

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ervin Jančić

**Polimorfizam promotorske regije gena inhibitora
aktivatora plazminogena-1 u bolesnika s
moždanim udarom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ervin Jančić

**Polimorfizam promotorske regije gena inhibitora
aktivatora plazminogena-1 u bolesnika s
moždanim udarom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu pod voditeljstvom akademkinje Vide Demarin u sklopu projekta MZOŠ "Uloga genetskih markera u razvoju cerebralne aterosklerotske bolesti", br. 134-1340036-0033.

Zahvaljujem poštovanoj akademkinji Vidi Demarin bez čije ideje, bezuvjetne podrške i neiscrpne pozitivne energije, izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Suradnicima Klinike za neurologiju Kliničke bolnice Sestara milosrdnica zahvaljujem na suradnji i razumijevanju.

Svojoj obitelji.

Sadržaj

1. UVOD.....	8
1.1 Moždani udar	8
1.2 Polimorfizam PAI-1	2
1.3 Uloga genetike u nastanku moždanog udara	4
1.3.1 Bolesti jednog gena i moždani udar	4
1.3.2 Poligene bolesti i moždani udar	9
1.3.3 PAI-1 i moždani udar.....	10
2. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA	13
3. HIPOTEZA	13
4. ISPITANICI I METODE.....	14
4.1 Uzorkovanje	15
4.2 PCR	15
4.3 SSCP	16
4.4 Statistička analiza podataka.....	18
5. REZULTATI.....	19
6. RASPRAVA.....	37
7. ZAKLJUČCI.....	40
8. SAŽETAK.....	41
9. SUMMARY	42
10. LITERATURA	43
11. ŽIVOTOPIS	63
12. PRILOZI.....	65

POPIS KRATICA I AKRONIMA

- ACE – (engl. *angiotensin-converting enzyme*) – angiotenzin–konvertirajući enzim
- APOA – apolipoprotein A
- APOC – apolipoprotein C
- APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
- BMI – (engl. *body mass index*) – indeks tjelesne mase
- CADASIL – (engl. *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy*) – cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom
- CARASIL – (engl. *cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy*) – cerebralna autosomno recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom
- CRP – C–reaktivni protein
- CVD – (engl. *cardiovascular diseases*) – kardiovaskