2 = 7,149$; $df = 1$, Bonferronijeva korekcija, $P = 0,033$; $C = 0,225$), pri čemu su sudionici s CC genotipom češće bili nepušači u odnosu na sudionike s ostalim genotipovima. U skupini pacijenata nije dobivena statistički značajna povezanost CC genotipa i kliničkih i biokemijskih parametara.

5.9.1.1. Genotip *MTHFR* CC

Tablica 60. Povezanost MTHFR CC genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	<i>MTHFR</i>				P	Psc
	CC		ostali			
Spol						
muški	36	(64,3)	38	(65,5)	>0,999	>0,999
ženski	20	(35,7)	20	(34,5)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(52-60)	57	(52-60)	0,879*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	31	(55,4)	40	(69,0)	0,176	0,528
nisu pretili	25	(44,6)	18	(31,0)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	39	(69,6)	39	(67,2)	0,957	>0,999
CVI	9	(16,1)	9	(15,5)		
druga srčana bolest	8	(14,3)	10	(17,2)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Pušenje						

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

da	13	(23,2)	25	(43,1)	0,030	0,090
ne	43	(76,8)	33	(56,9)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	35	(62,5)	36	(62,1)	>0,999	>0,999
ne	21	(37,5)	22	(37,9)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Hipertenzija						
da	30	(53,6)	28	(48,3)	0,581	>0,999
ne	26	(46,4)	30	(51,7)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	29	(51,8)	34	(58,6)	0,572	>0,999
normalan	27	(48,2)	24	(41,4)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * Mann Whitney U Test

Tablica 61. Povezanost MTHFR CC genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	MTHFR				P	Psc
	CC		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	19	(35,2)	25	(44,6)	0,336	>0,999
normalan	35	(64,8)	31	(55,4)		
ukupno	54	(100,0)	56	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	16	(29,1)	16	(29,1)	>0,999	>0,999
normalni	39	(70,9)	39	(70,9)		
ukupno	55	(100,0)	55	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	19	(35,8)	18	(31,0)	0,688	>0,999
normalni	34	(64,2)	40	(69,0)		
ukupno	53	(100,0)	58	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	27	(48,2)	27	(46,6)	>0,999	>0,999
normalan	29	(51,8)	31	(53,4)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	6	(10,7)	9	(15,5)	0,742	>0,999
prednji desni	15	(26,8)	20	(34,5)		
prednji lijevi	15	(26,8)	11	(19,0)		
stražnji desni	8	(14,3)	8	(13,8)		
stražnji lijevi	7	(12,5)	4	(6,9)		
ishemija moždanoga debla	5	(8,9)	6	(10,3)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	15	(26,8)	18	(31,0)	0,789	>0,999
bez stenozе	9	(16,1)	8	(13,8)		
značajna stenozа	6	(10,7)	9	(15,5)		
aterosklerotske promjene	26	(46,4)	23	(39,7)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	24	(42,9)	24	(41,4)	0,886	>0,999
uredan	22	(39,3)	25	(43,1)		
perzistentni foramen ovale	2	(3,6)	3	(5,2)		
ostalo	8	(14,3)	6	(10,3)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	11	(19,6)	7	(12,1)	0,226	0,678
sinus ritma	40	(71,4)	49	(84,5)		
Fibrilacija atriја	5	(8,9)	2	(3,4)		
ukupno	56	(100,0)	58	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(1-3)	1	(0-2)	0,167*	0,501

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * MannWhitney U Test

Tablica 62. Povezanost MTHFR CC genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	MTHFR				P	Psc
	CC		ostali			
Spol						
muški	27	(34,2)	43	(39,8)	0,449	>0,999
ženski	52	(65,8)	65	(60,2)		
ukupno	79	(100,0)	108	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	55	(49-63)	54	(51-59)	0,642*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	29	(36,7)	40	(37,0)	>0,999	>0,999
nisu pretili	50	(63,3)	68	(63,0)		
ukupno	79	(100,0)	108	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	70	(88,6)	99	(91,7)	0,800	>0,999
CVI	4	(5,1)	3	(2,8)		
druga srčana bolest	5	(6,3)	6	(5,6)		
ukupno	79	(100,0)	108	(100,0)		
Pušenje						
da	9	(16,1)	29	(37,2)	0,011	0,033
ne	47	(83,9)	49	(62,8)		
ukupno	56	(100,0)	78	(100,0)		
Hipertenzija						
da	8	(10,1)	10	(9,3)	>0,999	>0,999
ne	71	(89,9)	98	(90,7)		
ukupno	79	(100,0)	108	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	54	(68,4)	72	(66,7)	0,875	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	25	(31,6)	36	(33,3)		
ukupno	79	(100,0)	108	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	48	(63,2)	65	(63,1)	>0,999	>0,999
normalan	28	(36,8)	38	(36,9)		
ukupno	76	(100,0)	103	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7; mmol/L)	18	(23,7)	12	(11,7)	0,043	0,129
normalni	58	(76,3)	91	(88,3)		
ukupno	76	(100,0)	103	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	3	(3,9)	5	(4,9)	>0,999	>0,999
normalni	73	(96,1)	98	(95,1)		
ukupno	76	(100,0)	103	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	6	(10,9)	6	(10,2)	>0,999	>0,999
normalan	49	(89,1)	53	(89,8)		
ukupno	55	(100,0)	59	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.9.1.2. Genotip *MTHFR* C677T

Nije dobivena statistički značajna povezanost CT genotipa s niti jednim od kliničkih i biokemijskih parametara u skupini pacijenata, kao ni u kontrolnoj skupini.

Tablica 63. Povezanost MTHFR CT genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	<i>MTHFR</i>				P	Psc
	CT		ostali			
Spol						
muški	30	(66,7)	44	(63,8)	0,842	>0,999
ženski	15	(33,3)	25	(36,2)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	58	(53-61)	56	(52-60)	0,366*	>0,999
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	30	(66,7)	41	(59,4)	0,554	>0,999
nisu pretili	15	(33,3)	28	(40,6)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	28	(62,2)	50	(72,5)	0,477	>0,999
CVI	8	(17,8)	10	(14,5)		
druga srčana bolest	9	(20,0)	9	(13,0)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Pušenje						
da	19	(42,2)	19	(27,5)	0,154	0,462
ne	26	(57,8)	50	(72,5)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	27	(60,0)	44	(63,8)	0,697	>0,999
ne	18	(40,0)	25	(36,2)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Hipertenzija						
da	24	(53,3)	34	(49,3)	0,705	>0,999
ne	21	(46,7)	35	(50,7)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	27	(60,0)	36	(52,2)	0,446	>0,999
normalan	18	(40,0)	33	(47,8)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 64. Povezanost MTHFR CT genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	MTHFR				P	P _{sc}
	CT		ostali			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	20	(46,5)	24	(35,8)	0,320	0,960
normalan	23	(53,5)	43	(64,2)		
ukupno	43	(100,0)	67	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7;mmol/L)	12	(27,9)	20	(29,9)	0,834	>0,999
normalni	31	(72,1)	47	(70,1)		
ukupno	43	(100,0)	67	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	15	(33,3)	22	(33,3)	>0,999	0,999
normalni	30	(66,7)	44	(66,7)		
ukupno	45	(100,0)	66	(100,0)		
C-reaktivni proteina						
povišen (>5.0 mg/L)	23	(51,1)	31	(44,9)	0,568	0,999
normalan	22	(48,9)	38	(55,1)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	6	(13,3)	9	(13,0)	0,398	0,999
prednji desni	18	(40,0)	17	(24,6)		
prednji lijevi	8	(17,8)	18	(26,1)		
stražnji desni	6	(13,3)	10	(14,5)		
stražnji lijevi	2	(4,4)	9	(13,0)		
ishemija u moždanome debelu	5	(11,1)	6	(8,7)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida						
uredan	13	(28,9)	20	(29,0)	0,991	0,999
bez stenozе	6	(13,3)	11	(15,9)		
značajna stenozа	6	(13,3)	9	(13,0)		
aterosklerotske promjene	20	(44,4)	29	(42,0)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	19	(42,2)	29	(42,0)	0,569	0,999
uredan	21	(46,7)	26	(37,7)		
perzistentni foramen ovale	1	(2,2)	4	(5,8)		
ostalo	4	(8,9)	10	(14,5)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	6	(13,3)	12	(17,4)	0,729	0,999
sinus ritam	37	(82,2)	52	(75,4)		
Fibrilacija atrija	2	(4,4)	5	(7,2)		
ukupno	45	(100,0)	69	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-1)	1	(1-3)	0,240*	0,720

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije. * MannWhitney U Test

Tablica 65. Povezanost MTHFR CT genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	MTHFR				P	Psc
	CT		ostali			
Spol						
muški	28	(34,6)	42	(39,6)	0,543	>0,999
ženski	53	(65,4)	64	(60,4)		
ukupno	81	(100,0)	106	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	54	(51-58)	56	(49-62)	0,140*	0,420
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	31	(38,3)	38	(35,8)	0,761	>0,999
nisu pretili	50	(61,7)	68	(64,2)		
ukupno	81	(100,0)	106	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	75	(92,6)	94	(88,7)	0,638	>0,999
CVI	2	(2,5)	5	(4,7)		
druga srčana bolest	4	(4,9)	7	(6,6)		
ukupno	81	(100,0)	106	(100,0)		
Pušenje						
da	19	(33,9)	19	(24,4)	0,248	0,744
ne	37	(66,1)	59	(75,6)		
ukupno	56	(100,0)	78	(100,0)		
Hipertenzija						
da	6	(7,4)	12	(11,3)	0,457	>0,999
ne	75	(92,6)	94	(88,7)		
ukupno	81	(100,0)	106	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	55	(67,9)	71	(67,0)	>0,999	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	26	(32,1)	35	(33,0)		
ukupno	81	(100,0)	106	(100,0)		
LDL						
povišeni (>3.0 mmol/L)	49	(63,6)	64	(62,7)	>0,999	>0,999
normalan	28	(36,4)	38	(37,3)		
ukupno	77	(100,0)	102	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	8	(10,4)	22	(21,6)	0,068	0,204
normalni	69	(89,6)	80	(78,4)		
ukupno	77	(100,0)	102	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	4	(5,2)	4	(3,9)	0,727	>0,999
normalni	73	(94,8)	98	(96,1)		
ukupno	77	(100,0)	102	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	6	(12,8)	6	(9,0)	0,548	>0,999
normalan	41	(87,2)	61	(91,0)		
ukupno	47	(100,0)	67	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

5.9.1.3. Genotip *MTHFR* TT

Nije dobivena statistički značajna povezanost TT genotipa s niti jednim od kliničkih i biokemijskih parametara u skupini pacijenata, kao ni u kontrolnoj skupini.

Tablica 66. Povezanost *MTHFR* TT genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	<i>MTHFR</i>		P	P _{sc}		
	TT	ostali				
Spol						
muški	8	(61,5)	66	(65,3)	>0,999	>0,999
ženski	5	(38,5)	35	(34,7)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(44-59)	57	(53-60)	0,266*	0,798
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	10	(76,9)	61	(60,4)	0,364	>0,999
nisu pretili	3	(23,1)	40	(39,6)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	11	(84,6)	67	(66,3)	0,445	>0,999
CVI	1	(7,7)	17	(16,8)		
druga srčana bolest	1	(7,7)	17	(16,8)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Pušenje						
da	6	(46,2)	32	(31,7)	0,353	>0,999
ne	7	(53,8)	69	(68,3)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Fizička aktivnost						
da	9	(69,2)	62	(61,4)	0,764	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ne	4	(30,8)	39	(38,6)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Hipertenzija						
da	4	(30,8)	54	(53,5)	0,149	0,447
ne	9	(69,2)	47	(46,5)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	7	(53,8)	56	(55,4)	>0,999	>0,999
normalan	6	(46,2)	45	(44,6)		
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije.

* Mann Whitney U Test

Tablica 67. Povezanost MTHFR TT genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	MTHFR		P	P _{sc}	
	TT	ostali			
LDL					
povišen (>3.0 mmol/L)	5	(38,5)	39	(40,2)	>0,999
normalan	8	(61,5)	58	(59,8)	
ukupno	13	(100,0)	97	(100,0)	
Trigliceridi					
povišeni (>1.7 mmol/L)	4	(33,3)	28	(28,6)	0,732
normalni	8	(66,7)	70	(71,4)	
ukupno	12	(100,0)	98	(100,0)	
HDL					
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	3	(23,1)	34	(34,7)	0,538
normalni	10	(76,9)	64	(65,3)	
ukupno	13	(100,0)	98	(100,0)	
C-reaktivni protein					
povišen (>5.0 mg/L)	4	(30,8)	50	(49,5)	0,247
normalan	9	(69,2)	51	(50,5)	
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)	
Moždani udar					
bez ishemije	3	(23,1)	12	(11,9)	0,769
prednji desni	2	(15,4)	33	(32,7)	
prednji lijevi	3	(23,1)	23	(22,8)	
stražnji desni	2	(15,4)	14	(13,9)	
stražnji lijevi	2	(15,4)	9	(8,9)	
ishemija u moždanome deblu	1	(7,7)	10	(9,9)	
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

CDFI karotida					
uredan	5	(38,5)	28	(27,7)	0,437
bez stenozе	2	(15,4)	15	(14,9)	
značajna stenozа	3	(23,1)	12	(11,9)	
aterosklerotske promjene	3	(23,1)	46	(45,5)	
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)	
UZV srca					
nije rađeno	5	(38,5)	43	(42,6)	0,220
uredan	4	(30,8)	43	(42,6)	
perzistentni foramen ovale	2	(15,4)	3	(3,0)	
ostalo	2	(15,4)	12	(11,9)	
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)	
Holter EKG					
nije rađen	1	(7,7)	17	(16,8)	0,460
sinus ritam	12	(92,3)	77	(76,2)	
Fibrilacija atriја			7	(6,9)	
ukupno	13	(100,0)	101	(100,0)	
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-3)	1	(1-2)	0,730*

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{SC} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije * MannWhitney U Test

Tablica 68. Povezanost MTHFR TT genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	MTHFR				P	Psc
	TT		ostali			
Spol						
muški	14	(53,8)	56	(34,8)	0,080	0,240
ženski	12	(46,2)	105	(65,2)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	59	(52-63)	54	(50-60)	0,140*	0,420
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	8	(30,8)	61	(37,9)	0,521	>0,999
nisu pretili	18	(69,2)	100	(62,1)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	23	(88,5)	146	(90,7)	>0,999	>0,999
CVI	1	(3,8)	6	(3,7)		
druga srčana bolest	2	(7,7)	9	(5,6)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Pušenje						
da	10	(47,6)	28	(24,8)	0,039	0,117
ne	11	(52,4)	85	(75,2)		
ukupno	21	(100,0)	113	(100,0)		
Hipertenzija						
da	3	(11,5)	15	(9,3)	>0,999	>0,999
ne	23	(88,5)	146	(90,7)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	17	(65,4)	109	(67,7)	0,824	>0,999

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	9	(34,6)	52	(32,3)		
ukupno	26	(100,0)	161	(100,0)		
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	16	(61,5)	97	(63,4)	>0,999	>0,999
normalan	10	(38,5)	56	(36,6)		
ukupno	26	(100,0)	153	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	4	(15,4)	26	(17,0)	>0,999	>0,999
normalni	22	(84,6)	127	(83,0)		
ukupno	26	(100,0)	153	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	1	(3,8)	7	(4,6)	>0,999	>0,999
normalni	25	(96,2)	146	(95,4)		
ukupno	26	(100,0)	153	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	0	(0,0)	12	(11,8)	0,358	>0,999
normalan	12	(100,0)	90	(88,2)		
ukupno	12	(100,0)	102	(100,0)		

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

P_{sc} – P razina statističke značajnosti nakon Bonferronijeve korekcije * MannWhitney U Test

5.10. Povezanost APOE E2/E3/E4 genotipova s kliničkim i biokemijskim parametrima

U skupini pacijenata dobivena je statistički značajna razlika u mRS- kod otpusta između sudionika s 2/3 i 3/3 genotipom (Mann Whitney U=496,5; Z=-2,316; P=0,020; AUC=0,33), pri čemu su više vrijednosti zabilježene kod pacijenata s 3/3 genotipom. Također je dobivena statistički značajna razlika među pacijentima s 2/3 i 3/3 genotipom u tipu udara ($\chi^2 = 12,718$; df = 5, P = 0.023; C = 0.334). Unutar kontrolne skupine nije dobivena statistički značajna povezanost APOE genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima.

Tablica 69. Povezanost APOE genotipa sa spolom, dobi, fizičkim i anamnestičkim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	APOE				P	C
	2/3		3/3			
Spol						
muški	9	(52,9)	65	(67,0)	0,281	
ženski	8	(47,1)	32	(33,0)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	56	(53-60)	57	(52-60)	>0,999*	
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	9	(52,9)	62	(63,9)	0,424	
nisu pretili	8	(47,1)	35	(36,1)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	9	(52,9)	69	(71,1)	0,069	
CVI	2	(11,8)	16	(16,5)		
druga srčana bolest	6	(35,3)	12	(12,4)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
Pušenje						
da	7	(41,2)	31	(32,0)	0,457	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

ne	10	(58,8)	66	(68,0)	
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)	
Fizička aktivnost					
da	11	(64,7)	60	(61,9)	>0,999
ne	6	(35,3)	37	(38,1)	
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)	
Hipertenzija					
da	6	(35,3)	52	(53,6)	0,195
ne	11	(64,7)	45	(46,4)	
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)	
Ukupni kolesterol					
povišen (>5.0 mmol/L)	10	(58,8)	53	(54,6)	0,797
normalan	7	(41,2)	44	(45,4)	
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Mann Whitney U Test

Tablica 70. Povezanost APOE genotipa s kliničkim i biokemijskim parametrima u skupini pacijenata (n=114)

n(%)	APOE				P	C
	2/3		3/3			
LDL						
povišen (>3.0 mmol/L)	5	(31,3)	39	(41,5)	0,583	
normalan	11	(68,8)	55	(58,5)		
ukupno	16	(100,0)	94	(100,0)		
Trigliceridi						
povišeni (>1.7 mmol/L)	8	(47,1)	24	(25,8)	0,088	
normalni	9	(52,9)	69	(74,2)		
ukupno	17	(100,0)	93	(100,0)		
HDL						
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	7	(43,8)	30	(31,6)	0,394	
normalni	9	(56,3)	65	(68,4)		
ukupno	16	(100,0)	95	(100,0)		
C-reaktivni protein						
povišen (>5.0 mg/L)	9	(52,9)	45	(46,4)	0,793	
normalan	8	(47,1)	52	(53,6)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
Moždani udar						
bez ishemije	6	(35,3)	9	(9,3)	0,023	0,334
prednji desni	5	(29,4)	30	(30,9)		
prednji lijevi	2	(11,8)	24	(24,7)		
stražnji desni	1	(5,9)	15	(15,5)		
stražnji lijevi	3	(17,6)	8	(8,2)		
ishemija u moždanome deblu			11	(11,3)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
CDFI karotida						

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

uredan	6	(35,3)	27	(27,8)	0,089	
bez stenozе	1	(5,9)	16	(16,5)		
značajna stenozа	5	(29,4)	10	(10,3)		
aterosklerotske promjene	5	(29,4)	44	(45,4)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
UZV srca						
nije rađen	6	(35,3)	42	(43,3)	0,945	
uredan	8	(47,1)	39	(40,2)		
perzistentni foramen ovale	1	(5,9)	4	(4,1)		
ostalo	2	(11,8)	12	(12,4)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
Holter EKG						
nije rađen	2	(11,8)	16	(16,5)	0,448	
sinus ritma	15	(88,2)	74	(76,3)		
Fibrilacija atriја	0	(0,0)	7	(7,2)		
ukupno	17	(100,0)	97	(100,0)		
mRS-kod otpusta; medijan (IQR)	1	(0-1)	1	(1-2)	0,020*	0,33

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Mann Whitney U Test

Tablica 71. Povezanost APOE genotipa sa spolom, dobi, kliničkim i biokemijskim parametrima u kontrolnoj skupini (n=187)

n(%)	APOE				P	C
	2/3		3/3			
Spol						
muški	6	(33,3)	28	(30,1)	>0,999	
ženski	12	(66,7)	65	(69,9)		
ukupno	18	(100,0)	93	(100,0)		
Dob; medijan (IQR)	52	(48-57)	52	(47-59)	0,981*	
BMI						
pretili (>25 kg/m ²)	6	(33,3)	36	(38,7)	0,793	
nisu pretili	12	(66,7)	57	(61,3)		
ukupno	18	(100,0)	93	(100,0)		
Obiteljska anamneza						
nema	15	(83,3)	79	(84,9)	>0,999	
CVI	1	(5,6)	6	(6,5)		
druga srčana bolest	2	(11,1)	8	(8,6)		
ukupno	18	(100,0)	93	(100,0)		
Pušenje						
da	5	(35,7)	16	(25,4)	0,511	
ne	9	(64,3)	47	(74,6)		
ukupno	14	(100,0)	63	(100,0)		
Hipertenzija						
da	0	(0,0)	1	(1,1)	>0,999	
ne	18	(100,0)	92	(98,9)		
ukupno	18	(100,0)	93	(100,0)		
Ukupni kolesterol						
povišen (>5.0 mmol/L)	8	(44,4)	60	(64,5)	0,121	

Genetski biljezi ateroskleroze u cerebrovaskularnoj bolesti

normalan	10	(55,6)	33	(35,5)	
ukupno	18	(100,0)	93	(100,0)	
LDL					
povišen (>3.0 mmol/L)	7	(46,7)	53	(58,9)	0,410
normalan	8	(53,3)	37	(41,1)	
ukupno	15	(100,0)	90	(100,0)	
Trigliceridi					
povišeni (>1.7 mmol/L)	7	(46,7)	20	(22,2)	0,058
normalni	8	(53,3)	70	(77,8)	
ukupno	15	(100,0)	90	(100,0)	
HDL					
sniženi (m<1.0; ž<1.2 mmol/L)	2	(13,3)	6	(6,7)	0,598
normalni	13	(86,7)	84	(93,3)	
ukupno	15	(100,0)	90	(100,0)	
C-reaktivni protein					
povišen (>5.0 mg/L)	0	(0,0)	12	(13,8)	0,205
normalan	15	(100,0)	75	(86,2)	
ukupno	15	(100,0)	87	(100,0)	

KRATICE: P = Hi kvadrat (χ^2) test vjerojatnosti pogreške tipa I; C = Cramerov V koeficijent standardizirane mjere učinka, prikazan samo za statistički značajne rezultate; IQR = interkvartilni raspon

* Mann Whitney U Test

6. Rasprava

Istraživanja koja su se bavila genetičkom osnovom ishemijskog moždanog udara pokazala su da je moždani udar poligeni i multifaktorijski sindrom koji nastaje interakcijom i međudjelovanjem brojnih gena i čimbenika okoliša. Rasvjetljenje njegovih etioloških i patoloških mehanizama nastanka fokus je i predmet istraživanja mnogobrojnih studija već dugi niz godina. Uz poznate konvencionalne rizične čimbenike kao što su hipertenzija, dijabetes melitus, pušenje, hiperlipidemija, fibrilacija atrijska, afričko i/ili azijsko porijeklo, mnogobrojne provedene animalne, kliničke i epidemiološke studije pokazale su i potvrđuju utjecaj gena na razvoj i pojavnost moždanog udara (133-135). Iako precizan mehanizam utjecaja svakog pojedinog gena i genskog polimorfizma na pojavnost moždanoga udara nije u potpunosti jasan, dokazano je da genski rizični čimbenici za razvoj ishemijskog moždanoga udara mogu djelovati neovisno ili modulirati i utjecati na pojedine konvencionalne rizične čimbenike poput hipertenzije. Dakle, mogu djelovati na više razina: pridonose konvencionalnim rizičnim čimbenicima koji imaju svoju poznatu genetsku osnovu; interakcijom s okolišnim rizičnim čimbenicima (136) pridonose razvoju intermedijarnog fenotipa poput ateroskleroze; i na kraju, mogu latentno utjecati na veličinu ishemijske lezije, veličinu infarkta nakon začepljenja krvne žile, odnosno na konačni ishod moždanog udara (137-141). Razumijevanje genetičkih čimbenika i njihova utjecaja na razvoj moždanog udara, potom njihova utjecaja na pojedine konvencionalne rizične čimbenike za razvoj moždanog udara, klinički je vrlo važno jer su sva ta obilježja moždanog udara pod snažnom genetičkom kontrolom. No unatoč navedenoj činjenici, procjene nasljednosti i genetskog utjecaja su aproksimativne i često ne uzimaju u obzir interakciju gena i okoliša, prvenstveno tjelesne aktivnosti, prehrambenih navika, gena i spola, gena i rase, te gena i gena, jer ih je u humanoj populaciji teško razlučiti. Osim toga, procjene nasljednosti odnose se na određenu ispitivanu populaciju i samim time odražavaju specifičnosti i različitosti određene populacije te veliku raznolikost okolišnih čimbenika. Budući da je uloga pojedinačnih genskih polimorfizama – kao rizičnih čimbenika koji utječu na razvoj složenih poremećaja i bolesti te u konačnici na razvoj moždanoga udara – skromna, ispitivanje interakcija gena može rezultirati informacijama koje mogu biti klinički značajne. Samim time istraživanja genetske osnove moždanoga udara predstavljaju velik izazov znanstvenicima diljem svijeta.

PPAR nuklearni receptori reguliraju niz staničnih funkcija (rast, diferencijaciju, proliferaciju) te su važni transkripcijski regulatori metabolizma masti, ugljikohidrata. Nakon aktivacije

specifičnim ligandima djeluju na ciljane gene. Sve više studija ističe promotor-specifične regulacije koje se odvijaju kroz usklađeno djelovanje koregulatora i kroz integraciju vanjskih i unutarstaničnih signalnih puteva preko posttranslacijskih modifikacija. Glavni rezultat stanične aktivacije PPAR- α je uspostava ravnoteže između stanične proliferacije, diferencijacije, preživljavanja. PPAR γ receptor je ključna molekula u procesu aterogeneze, udružena je s razvojem metaboličkih riziko faktora kao što su pretilost i dijabetes te ima važno mjesto u substaničnom metabolizmu zida arterija (142). Važan je u regulaciji ekspresije više gena koji sudjeluju u regulaciji diferencijacije adipocita i uskladištenja lipida te regulaciji lipidne homeostaze i osjetljivosti na inzulin (143,144). Polinezasićene masne kiseline i prostanoidi glavani su prirodni ligandi. Nedavno je pokazano da aktivacija PPAR γ receptora smanjuje upalne procese u akutnom ishemijskom moždanom udaru (13). Dok je 15d-prostaglandin J2 (15d PGJ2) prirodni ligand PPAR γ receptora, thiazolidinediones (TZDs) predstavlja sintetski agonist. Dva TZDs rosiglitazon i pioglitazon odobreni su od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) za liječenje dijabetesa melitusa tip 2 (T2DM). Provedene su mnoge animalne studije koje su pokazale da TZDs djeluje neuroprotektivno kod modela s fokalnom cerebralnom ishemijom (145-148). PPAR γ receptor ima važnu ulogu u inzulinskoj osjetljivosti, aterosklerozi i upalnim procesima te endotelnoj staničnoj funkciji (149-151). Kroz sve ove procese jasno je, odnosno za pretpostaviti, da ima veliku ulogu u razvoju ishemijskog moždanog udara kod pacijenata s T2DM (152). Nedavne studije pokazale su da PPAR γ agonisti smanjuju pojavu moždanog udara kod pacijenata s T2DM (153). Upalni proces je jedna od ključnih komponenti tkivne plastičnosti i regeneracije. Upala posljedično ishemiji nastaje posljedično ekspresiji i aktivaciji proinflammatoryh gena i proteina iz okolnog moždanog parenhima, kao i stanica krvnih žila. Vrijeme aktivacije upalnih medijatora definira korisnost naspram štetnosti upalnih procesa, s jedne strane upalni proces je ključan u otklanjanju mrtvih stanica i pokretanju plastičnosti, no s druge strane nekontrolirani upalni proces precipitira neuronalnu smrt (154,155). Neuronalna ozljeda uslijed ishemije povezana je s masivnom upalom koja u konačnici rezultira trajnim oštećenjem mozga (156,157).

Nakon fokalnoga ishemijskog oštećenja mozga dolazi do ekspresije PPAR- γ mRNA u perinfarktnoj regiji te administracija egzogenih liganda poput TZDs povećava PPAR γ DNA vezanje i transkripciju nekoliko antiinflammatoryh ciljanih gena, što nadalje dovodi do inhibicije proinflammatoryh citokin signalnih puteva, uz povećanje antiinflammatoryh SOCS (engl. *suppressor of cytokine signaling*) proteina.

U našem radu ispitana je uloga polimorfizam *PPAR γ* Pro12Ala pojedinačno i u interakciji s ostalim istraživanim genima *IL-6*, *MTHFR*, *ACE* i *APOE*, no kod pacijenata bez T2DM. Vođeni spoznajom da aminokiselina Pro12Ala u *PPAR γ* može utjecati na strukturu a time i funkciju proteina – pri čemu varijanta 12Ala ima smanjen afinitet prema elementu odgovora u ciljanim genima, što u konačnici rezultira manje učinkovitom stimulacijom ciljanih gena – postavljena je hipoteza o mogućem značajnom učinku interakcije navedenih gena. U ovom istraživanju varijanta gena *PPAR γ* promatrana u interakciji s ostalim istraživanim varijantama gena *IL-6* 174 G>C, *ACE* I/D, *MTHFR* C677T, *APOE* E2,E3,E4 nije se pokazala značajnom za razvoj moždanoga udara, no kada je promatrana zasebno pokazalo se da varijanta Pro12Ala *PPAR γ* ima protektivni učinak na razvoj moždanog udara, dok je varijanta Pro12Pro statistički značajnije zabilježena u skupini pacijenata. Studija provedena u Koreji od strane Lee i sur. o ulozi *PPAR γ* Pro12Ala polimorfizma u moždanom udaru kod pacijenata s T2DM, kao i u pacijenata s moždanim udarom no bez T2DM, pokazala je da je Pro12Ala polimorfizam povezan s smanjenjem rizika moždanoga udara i da može imati protektivni učinak kod pacijenata s T2DM (143).

Khalid Z i sur. također su pokazali da *PPAR γ* Pro12Ala polimorfizam ima protektivnu ulogu u razvoju karotidne ateroskleroze (engl. intima media thickness, IMT) i moždanog udara (142). S druge strane, studija provedena u Danskoj koja je analizirala utjecaj i povezanost Pro12Ala polimorfizma s infarktom miokarda, koronarnom bolešću i ishemijskim moždanim udarom, nije našla povezanost Pro12Ala polimorfizma s navedenima stanjima (158). S obzirom na to da *IL-6* ima neuroprotektivnu ulogu nakon cerebralne ishemije, suprotno istom u kasnijoj fazi potiče i podražava upalne procesne i inducira neuronalnu smrt, Patzer A i sur. istražili su utjecaj *PPAR γ* na ekspresiju *IL-6* u peri-infarktnom tkivu u akutnoj i kasnijoj fazi cerebralne ishemije i pokazali su da administracija pioglitazona reducira veličinu infarkta te poboljšava neurološke funkcije, odnosno studija je pokazala da cerebralni *PPAR- γ* suprimira ekspresiju *IL-6* u ishemičkom moždanom tkivu tijekom inicijalne faze ishemije, u kojoj bi hiperprodukcija *IL-6* izazvala veće neurološko oštećenje, no ne u kasnijoj fazi kada *IL-6* ima neuroprotektivnu ulogu i inhibira smrt moždanih stanica (159). Daljnom analizom smo pokazali povezanost *PPAR γ* i CRP-a u kontrolnoj skupini, pri čemu su sudionici sa Pro12Pro imali povišenu razinu CRP-a. Nekoliko radova u literaturi opisuje povezanost *PPAR γ* polimorfizma i CRP-a. Yu i sur. su analizirali povezanost *PPAR* polimorfizma, razine CRP –a i pretilosti te su našli da interakcija *PPAR α* / δ kod pretilih rezultira povišenom razinom CRP-a (160). Slične rezultate pokazao je Gu i sur., i pokazao da *PPAR* polimorfizmi u interakciji s prekomjernom tjelesnom težinom dovode do povišene razine CRP-a (161).

Nadalje smo u našem radu istraživali ulogu *IL-6* gena polimorfizma -174 G>C i moždanog udara te ostalih praćenih biokemijskih parametara. IL-6 predstavlja proinflamatorni citokin, koji ima važnu ulogu u akutnom upalnom odgovoru i utječe na produkciju proteina rane faze upalnog odgovora kao što je CRP (61).

IL-6 igra centralnu ulogu u patogenezi moždanog udara. Studije su pokazale da povišena razina IL-6 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru u moždanom udaru korelira s veličinom infarkta (162-165). Cerebralna ishemija potiče ekspresiju IL-6 u neuronima i astrocitima, čija razina uvelike raste nakon moždanog udara i igra važnu ulogu kao molekula koja prenosi informaciju između leukocita, vaskularnog endotela i parenhima stanica (166). Na taj način IL-6 donosi niz različitih kompetirajućih efekata, uključujući anti-apoptotske, pro-proliferativne, inhibitore rasta i procese diferencijacije unutar staničnog konteksta. Polimorfizam u promotorskoj kodirajućoj regiji gena za *IL-6* povezan je s porastom razine ovog citokina. Promjena G u C na poziciji 174 *IL-6* gena kreira potencijalno vezno mjesto za NF-1 faktor, što nadalje rezultira represivnom ekspresijom gena. S druge strane, G alel povezan je s porastom cirkulirajuće razine IL-6 (167). Postoji niz studija koje su pokazale povezanost i bitnu ulogu *IL-6* polimorfizma -174 G>C s razvojem koronarne bolesti, potom karotidne ateroskleroze, no uloga u razvoju moždanog udara i dalje nije do kraja razjašnjena (168-170). Flex i sur. su u svom radu analizirali utjecaj više gena, između ostaloga *IL-6*, i njihovu ulogu u razvoju moždanog udara te su pokazali da *IL-6* -174GG i *IL-6* -174GC polimorfizmi statistički značajno utječu na pojavnost moždanog udara (171). Prema podacima iz literature postoji niz diskrepancija u korelaciji *IL-6* -174 G>C polimorfizma i moždanog udara. Greisenegger i sur. analizirali su utjecaj polimorfizma -174G>C *IL-6* na pojavu i težinu moždanoga udara kod 214 pacijenata u dobi do 60 godina te 214 zdravih kontrola; rezultati analize pokazali su povezanost -174GG polimorfizma s pojavnošću moždanog udara i s težinom istog (172). S druge strane, Revilla i sur., analizom utjecaja polimorfizma *IL-6* -174G>C kod 82 pacijenta s lakunarnim ishemijskim moždanim udarom, pokazali su statistički značajno višu prevalencu -174CC polimorfizma odnosno C alela u skupini pacijenata (173). U našem israživanju polimorfizam -174 GC *IL-6* statistički je značajno zabilježen u skupini pacijenata, dok je prisutnost CC genotipa za 70% smanjivala vjerojatnost pojave moždanog udara. Rezultati našega istraživanja u skladu su s rezultatima pojedinih studija. Tako je istraživanje koje su proveli Chakraborty i sur., tj. analiza 100 pacijenata s moždanim udarom, pokazalo statistički značajnu prisutnost polimorfizma -174G>C u skupini pacijenata te su isti imali težu kliničku sliku i lošiji ishod bolesti, za razliku od skupine s -174GG polimorfizmom, kod kojih su ishod bolesti i klinička slika bili mnogo blaži (174). Prisutnost

polimorfizma -174CC u našem radu smanjivala je vjerojatnost pojave moždanog udara za otprilike 70%. Rezultat sličan našem pokazao je Balding i sur., koji je u svojoj studiji pronašao da polimorfizam 174 CC ima protektivnu ulogu, odnosno smanjuje vjerojatnost pojave moždanoga udara za razliku od -174G>C polimorfizma koji povećava vjerojatnost istog (175). Nasuprot rezultatu navedene studije, a i rezultatima našeg rada, nedavno istraživanje provedeno na kineskoj populaciji pokazalo je da pojedinci nositelji -174CC polimorfizma i nositelji C alela u mlađoj životnoj dobi imaju veću vjerojatnost pojave moždanog udara te da ovaj polimorfizam interferira s konvencionalnim rizičnim faktorima poput hipertenzije, pretilosti (176). U našem radu, korelacijom i analizom interakcije svakog pojedinog polimorfizma gena *IL-6* s pojedinim kliničkim i biokemijskim parametrima, statističku značajnu povezanost našli smo u interakciji polimorfizma *IL-6* -174G>C i povišene razine CRP-a u skupini pacijenata; dok su normalne razine CRP bile češće kod pacijenata s GG genotipom, u kontrolnoj skupini normalne razine CRP-a nađene su u pojedinaca s -174CC polimorfizmom. Daljnom analizom literature našli smo podudarne rezultate. Istraživanja su pokazala da postoji značajna povezanost između porasta serumske razine proteina akutne upalne faze, CRP-a i *IL-6* citokina (177-179). Nadalje, dokazano je da porast upalnih agensa rezultira lošijim končanim ishodom (180). Sva ova istraživanja, pa i naše, pokazuju da *IL-6* gen i polimorfizmi istog imaju veliku ulogu u pojavnosti moždanoga udara, ali su nužna i daljnja istraživanja. U našoj studiji smo također našli da polimorfizmi gena *PPAR-γ* Pro12Ala i *IL-6* -174 GC (heterozigotnost) koji kodiraju srednje izraženu aktivnost pokazuju najznačajniju povezanost s ishemijskim moždanim udarom, što sugerira složeniju prirodu ovih sustava. Također možemo pretpostaviti da su još neke druge, nepoznate aktivne varijante gena povezane s aktivnošću nuklearnog receptora *PPAR-γ* i *IL-6*. Smatra se da različite pa čak i suprotne povezanosti mogu biti potvrda da aktivne varijante značajno utječu na proučavani fenomen. Te ustanovljene povezanosti reflektiraju pozitivnu heterozu, što znači da prisutnost heteroze za *PPAR-γ* Pro12Ala i *IL-6* -174 GC predstavlja određene optimalne uvjete. Molekularna heteroza je česta kod ljudi i može biti izražena u čak do 50% svih genskih asocijacija. To znači da heterozigotnost pokazuje znatno veći utjecaj na kvantitativna ili dihotomna svojstva nego homozigotnost, što je suprotno standardnim očekivanjima (Comings i MacMurray, 2000). Također je moguće da su *PPAR-γ* i *IL-6* u neravnotežnoj povezanosti s drugim, možda nepoznatim, funkcionalnim polimorfizmima koji imaju utjecaj na razvoj ishemijskog moždanog udara (181).

Njihova uloga kao upalnih medijatora u akutnoj pa i u kroničnoj fazi moždanog udara uvelike utječe na veličinu, kao i na krajnji ishod bolesti. S obzirom na ovu spoznaju, bitno je kod

pacijenata prevenirati porast upalnih biomarkera u ranoj fazi moždanog udara radi što boljeg krajnjeg ishoda (182). Ovime ukazujemo na važnost upotrebe antiinflamatornih lijekova u ranoj fazi bolesti. Nadalje smo u našem istraživanju analizirali *ACE* gen i polimorfizme istog, prvenstveno polimorfizma I/D, te njegovu ulogu u pacijenata s moždanim udarom. Dosadašnja istraživanja su pokazala utjecaj *ACE* I/D polimorfizma i razvoja moždanog udara. Proizvodnja angiotenzina II i katabolizam bradikininina najvažniji su efekti angiotenzin-konvertirajućeg enzima, a glavna uloga peptida je utjecaj na tonus stijenke krvne žile i funkciju endotela te na proliferaciju glatkih mišićnih stanica. *ACE* gen je vjerojatno jedan od najčešće istraživanih gena kandidata odgovornih za moždani udar, nakon studije koju su proveli Cambien i sur. i u kojoj su pokazali da je intron 16 I/D polimorfizam gena *ACE* povezan s infarktnom srca (183). *ACE* I/D polimorfizam zasniva se na prisutnosti (insertion, I) odnosno nedostatku (deletion, D) 287-bp DNA fragmenata. D alel polimorfizam povezan je s povišenom razinom serumskog ACE i samim time u studijama je istraživao kao potencijalni rizični čimbenik u razvoju moždanog udara. Niz studija potvrdio je povezanost *ACE* I/D genotipa s rizikom za razvoj moždanoga udara, no rezultati većine njih bili su inkonkluzivni (184-187). Razlog tome najvjerojatnije leži u malom uzroku, kvaliteti kontrole, etničkoj pripadnosti, podtipu moždanoga udara. Zadnjih godina istraživanja uzimaju u obzir više varijabli kako bi rezultati bili što relevantniji. Tako provedena meta-analiza u Kini na 10070 slučajeva moždanoga udara i 22103 kontrola pokazala je D alel *ACE* I/D polimorfizam predstavlja potencijalni rizični čimbenik za razvoj moždanog udara (106). U našem radu nismo uspjeli dobiti statistički značajnu povezanost *ACE* I/D genotipova s niti jednim od kliničkih i biokemijskih parametara, kako u skupini pacijenata, tako ni u kontrolnoj skupini. Provedena je i analiza povezanosti svakog pojedinog gena s kliničkim i biokemijskim parametrima, no ni tu nismo uspjeli naći statistički značajnu povezanost. Naši rezultati najvjerojatnije su posljedica maloga uzorka, no u korelaciji su s mnogim radovima navedenima u literaturi. Tako studija provedena u Španjolskoj koja je analizirala polimorfizam *ACE* I/D u 531 pacijenta s moždanim udarom i 549 zdravih kontrolna nije našla statistički značajnu povezanost D alela *ACE* I/D polimorfizma s pojavnošću moždanoga udara (107). S druge strane provedena meta-analiza Sharme i sur., na 1196 pacijenata s moždanim udarom i 722 kontrola našla je povezanost D alela *ACE* I/D polimorfizma i moždanoga udara (188). S obzirom na poznatu činjenicu da inhibitori ACE imaju pozitivne učinke na supresiju napredovanja ateroskleroze, proizlazi da je upotreba ACE inhibitora u prevenciji moždanoga udara opravdana (189). Nadalje, nedavne studije pokazale su da angiotenzin II (stimuliran ACE-om) stimulira i biosintezu kolesterola tako što povećava ekspresiju enzima bitnog za sintezu kolesterola

hidroksimetilglutaril- (HMG)-CoA reduktaze (190). *ACE I/D* polimorfizam utječe na učinak lijekova važnih za snižavanje ukupnoga kolesterola i triglicerida pa lijekovi poput ACE inhibitora, osim regulacijom tj. snižavanjem krvnog tlaka, mogu reducirati rizik moždanoga udara i djelovanjem na razinu serumskoga kolesterola i triglicerida tj. usporavanjem procesa aterogeneze (191).

U našim rezultatima smo također analizirali *ApoE* gen s tri alela E2, E3, E4 i šest genotipova. Bitna uloga ApoE je u transportu kolesterola. S obzirom na njegovu ulogu te utjecaj pojedinih genotipova na lipidni profil, specifični ApoE aleli i fenotipovi su povezani s rizikom razvoja ateroskleroze, koronarne bolesti i moždanog udara (192-194). E4 varijanta *ApoE* gena povezana je s povišenom razinom ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i smatra se rizičnim čimbenikom za razvoj moždanog udara. Unatoč tome, dosadašnje studije dale su suprotne rezultate o ulozi *ApoE* E4 alela u razvoja moždanog udara. Dvije provedene meta-analize pokazale su da *ApoE* E4 ima minimalan utjecaj na pojavu moždanog udara, ali da utjecaj istog uvelike raste u interakciji s konvencionalnim rizičnim čimbenicima (195,196). Za pretpostaviti je da mogući sinergistički utjecaj pojedinih rizičnih gena pridonosi pojavnosti moždanog udara. Studija provedena na afričkoj populaciji analizirala je sinergistički utjecaj i interakcije genotipova *ACE D/D* i *ApoE* E4 i pokazala je povećan rizik od pojave moždanog udara kod pacijenata s prisutna oba genotipa (193). Nadalje, McCarron MO i sur. nisu utvrdili povezanost *ApoE* E4 polimorfizma s razvojem cerebrovaskularne bolesti (110). Studija Framingham Heart bavila se utjecajem interakcije *ApoE* E4 i konzumacije alkohola na razvoj moždanog udara – interakcija nije pronađena (197). Nadalje, studija provedena na belgijskoj populaciji analizirala je povezanost ApoE polimorfizma s moždanim udarom i rezultati nisu našli povezanost E4 genotipa s moždanim udarom, a najčešće zabilježen genotip bio je E3/E3 (111). Analizom utjecaja *ApoE* gena i polimorfizama na turskoj populaciji s moždanim udarom, najučestaliji polimorfizam bio je E3/E3 i nije imao utjecaj na razvoj ili ishod bolesti (198). Slične rezultate smo dobili i mi u našem radu. U skupini naših pacijenata dobivena je statistički značajna razlika u mRS- kod otpusta između sudionika s 2/3 i 3/3 genotipom, pri čemu su više vrijednosti, odnosno lošiji ishod bolesti, zabilježene kod pacijenata s 3/3 genotipom. Budući da je polimorfizam E3/E3 najčešće zabilježen i prisutan u zdravoj populaciji, rezultate dobivene u našem istraživanju pripisujemo limitirajućem čimbeniku, odnosno malom uzorku. Vidimo da je uloga polimorfizama *ACE I/D* te *ApoE* E4 u moždanom udaru, prema podacima navedenima u literaturi i prema rezultatima našega rada, i dalje inkonzistentna te da su potrebne daljnje analize radi što točnije definicije polimorfizma u razvoju istog. Daljnji rezultati našeg rada analizirali su gen *MTHFR* odnosno polimorfizam C677T i njegovu ulogu u razvoju moždanog udara kod ispitivane populacije.

Hiperhomocisteinemija se smatra neovisnim rizikom za razvoj moždanog udara. Nekoliko studija provedenih u Aziji pokazalo je da genski polimorfizam MTHFR enzima (ključnog za regulaciju razine homocisteina u plazmi) C677T povećava vjerojatnost pojave moždanog udara (199,200). Studija u Kini i Japanu pokazala je da prisutnost 677TT genotipa znatno povećava vjerojatnost moždanoga udara u odnosu na nositelje 677CT i 677CC genotipova (201,119). Povezanost polimorfizma *MTHFR* gena s moždanim udarom među pripadnicima bijele rase generalno nije nađena (202,203). No, nekoliko manjih studija provedenih na indijskoj populaciji te studija među Talijanima pronašle su povezanost 677TT homozigota s moždanim udarom (204,205). Nešto novija studija provedena kod žena s migrenom (US Women's Health Study) pokazala je utjecaj 677TT genotipa, a studija provedena u Poljskoj pokazala je da je prisutnost 677TT genotipa mnogo češća u pacijenata s ishemijskim moždanim udarom nego u kontrolnoj skupini (206,207). U našoj analizi skupine pacijenata nije dobivena statistički značajna povezanost *MTHFR* genotipova s niti jednim kliničkim ili biokemijskim parametrom. Unutar kontrolne skupine pokazala se statistički značajna povezanost s pušenjem ($\chi^2 = 8,808$; $df = 2$, $P = 0.011$; $C = 0.245$), ~~pre~~ čemu su pušači bili češći među sudionicima s TT genotipom. U našem radu nismo uspjeli dokazati interakciju između istraživanih genskih polimorfizama na sinergistički utjecaj u nastanku moždanog udara, što su neke studije u literaturi opisale. Tako su Szolnoki i sur. analizom interakcije gen - gen i gen - okoliš, kod faktora Leiden V, *MTHFR* 677CT, *ApoE* E4, *ACE* I/D te receptora *AT1R* A1166C polimorfizma pokazali važnost sinergističkoga učinka polimorfizama više rizičnih genskih čimbenika na pojavu ishemijskog moždanog udara i leukoaraioze, te ukazali na mogućnosti terapijskog djelovanja u prevenciji istih (208).

Limitirajući čimbenici

Veličina ispitivanog uzorka kao i karakteristike kontrolne skupine, mogu biti limitirajući čimbenik. Nedostatak pojedinih praćenih i ispitivanih varijabli u ispitivanim skupinama također može biti jedan od limitirajućih čimbenika. Iako su potrebna daljnja istraživanja da bismo potvrdili naše rezultate, uspjeli smo pokazati značajan utjecaj određenih genskih varijanti u patogenezi moždanog udara.

7. Zaključci

1. Dobivena je statistički značajna razlika između nekoliko genotipova među skupinama sudionika: genotip Pro12AlaPPAR γ bio je statistički značajno zastupljeniji među kontrolama, dok je Pro12Pro PPAR γ bio učestaliji u skupini pacijenata; genotip GC IL-6 bio je značajno češći u skupini pacijenata, dok je genotip CC češće zabilježen među kontrolama; genotip ApoE E3/E3 češće je zabilježen u skupini pacijenata.
2. U multivarijantnoj logističkoj regresiji pokazali smo da su muški spol, hipertenzija, snižena vrijednost HDL-a i povišena vrijednost CRP-a statistički značajno povezani s pripadnošću skupini pacijenata te da sva četiri navedena parametra povećavaju vjerojatnost pojave MU.
3. U multivarijantnoj logističkoj analizi u kojoj su bili uključeni svi genotipovi, pronašli smo statistički značajnu povezanost genotipa PPAR γ Pro12Pro te -174CC i -174GC (IL-6) s pripadnošću skupini pacijenata; u slučaju PPAR γ oba genotipa povećavaju vjerojatnost pojave MU, u slučaju IL-6 CC genotip za 70% umanjuje pojavu MU, a GC genotip za 2.5 puta povećava vjerojatnost pripadanja skupini pacijenata.
4. U stupnjevitoj multivarijantnoj logističkoj regresiji svih parametara kliničkih, biokemijskih i genotipova pokazali smo da muški spol u odnosu na ženski povećava vjerojatnost MU za 10%, prisutnost hipertenzije povećava za 37.3 puta, genotip Pro12Ala PPAR γ imao je protektivni učinak i umanjivao je vjerojatnost pojave MU za 90%, dok je genotip GC IL-6 povećavao vjerojatnost pojave istog za 9.3 puta.
5. U kontrolnoj skupini dobili smo značajnu povezanost PPAR γ i CRP-a, pri čemu su sudionici sa Pro12Pro imali povišenu razinu CRP-a.
6. U skupini pacijenata našli smo statistički značajnu povezanost između genotipova IL-6 -174 G>C i CRP-a, pri čemu je povišeni CRP zabilježen u skupini pacijenata s genotipom GC, dok su normalne vrijednosti CRP-a zabilježene kod pacijenata s GG genotipom.
7. Unutar kontrolne skupine dobili smo značajnu povezanost genotipa TT MTHFR i pušenja, pri čemu su sudionici s TT genotipom češće bili pušači, dok su sudionici s CC genotipom češće zabilježeni među nepušačima.
8. U skupini pacijenata našli smo razliku u mRS-kod otpusta i E3/E3 ApoE polimorfizma. Sudionici s E3/E3 polimorfizmom imali su značajno viši mRS, odnosno lošiji ishod u odnosu na sudionike s ostalim genotipovima.

9. Nismo našli povezanost ACE genotipova s bilo kojim od klinički i biokemijski praćenih parametara.

8. Sažetak

Etiologija ishemijskog moždanog udara (IMU) je multifaktorijska. Različiti geni, njihovi polimorfizmi, karakteristike pojedinca, upalni procesi te njihove međusobne interakcije igraju važnu, no i dalje do kraja nerazjašnjenju ulogu u razvoju moždanog udara. *PPAR-γ* regulira ekspresiju ključnih gena u upali i imunosti, metabolizmu šećera i masti, te u adipogenezi. Među različite ciljane gene *PPAR-γ* pripadaju i *IL-6*, *ACE*, *APOE*, *MTHFR*. Cilj naše studije bio je ispitati interakcije između varijanti gena transkripcijskog faktora *PPAR-γ* i njegovih ciljnih gena *IL-6*, *ACE*, *APOE* i *MTHFR*, te interakcije pojedinih gena i praćenih konvencionalnih rizničnih čimbenika u razvoju ishemijskog moždanog udara.

Istraživanje je provedeno na 301 ispitaniku (114 s IMU i 187 kontrola). Genotipizacija *PPARγ* Pro12Ala, *IL-6* -174G>C, *ACE* I/D, *APOE* E2, E3, E4 i *MTHFR* C677T provedena je metodama temeljenima na lančanoj reakciji polimerazom.

Statistički značajni prediktori moždanog udara bili su muški spol, hipertenzija, sniženi HDL, povišena razina CRP-a, *IL-6* -174 G>C, *PPARγ* Pro12Ala genotip. Muški spol u odnosu na ženski povećava vjerojatnost MU za 10%, prisutnost hipertenzije povećava za 37.3 puta, genotip Pro12Ala *PPAR-γ* imao je protektivni učinak i umanjivao vjerojatnost pojave MU za 90%, dok je genotip GC *IL-6* povećavao vjerojatnost pojave istog za 9.3 puta. Nije nađena statistički značajna povezanost gena *MTHFR*, *ACE*, *APOE* i njihovih polimorfizama s pojavnošću moždanog udara.

9. Summary

The etiology of ischemic stroke (IS) is multifactorial. Different genes and their polymorphisms, individual characteristics, inflammatory processes, and their interactions play an important, but still insufficiently apparent role in the development of stroke. *PPAR-γ* regulates the expression of key genes involved in inflammation and immunity, metabolism of sugar and fat, and adipogenesis. *IL-6*, *ACE*, *MTHFR* and *APOE* belong to different *PPARγ* target gene. The aim of our study was to estimate the influence of interactions between the *PPAR-γ* gene variants, its target genes *IL-6*, *ACE*, *APOE* and *MTHFR* and conventional risk factors in the development of ischemic stroke.

The study included 301 participants (114 with IS and 187 controls). Genotyping of *PPAR-γ* Pro12Ala, *IL-6* -174G>C, *ACE* I/D, *APOE* E2, E3, E4 and *MTHFR* C677T was performed by using polymerase chain reaction base methods.

Statistically significant predictors of IS were male gender, hypertension, lowered HDL cholesterol, elevated C-reactive proteina, *PPARγ* Pro12Ala, *IL-6* -174 G>C genotype. The male gender to female increases the likelihood of stroke by 10%, the presence of hypertension increased by 37.3 times, Pro12Ala *PPARγ* genotype had a protective effect and reduced the likelihood of stroke by 90% while the GC genotype of *IL-6* increased the likelihood of the same for 9.3 times. There was no statistically significant correlation between *MTHFR* gene, *ACE*, *APOE* and their polymorphisms in the incidence of stroke.

10. Literatura

1. Alberts MJ. Genetics of Cerebrovascular Disease. Armonk NY: Futura Publishing Company, 1999;117-128.
2. MacMahon S, Peto R Cutler J et al. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part I.effects of prolonged differences in blood pressure: Evidence from nine prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. Lancet 1990;335:765-774.
3. Crouse JR, Byington RP, Bond MG, et al. Pravastatin, lipids, and atherosclerosis in the carotid arteries (PLAC-II). AM J Cardiol 1995;75:455-459.
4. Brinar V, et al. Neurologija za medicinare. 2009;9: 167-192
5. Adams HP Jr, Davis PH, Leira EC et al. Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A raport of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). Neurology 1999; 53(1): 126-31
6. Donnan GA, Fisher M, Macleod M et al. Stroke. Lancet 2008; 371(9624): 1612-23
7. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med 2008; 359(13): 1317-29
8. Thrift AG, Cadilhac DA, Thayabaranathan T, et al. Global stroke statistica. International Journal of Stroke. 2014;9: 6-18.
9. Endres M, Heuschmann PU, Laufsand U. Primary prevention of stroke: blood pressure, lipids, and heart failure. Eur Heart J. 2011; 32(5):545-552
10. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of tih Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. JAMA. 2003;289:2560
11. Krause T, Lovibond K, Caulfield M, et al. Management of hypertension: summary of NICE guidance. BMJ. 2011;343:d4891.
12. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. Practice guidelines for the Management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. J

- Hypertens 2013;31:1925.
13. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al. Age specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903.
 14. Pastor-Barriuso R, Banegas JR, Damian J, et al. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure: an evaluation of their joint effect on mortality. *Ann Intern Med*. 2003;139:731.
 15. Gjinj Jv. The PROGRESS Trial: Preventing Strokes by Lowering Blood Pressure in Patients With Cerebral Ischemia Emerging Therapies: Critique of an Important Advance. *Stroke*. 2002; 33: 319-320.
 16. Sleight P. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation). 2000 Mar;1(1):18-20.
 17. Kernan WN, Ovbiagle B, Black HR, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45:2160.
 18. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, et al. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Atheroscler Suppl*. 2004;5(3):81-7.
 19. Pfeffer MA¹, Sacks FM, Moyé LA, et al. Am J Cardiol. Cholesterol and Recurrent Events: a secondary prevention trial for normolipidemic patients. CARE Investigators. 1995;76(9):98C-106C.
 20. White HD, Simes WJ, Stewart RAH, et al. Changes in Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Predict Coronary Events and Partly Account for the Treatment Effect of Pravastatin: Results From the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease Study. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000360. doi: 10.1161/JAHA.113.000360
 21. Janghorbani M, Hu FB, Willett WC, et al. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses Health Study. *Diabetes Care*. 2007;30:1730.
 22. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102

- prospective studies. *Lancet*. 2010;375:2215.
23. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2012;11:261.
24. Peters SA, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including, 775.385 individuals and 12.539 strokes. *Lancet*. 2014;383:1973.
25. Vermeer SE, Sandee W, Algra A, et al. Impaired glucose tolerance increases stroke risk in nondiabetic patients with transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *Stroke*. 2006;37:1413
26. Jorgensen L, Jensen T, Joakimsen O, et al. Glycated hemoglobin level is strongly related to the prevalence of carotid artery plaques with high echogenicity in nondiabetic individuals: The Tromso study. *Circulation*. 2004;110:466.
27. Braunwald E, Bonow RO. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2012.
28. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al.. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001; 285(18): 2370-5.
29. Cögen EE, Tombul T, Yildirim G, Odabas FO, Sayin R The role of atrial fibrillation on mortality and morbidity in patients with ischaemic stroke. *J Pak Med Assoc*. 2013;63(12):1516-9.
30. Jabbari J, Olesen MS, Yuan L, et al. Common and Rare Variants in SCN10A Modulate the Risk of Atrial Fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 pii: CIRCGENETICS. 113.000442.
31. Sinner MF, Tucker NR, Lunetta KL, et al. Integrating genetic, transcriptional, and functional analyses to identify 5 novel genes for atrial fibrillation. *Circulation*. 2014; 7;130(15):1225-35. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009892.
32. Rosenberg MA, Kaplan RC, Siscovick DS, et al. Genetic variants related to height and risk of atrial fibrillation: the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol*. 2014; 15:180(2):215-22. doi: 10.1093/aje/kwu126.
33. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm* 2010; 2010:802078. doi:

- 10.1155/2010/802078.
34. Bays H, Ballantyne C. Adiposopathy: why do adiposity and obesity cause metabolic disease? *Future Lipidol* 2006; 1: 389-420.
35. Fišter K, Ivanković D, Koršić M, et al. Prevalence and Five-Year Cumulative Incidence of Abdominal Obesity in Croatian Women of Childbearing Age: the CroHort Study. *Coll Antropol* 2012; 36: 77-81.
36. Fišter K, Kolčić I, Milanović SM, Kern J. The prevalence of overweight, obesity and central obesity in six regions of Croatia: results from the Croatian Adult Health Survey. *Coll Antropol* 2009; 33: 25-29.
37. Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gen variants as risk factors for insulin resistance, the metabolit syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2006; 188: 231-244.
38. Karmelić I, Lovrić J, Božina T, et al. Adiponectin level and gene variability are obesity and metabolic syndrome markers in young population. *ArchMed Res* 2012; 43: 145-153.
39. Koršić M, Gotovac K, Nikolac M, et al. Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue in overweight women. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4: 2834-44.
40. Kolčić I, Polašek O, Vuletić S. Scale and dynamics of overweight and obesity epidemic in Croatia. *Obes Facts* 2010;3: 333
41. Lee DC, Sui X, Artero EG, et al. Long trem effects of change in cardiorespiratory fitnes and bod Bass indeks on all-cause and cardiovascular disease mortality in amen: the Aerobics Center Longintudinal Study. *Circulation* 2011;124.2483.
42. Ockene IS, Miller NH. Cigarette smokinga, cardiovascular disease, and stroke: a steatment for healthcare professionals from the American Heart Association. American Heart Association Task Force on Risk Reduction. *Circulation*. 1997;96:3243.
43. Wilson PW, Hoeg JM, D'Agostino RB et al. Cumulative effects on high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1997;337:516.
44. Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke, incident, prevalence, mortality and risk factor. *Neurol Clin*. 2008;26:871.

45. Persky RW, Turtzo LC, McCullough LD. Stroke in women: disparities and outcomes. *Curr Cardiol Rep.* 2010;12:6.
46. Howard VJ. Reasons underlying racial differences in stroke incident and mortality. *Stroke.* 2013; 44:S126.
47. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetics component of ischemic stroke subtypes: a family history study. *Stroke.* 2003; 34:1364.
48. Jood K, Ladenvall C, Rosengren A, et al. Family history in ischemic stroke before 70 years of age: the Sahlgrenska Academy Study on Ischemic Stroke. *Stroke.* 2005;36:1383.
49. Meschia JF, Worrall BB, Rich SS. Genetic susceptibility to ischemic stroke. *Nat Rev Neurol.* 2011;7:369.
50. George SJ, Johnson J, ed. *Atherosclerosis.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2010.
51. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Molecular genetics of atherosclerosis. *Hum Genet* 2009; 125: 467-91.
52. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function and hemodynamic stress (KAROLA). *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 2006; 26: 1586-93.
53. Sertić J, Skorić B, Lovrić J, Bozina T, Reiner Z. Does Lp-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease? *Acta Med Croatica* 2010;64:237-45.
54. Sertić J, Juričić L, Ljubić H, et al. Variants of ESR1, APOE, LPL and IL-6 loci in young healthy subjects: association with lipida status and obesity. *BMC Res Notes* 2009; 2: 203.
55. Bazina A, Sertić J, Mišmaš A, et al. PPAR γ and IL -6 - 174G>C gene variants in Croatian patients with ischemic stroke. *Gene.* 2015; 15;560(2):200-4. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.003.
56. Sertić J i sur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika.* Zagreb: Medicinska naklada, 2010.
57. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. *Brain.* 2000;123,1784-1812.
58. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2007;6:149-61.
59. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of

- the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35(1):212-27. Epub 2003 Dec 18.
60. Schulz UG, Flossmann E, Rothwell PM. Heritability of ischemic stroke in relation to age, vascular risk factors, and subtypes of incident stroke in population-based studies.
61. Jood K, Ladvall C, Rosengren A, Blomstrand C, Jern C. Family history in ischemic stroke before 70 years of age: the Sahlgrenska Academy Study on Ischemic Stroke. *Stroke*. 2005;36(7):1383-7.
62. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol*. 2004 ;3(4):227-35.
63. Fox CS, Polak JF, Chazaro I, et al. Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study. *Stroke*. 2003 Feb;34(2):397-401.
64. Moskau S, Golla A, Grothe C, et al. Heritability of carotid artery atherosclerotic lesions: an ultrasound study in 154 families. *Stroke*. 2005; ;36(1):5-8.
65. Atwood LD, Wolf PA, Heard-Costa NL, et al. Genetic variation in white matter hyperintensity volume in the Framingham Study. *Stroke*. 2004;35(7):1609-13.
66. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol*. 2004;61(11):1652-61.
67. Jerrard-Dunne P, Sitzer M, Risley P et al. Inflammatory gene load is associated with enhanced inflammation and early carotid atherosclerosis in smokers *Stroke*. 2004;35: 2438–2443.
68. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet*. 2005; 15-21;365(9455):224-32.
69. Lusk AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation*. 2004;110(13):1868-73.
70. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*. 2004 ;36(3):233-9. Epub 2004 Feb 8.
71. Meschia JF. Clinically translated ischemic stroke genomics. *Stroke*. 2004;35(11 Suppl 1):2735-9. Epub 2004 Sep 9

72. Lettre G, Rioux JD. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet.* 2008;17(R2):R116-21. doi: 10.1093/hmg/ddn246.
73. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke.* 2012 ;43(12):3161-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.665760.
74. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, et al. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet.* 2003;35(2):131-8. Epub 2003 Sep 21. Erratum in: *Nat Genet.* 2005.
75. Rosand J, Bayley N, Rost N, de Bakker PI. Many hypotheses but no replication for the association between PDE4D and stroke. *Nat Genet.* 2006 Oct;38(10):1091-2; author reply 1092-3.
76. Bellenguez C, Bevan S, Gschwendtner A, et al. International Stroke Genetics Consortium (ISGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet.* 2012;44(3):328-33. doi: 10.1038/ng.108
77. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, et al. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet.* 2012;44(6):670-5. doi: 10.1038/ng.2261
78. Traylor M, Farrall M, Holliday EG, et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2012 Nov;11(11):951-62. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70234-X.
79. Braissant O1, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137(1):354-66.
80. Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:535-59.
81. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest.* 2000;106(4):467-72.
82. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.*

- 2000;106(4):523-31.
83. Lopez-Liuchi JV, Meier CA. PPARgamma: from adipose tissue to the atherosclerotic plaque. *Eur J Endocrinol.* 1998;139(4):363-4.
84. Bordet R, Ouk T, Petrault O, et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec;34(Pt 6):1341-6.
85. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S232-40
86. Braissant O1, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996 Jan;137(1):354-66.
87. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 2004;123(1):131-45.
88. Bernardo A, Levi G, Minghetti L. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *Eur J Neurosci.* 2000;12(7):2215-23.
89. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(2):270-4.
90. He W. PPAR gamma2 Polymorphism and Human Health. *PPARR Res* 2009;2009:849538.
91. Al-Shali KZ, House AA, Hanley AJ, et al. Genetic variation in PPARG encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma associated with carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2004;35(9):2036-40.
92. Huang HY, Thuita L, Strickland P, et al. Frequencies of single nucleotide polymorphisms in genes regulating inflammatory responses in a community-based population. *BMC Genet.* 2007
93. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke.* 2001;32(1):133-8.

94. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke*. 2001;32(4):917-24.
95. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(4):406-15.
96. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31(10):2325-9.
97. Pola R, Gaetani E, Flex A et al. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with peripheral artery occlusive disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002 ;24(3):264-8
98. Rundek T, Elkind MS, Pittman J et al. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6 and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke* 2002;33:1420-23.
99. Chapman CM, Beilby JP, Humphries SE, Palmer LJ, Thompson PL, Hung J. Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian Community population. *Eur J* 2003;24:1494-99.
100. Balding J, Livingstone WJ, Pittock SJ, et al. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Ir J Med Sci*. 2004;173(4):200-3.
101. Tong Y, Wang Z, Geng Y, et al. The association of functional polymorphisms of IL-6 promoter with ischemic stroke: Analysis in two Chinese populations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;391:481-485.
102. Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(2):155-9.
103. Doi Y, Yoshinari M, Yoshizumi H, et al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. *Atherosclerosis*. 1997;132(2):145-50.
104. Juo SH. Genetics of carotid atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:4525-34
105. Paternoster L1, Chen W, Sudlow CL. Genetic determinants of white matter hyperintensities on brain scans: a systematic assessment of 19 candidate gene polymorphisms in 46 studies

- in 19,000 subjects. *Stroke*. 2009;40(6):2020-6. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.542050.
106. Zhang Z, Xu G, Liu D, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e46495. doi: 10.1371/journal.pone.0046495. Epub 2012 Oct 1.
107. Domingues-Montanari S, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A et al. The I/D polymorphism of the ACE1 gene is not associated with ischaemic stroke in Spanish individuals. *Eur J Neurol*. 2010;17(11):1390-2. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03022.x.
108. Cattin L, Fiscicaro M, Tonizzo M, et al. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(1):91-4.
109. Elosua R, Ordovas JM, Cupples LA, et al. Association of APO-E genotype with carotid atherosclerosis in men and woman: the Framingham Heart Study. *J Lipid res* 2004;45:1868-1875.
110. McCarron MO, Muir KW, Nicoll JAR et al. Prospective Study of Apolipoprotein E Genotype and Functional Outcome Following Ischemic Stroke. *Arch Neurol*. 2000;57:1480-1484.
111. Abboud S, Viiri LE, Lütjohann D, et al. Associations of apolipoprotein E gene with ischemic stroke and intracranial atherosclerosis. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(8):955-60. doi: 10.1038/ejhg.2008.27. Epub 2008 Feb 27.
112. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E polymorphisms and cigarette smoking on risk of ischemic stroke in young adults. *Stroke* 2004;35:438-442.
113. Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, et al. Evaluation of the modifying effects of unfavourable geotypes on classical clinical risk factors for ischeamic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1615-1620.
114. Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, et al. Homocysteine is a risk factor for cerebral small vessel disease, acting via endothelial dysfunction. *Brain*. 2004;127(Pt 1):212-9.
115. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
116. All Sazci, Emel E, Nese T, Gurler A, Ihsan K. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of MTHFR

- polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Research Bulletin* 2006;(71):45-50.
117. Ryuichi K, Katsuhiko K, Yuichiro O, et al. An Association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and ischemic stroke. *J of Stroke and Cerebrovascular Disease*;2005:67-74.
118. Pallaud C, Sass C, Zannad F, Siest G, Visvikis S. APOC3, CETP, fibrinogen and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort). *Clin Genet* 2001;59:316-24.
119. Li Z, Sun L, Zhang H et al. Elevated plasma homocysteine was associated with hemorrhagic and ischemic stroke but methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism was a risk factor for thrombotic stroke: a Multicenter Case-control Study in China. *Stroke* 2003;34:2085-90.
120. Li C, Zhang C, Qiu S et al. Polymorphisms of ACE-1 and MTHFR genes and genetic susceptibility of ischemic stroke. *Zhonghua Yi Za Zhi* 2002; 82:1046-49.
121. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202.
122. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002 Oct 23-30;288(16):2015-22.
123. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet*. 2005;365(9455):224-32.
124. Al-Allawi NA, Avo AS, Jubrael JM. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in Iraqi patients with ischemic stroke. *Neurol India*. 2009;57(5):631-5. doi: 10.4103/0028-3886.57821.
125. Kraja AT, Borecki IB, North K, et al. Longitudinal and age trend of metabolite syndrome and its risk factors: the Family heart Study. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:41.
126. W uJ, Province MA, Coon H, et al. An investigation of the effects of lipid-lowering medications: genome-wide linkage analysis of lipid in the HyperGEN study. *BMC Genet*. 2007;8:60.
127. Miller SA, Dykes D.D., Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988;16(3):1215.

128. Oh EY, Min KM, Chung JH, et al. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(5):1801-1804.
129. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 levels, and no association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369-1376.
130. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (ACE1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 1992;20(6):1433.
131. Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992;48:361-372
132. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 2010; 10: 564-567
133. Jeffs B, Clark JS, Anderson NH, et al. Sensitivity to cerebral ischaemic insult in a rat model of stroke is determined by a single genetic locus. *Nat. Genet.* 1997;(16): 364–367.
134. Bak S, Gaist D, Sindrup SH, et al. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins. *Stroke.* 2002; 33: 769–774.
135. Liao D, Myers R, Hunt S, et al. Familial history of stroke and stroke risk. The Family Heart Study. *Stroke.* 1997;28: 1908–1912.
136. Song Q, Cole JW, O'Connell JR et al. Phosphodiesterase 4D polymorphisms and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women study. *Hum Mol Genet.* 2006;15: 2468–2478.
137. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation.* 2004; 110:1868–1873.
138. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson AG et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 2004;36:233–239.
139. Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten UD, Lindpaintner K. Chromosomal mapping of

- quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet.* 1996;13: 429–434.
140. Meschia JF. Clinically translated ischemic stroke genomics. *Stroke.* 2004; 35:2735–2739.
141. Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, et al. A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med.* 2006;203:711–717.
142. Al-Shali KZ, House AA, Hanley AJ et al. Genetic variation in PPARG encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma associated with carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2004; 35(9):2036-40.
143. Lee BC, Lee HJ, Chung JH. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism is associated with reduced risk for ischemic stroke with type 2 diabetes. *Neurosci Lett.* 2006;410:141-5.
144. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci.* 2008;13:1813-26.
145. Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, et al. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J.* 2000;16:1027–1040.
146. Liu HR, Tao L, Gao E, et al. Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesteromic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62:135–144.
147. Aoun P, Watson DG, Simpkins JW. Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur J Pharmacol.* 2003;472:65–71.
148. Landreth GE, Heneka MT. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2001; 22:937–944.
149. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 1999;20:.649–688.
150. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J. Biol. Chem.* 1997;272:1879–1889.
151. Gurnell M. PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 2003;59: 267–277.

152. Hsueh WA, Bruemmer D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Hypertension*.2004;43: 297–305.
153. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. PROactive investigators, secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*.2005;366:1279–1289.
154. Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: A role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol*. 2000;10:113–126.
155. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19:819–834.
156. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS disease and injury. *Br J Pharmacol*. 2006; 147:S232–S240.
157. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999; 79: 1431–1468.
158. Zafarmand MH, van der Schouw YT, Grobbee DE, de Leeuw PW, Bots ML. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 P12A polymorphism and risk of acute myocardial infarction, coronary heart disease and ischemic stroke: a case-cohort study and meta-analyses. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(2):427-36.
159. Patzer A, Zhao Y, Stöck I, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARgamma) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*. 2008; 9:1786-94. doi: 10.1111/j. 1460-9568. 2008.06478.x.
160. Yu LG, Zhou ZY, Guo ZR, Wu M, Gu SJ. *Honghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors polymorphisms, haplotypes, levels on C-reactive protein and their interactions with abnormal body weight 2013 ;34(10):1023-9.
161. Gu SJ, Chen DH, Guo ZR, Zhou ZY, Hu XS, et al. Effect of obesity on the association between common variations in the PPAR gene and C-reactive protein level in Chinese Han population. *Endocrine*. 2015;48(1):195-202. doi: 10.1007/s12020-014-0218-x.
162. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and

- outcome of disease. *J. Neurol. Sci.*1994;122:135–139.
163. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the volume of brain lesion in stroke. *Stroke.*1995;25:1393–1398.
164. Vila N, Filella X, Deulofeu R, et al. Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *J. Neurol. Sci.* 1999;162: 185–188.
165. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31:2325–2329.
166. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Proinflammatory gene polymorphisms and ischemic stroke. *Curr Pharm Des.* 2008;14(33):3590-600.
167. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369-76.
168. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2364-7.
169. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996 ;127(2):263-71.
170. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000; 342(12):836-43.
171. Flex A, Gaetani E, Papaleo P, et al. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke.* 2004;35(10):2270-5.
172. Greisenegger S, Endler G, Haering D, et al. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events. *Thromb Res.* 2003; 110(4):181-6.
173. Revilla M, Obach V, Cervera A, et al. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett.* 2002; 324(1):29-32.
174. Chakraborty B, Chowdhury D, Vishnoi G, et al. Interleukin-6 gene -174 G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India. *J Stroke CerebrovascDis.* 2013; 22(5):683-9.

175. Balding J, Livingstone WJ, Pittock SJ, et al. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Ir J Med Sci.* 2004;173(4):200-3.
176. Yang X, Feng L, Li C, Li Y. Association of IL-6-174G > C and -572C > G polymorphisms with risk of young ischemic stroke patients. *Gene.* 2014;539(2):258-62. doi: 10.1016/j. gene. 2014.01.054.
177. Blann AD, Ridker PM, Lip GY Inflammation, cell adhesion molecules, and stroke: tools in pathophysiology and epidemiology? *Stroke.* 2002; 33(9):2141-3.
178. Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17 Suppl 1:7-18. Review.
179. Fornage M, Aron Chiang Y, O'Meara ES, Psaty BM, Reiner AP. Biomarkers of inflammation and MRI-defined small vessel disease of the brain: the Cardiovascular Health Study. *Stroke.* 2008; 39(7): 1952–1959. doi:10.1161/STROKEAHA.107.508135.
180. Waje-Andreassen U, Kråkenes J, Ulvestad E, et al. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2005; 111(6):360-5.
181. Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol. Genet. Metab.* 2000;71:19-31.
182. Switzer JA, Sikora A, Ergul A, et al. Minocycline prevents IL-6 increase after acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res.* 2012; 3(3): 363 - 8. doi: 10. 1007/s12975-012-0150-4. Epub 2012 Mar 15.
183. Cambien F., Poirier O., Lecerf L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 1992;359:641-4.
184. Sharma P, Carter ND, Barley J, Brown MM. Molecular approach to assessing the genetic risk of cerebral infarction: deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin 1-converting enzyme. *J Hum Hypertens.* 2004;8: 645–648.
185. Notsu Y, Nabika T, Park HY, Masuda J, Kobayashi S .Evaluation of Genetic Risk Factors for Silent Brain Infarction. *Stroke;* 1999: 30: 1881–1886.
186. Zee RY, 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: 340–343.
187. Kalita J, Somarajan BI, Kumar B, Mittal B, Misra UK . A study of ACE and ADD1 polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke. Clin Chim Acta. 2011;412: 642–646.
188. Sharma P. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1998; 64(2):227-30.
189. Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, Mahjoub T. Association between renin-angiotensin-aldosterone system genotypes and haplotypes and risk of ischemic stroke of atherosclerotic etiology. Acta Neurol Scand. 2009; 119(6):356-63. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01105.x.
190. Keidar S, Attias J, Heinrich R, et al. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. Atherosclerosis. 1999; 146:249-257.
191. Ruland S, Gorelick PB. Are cholesterol-lowering medications and anti-hypertensive agents preventing stroke in ways other than by controlling the risk factor?. Cur Atheroscler Rep. 2003; 5:38-43.
192. Um JY, Kim HM, Park HS, et al. Candidate genes of cerebral infarction and traditional classification in Koreans with cerebral infarction. Int J Neurosci. 2005; 115:743-756.
193. Betalla A, Alvarez R, Reguero JR, et al. Synergistic effect between apolipoprotein E and angiotensinogen gene polymorphisms in the risk for early myocardial infarction. Clin Chem. 2000; 46:1910-1915.

194. Luc G, Bard J, Arveiler D. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ECTIM study. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14:1412-1419.
195. Ariyaratnam R, Casas JP, Whittaker J, et al. Genetics of ischaemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32.500 individuals. *PLoS Med*. 2007; 4:e131.
196. Banerjee I, Gupta V, Ganesh S. Association of gene polymorphism with genetic susceptibility to stroke in Asian populations: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2007; 52:205-219.
197. Djousse L, Himali JJ, Beiser A, et al. Apolipoprotein E, alcohol consumption, and risk of ischemic stroke: The Framingham Heart Study revisited. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2009; 18(5): 384-388. doi: 10.1016/j.strokecerebrovasdis. 2009.01.008.
198. Tamam Y, Tasdemir N, Toprak R, Tamam B, Iltumur K. Apolipoprotein E genotype in patients with cerebrovascular diseases and its effect on the disease outcome. *Int J Neurosci*. 2009; 119(7): 919-35. doi: 10.1080/00207450802686350.
199. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995; 10(1):111-3.
200. Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998; 8; 98(23): 2520-6.
201. Eikelboom JW, Hankey GJ, Anand SS, et al. Association between high homocyst(e)ine and ischemic stroke due to large- and small-artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke. *Stroke*. 2000; 31(5): 1069-75.
202. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(9): 1465-9.
203. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, et al. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 1997; 28(9): 1739-43.

204. Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, et al. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke. *Stroke*. 2002;33(3):664-9.
205. Alluri RV, Mohan V, Komandur S, et al. MTHFR C677T gene mutation as a risk factor for arterial stroke: a hospital based study. *Eur J Neurol*. 2005;12(1):40-4.
206. Soriente L, Coppola A, Madonna P, et al. Homozygous C677T mutation of the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia in Italian patients with a history of early-onset ischemic stroke. *Stroke*. 1998; 29(4): 869-71.
207. Schürks M, Zee RY, Buring JE, Kurth T. Interrelationships among the MTHFR 677C>T polymorphism, migraine, and cardiovascular disease. *Neurology*. 2008; 71(7): 505-13. doi: 10.1212/01.wnl.0000316198.34558.e5.
207. Goracy I, Cyryłowski L, Kaczmarczyk M, et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of ischemic stroke in Polish subjects. *J Appl Genet*. 2009;50(1):63-7. doi: 10.1007/BF03195654.
208. Szolnoki Z, Melegh B. Gene-gene and gene-environment interplay represent specific susceptibility for different types of ischaemic stroke and leukoaraiosis. *Curr Med Chem*. 2006;13(14):1627-34.

11. Životopis

Rođena sam 1979. godine u Mostaru. U Grudama sam završila Opću gimnaziju. Nakon mature upisala sam studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu i diplomirala 26. studenoga 2004. godine., izradivši diplomski rad pod naslovom „Uzroci perinatalne smrti u prijevremeno rođene djece“, koji je naknadno objavljen u časopisu „Gynecologia et Perinatologia“.

Po završetku studija, odrađenom pripravničkom stražu u trajanju od godine dana u KBC Split, te državnim ispitu položenom 23. ožujka 2006. godine, počinjem s radom u Dječjoj bolnici Srebrenjak, Referentni centar Ministarstva zdravlja za kliničku alergologiju djece Zagreb, tijekom kojeg sam sudjelovala u regionalnim kao i međunarodnim skupovima na temu alergologije u dječjoj dobi. Specijalizacija iz neurologije pri Kliničkom bolničkom centru Zagreb odobrena mi je 11. rujna 2007. godine, a od 19. studenoga iste godine zaposlena sam kao specijalizantica neurologije u Klinici za neurologiju, KBC Zagreb. U sklopu specijalizacije, u razdoblju od 2010. do 2011., upisala sam i završila stručni poslijediplomski studij na Kliničkoj neurologiji Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2009. godine upisujem postdiplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo. Specijalistički ispit uspješno sam položila 30. siječnja 2012. godine i od tada sam zaposlena kao specijalist neurologije u KBC-u Zagreb, pri Zavodu za intenzivnu medicinu Klinike za neurologiju. U travnju 2013. godine bila sam na stručnom usavršavanju u Univerzitetom kliničkom centru u Ljubljani, na Kliničkom odjelu za vaskularnu neurologiju i intenzivno liječenje, u sklopu stipendije EFNS „Department to Department programme“. Užu specijalizaciju iz intenzivne medicine u trajanju od dvije godine odobrilo mi je Ministarstvo zdravlja 18. listopada 2012. godine. Specijalizaciju sam završila 31. prosinca 2014 godine i stekla naziv specijalista uže specijalnosti neurologije – intenzivna medicina, s radom u Referentnom centru za intenzivnu neurologiju Ministarstva zdravlja RH. Objavila sam dvanaest znanstvenih radova, od kojih sam prvi autor u četiri rada. Šest radova objavljeno je u časopisima koje citira Current Contents, četiri u časopisima koje citira Science Citation Index, dva koje citira Excerpta Medica. Sudjelovala sam na mnogobrojnim međunarodnim i regionalnim znanstvenim neurološkim skupovima. Koautorica sam udžbenika „Klinička kemija i molekularna dijagnostika“ te priručnika „Smjernice zbrinjavanja bolesnika s rupturom intrakranijske aneurizme i posljedičnim subarahnoidalnim krvarenjem“.

12. Bibliografija

12.1. Znanstveni radovi u časopisima

1. Bazina A, Sertić J, Mišmaš A, Lovrić T, Poljaković Z, Miličić D. PPAR γ and IL-6 - 174G>C gene variants in Croatian patients with ischemic stroke. *Gene*. 2015; 560(2):200-4. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.003.
2. Bazina A, Mišmaš A, Hucika Z, Pavliša G, Poljaković Z. Endovascular treatment of internal carotid artery pseudo-aneurysm presenting with epistaxis. A case report. *Interv Neuroradiol*. 2014;20(6):743-5. doi: 10.15274/INR-2014-10077.
3. Supe S, Božina N, Matijević V, Bazina A, Mišmaš A, Ljevak J, Alvir D, Habek M, Poljaković Z. Prevalence of genetic polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 - implications for warfarin management and outcome in Croatian patients with acute stroke. *J Neurol Sci*. 2014;343(1-2):30-5. doi: 10.1016/j.jns.2014.04.039.
4. Ljevak J, Mišmaš A, Bazina A, Matijević V, Alvir D, Supe S, Meaški SJ, Ozretić D, Poljaković Z, Habek M. An infrequent type of stroke with an unusual cause and successful therapy: basilar artery occlusion caused by a cardiac papillary fibroelastoma recanalized 12 hours after onset. *Intern Med*. 2013(2):277-9.
5. Matijević V, Poljaković Z, Malojčić B, Mišmaš A, Bazina A, Boban M, Bilić I, Radanović B, Glavor KD, Kiđemet-Piskač S, Habek M. Systemic thrombolytic therapy in acute ischemic stroke--new experiences in spreading network of stroke units in Croatia. *J Neurol Sci*. 2012;314(1-2):126-9. doi: 10.1016/j.jns.2011.10.008.
6. Bazina M, Glavina-Durdov M, Šćukanec-Spoljar M, Bazina A, Vukojević K, Ljutić D, Saraga M. Epidemiology of renal disease in children in the region of southern Croatia: a 10-year review of regional renal biopsy databases. *Med Sci Monit*. 2007; 13(4):CR172-6.
7. Bazina A, Mišmaš A, Poljaković Z, Pavliša G, Habek M. Posterior reversible encephalopathy syndrome in a patient with paraneoplastic extralimbic encephalitis and small cell lung cancer. *Neurologia Croatica*. 2014;63(1-2):35-40

8. Poljaković Z, Ljevak J, Šupe S, Matijević V, Bazina A, Mišmaš A, Peterković V, Malojčić B, Antončić I. Thrombolytic treatment of intraventricular hemorrhage. *Neurologia Croatica*. 2013; 62(1-2): 69-72.
9. Poljaković Z, Šupe S, Matijević V, Radoš M, Paladino J, Alvir D, Mišmaš A, Bazina A. Basic algoritam for Management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurologia Croatica*. 2012;61:43-52
10. Nanković S, Hajnšek S, Petelin Ž, Bazina A, Radić B, Šulentić V, Grahovac DS. Ritscher-Schinzel Syndrome- Cranio-Cerebello-Cardiac (3C) Syndrome: base raport. *Neurologia Croatica*. 2010;59:67-72
11. Bazina A, Kuzmić-Prusac I, Bazina M. Causes of perinatal deaths in prematurely born infants. *Gynaecologia et Perinatologia*. 2007;16(3):144-149.
12. Bazina M, Raos M, Bazina A, Milković Đ, Nogalo B, Turkalj M. Bilateral postpneumococcal pneumatoceles in a one year 7 month old boy: case report and review of literaturne. *Pediatrics Croatica*. 2009;53:33-37.

12.2. Sažeci sa znanstvenih skupova

1. Bazina A, Mišmaš A, Božina N, Skorić M, Poljaković Z, Sertić J. Genetic risk factors in patients with acute ischemic stroke: the role of PPARG and IL-6. *Eur J Neurol*, May 2014; 21: Issue Suppl. S1: 1–789
2. Bazina A, Mišmaš A, Ljevak J, Skorić M, Šupe S, Matijević V, Alvi D, Djaković V, Malojčić B, Poljaković Z. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in octogenarians in Croatia. *Eur J Neurol*, May 2014; 21: Issue Suppl. S1: 1–789
3. Bazina A, Poljaković Z, Mišmaš A, Šupe S, Ljevak J, Matijević V, Alvir D, Antončić I. Thrombolytic treatment of intraventricular hemorrhage. *Neurol. Croat. Rujan 2014. Oral Presentation)*
4. Bazina A, Sertić J, Šimičević L, Božina T, Lovrić T, Poljaković Z. Uloga polimorfizma interleukina-6 kod cerebrovaskularnoga infarkta. *Liječnički vjesnik 135 (Supplement 2)*. Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2013.
5. Bazina A, Hucika Z, Mišmaš A, Ljevak J, Pavliša G, Poljaković Z. Epistaxis as a symptom of cerebral aneurysm rupture, *Neurol.Croat.*2012 61(Suppl.5):1-62 (Poster)

6. Šupe S, Ljevak J, Mišmaš A, Bazina A, Poljaković Z. Recidivne TIA-e i trombolitičko liječenje – prikaz bolesnice, *Neurol.Croat.*2012 61(Suppl.5):1-62 (Poster)
7. Bazina A, Mismas A, Alvir D, Matijević V, Poljaković Z. Cerebral venous sinus thrombosis in early pregnancy, *Eur J Neurol*, Suppl 2, September 2011 (Poster)
8. Bazina A, Božina T, Lovrić J, Poljaković Z, Božina N, Sertić J. Genetic interactions in the renin-angiotensin sistem confer increased risk of stroke. Abstracts of the 78th European Atherosclerosis Society Congress. U:*Atherosclerosis* 2010;Suppl 11(2):S1-S246.
9. Mišmaš A, Bazina A, Ljevak J, Stoić-Brezak J, Passini S, Poljaković Z. Brain death and organ donation in Neurological Intensive Care Unit (NICU)- three year experience;2012 European Organ Donation Congress, 24th ETCO-EDC, 05.-07. October 2012, Dubrovnik, Croatia (Poster)
10. Mišmaš A, Šupe S, Alvir D, Ljevak J, Bazina A, Poljaković Z. N-methyl D-aspartate receptor antibody positive encephalitis. Tradicionalno srečanje Slovenskih in Hrvaških intenzivistov, 18.-19. January, 2013, Golte, Slovenia (Invited Lecture)
11. Ljilja A, Radić B, Mišmaš A, Bazina A, Adamec I, Junaković A, Habek M. Asistoly provoked by canulation, 6th Croatian Neurological Congress, 7.-10. November 2013, Split, Croatia; *Neurol. Croat.* 2013 62 (Suppl. 3): 89 (Poster)
12. Poljaković Z, Ljevak J, Šupe S, Matijević V, Alvir D, Bazina A, Mišmaš A, Malojčić B. Decompressive craniectomy. 6th Croatian Neurological Congress, 7.-10. November 2013, Split, Croatia; *Neurol. Croat.* 2013 62 (Suppl. 3): 22
13. Šupe S, Poljaković Z, Božina N, Matijević V, Bazina A, Mišmaš A, Alvir D, Ljevak J. Common causes for anticoagulation in patients with acute stroke – impact of CYP2C9 and VKORC1 pharmacogenetics on warfarin therapy individualisation. The 2nd International Conference on Heart and Brain, 27.02.-01.03.2014, Paris, France (Poster)
14. Djaković V, Ribarić B, Mišmaš A, Bazina A. Esthesioneuroblastoma and neurological symptoms – progression or complication of EBN, new disease? Third Balkan Congress for maxillofacial surgery, 24.-27. April 2014, Ohrid, Macedonia (Poster)
15. Poljaković Z, Borovečki F, Matijević V, Šupe S, Ljevak J, Alvir D, Bazina, Mišmaš A. The role of genetics in development and rupture of intracranial aneurysms – preliminary results on gene polymorphism in Croatian population. 3th Croatian Congress on Intensive Neurology, 30th September – 5th October 2014, *Neurol. Croat.* 2014 63 (Suppl. 1): 19

16. Poljaković Z, Šupe S, Matijević V, Ljevak J, Alvir D, Bazina A, Mišmaš A. Why don't we use new anticoagulant drugs? 3th Croatian Congress on Intensive Neurology, 30th September – 5th October 2014, *Neurol. Croat.* 2014 63 (Suppl. 1): 19
17. Poljaković Z, Šupe S, Matijević V, Alvir D, Ljevak J, Bazina A, Mišmaš A. New oral anticoagulant drug level values – do we need them? 3th Croatian Congress on Intensive Neurology, 30th September – 5th October 2014, *Neurol. Croat.* 2014 63 (Suppl. 1): 35
18. Starčević K, Bažadona D, Poljaković Z, Vodanović D, Matijević V, Šupe S, Alvir D, Ljevak J, Bazina A, Mišmaš A. Dysphagia in acute stroke patients. 3th Croatian Congress on Intensive Neurology, 30th September – 5th October 2014, *Neurol. Croat.* 2014 63 (Suppl. 1): 37
19. Bazina A, Poljaković Z, Ljevak J, Šupe S, Matijević V, Alvir D, Mišmaš A, Malojčić B, Antončić I. Thrombolytic treatment of intraventricular haemorrhage. 7th Congress of the Croatian Neurosurgical Society, , *Neurol. Croat./2014/63 (Suppl. 4):73*
19. Mišmaš A, Bazina A, Krbot Skoric M, Ljilja A, Adamec I, Junaković A, Crnošija L, Habek M. Orthostatic hypotension and antihypertensive drug. 1st Congress of the European Academy of Neurology (EAN), Berlin, June 20-23, 2015.
20. Mišmaš A, Sitaš B, Bazina A, Ozretić D, Poljaković Z, Habek M. Postural orthostatic tachycardia syndrome and spontaneous internal carotid artery dissection. 1st Congress of the European Academy of Neurology (EAN), Berlin, June 20-23, 2015.
21. Mišmaš A, Bazina A, Poljaković Z, Habek M. Paraneoplastic extralimbic encephalitis: reversible abnormalities on brain MRI despite unfavorable outcome, *Eur J Neurol*, Suppl 2, September 2011 (Poster)
22. Bazina A, Mišmaš A, Matijević V, Poljaković Z, Šupe S, Alvir D, Unušić L, Malojčić B, Juren-Meaški S. Carotid and vertebral artery dissection – our experience// *Neurol. Croat. /2010/ 59 (Suppl. 3) 1-60 (Short Communication)*
23. Mišmaš A, Bazina A, Poljaković Z, Šupe S, Malojčić B, Unušić L, Matijević V, Alvir D. Can we stop complications of endovascular treatment with thrombolysis// *Neurologia Croatica. /2009/ 58 (Suppl.3): 1-104 (Short Oral Presentation)*
24. Bazina A, Turkalj M, Plavec D, Čaleta D, Vlašić Ž, Erceg D, Nogalo B. Diffusing capacity in patients with GERD, *Allergy J.*2007; 62 (Suppl. 83): 167-551 (Poster)

25. Bazina A, Hucika Z, Mišmaš A, Krbot Skoric M, Ozretić D, Poljaković Z. Endovascular treatment for dural arteriovenous fistula – clinical experience 1st Congress of the European Academy of Neurology (EAN), Berlin, June 20-23, 2015.
26. Mišmaš A, Legac Škifić M, Bazina A, Adamec I, Habek M. Head-up tilt test in diagnosis and follow-up of patients with trimetazidine induced orthostatic hypotension and extrapyramidal symptoms 1st Congress of the European Academy of Neurology (EAN), Berlin, June 20-23, 2015.

12.3. Tekstovi u udžbenicima i priručnicima

- Sertić J, Božina T, Bazina A. Biokemijski i genski biljezi ateroskleroze. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Sertić J (ur). Zagreb: Medicinska naklada, 2015. Str. 77-87.
- Poljaković Z, i surad. Smjernice zbrinjavanja bolesnika s rupturom intrakranijske aneurizme i posljedičnim subarahnoidalnim krvarenjem. Poljaković Z (ur). Zagreb, Referentni centar za intenzivnu neurologiju Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske i Klinike za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, 2013.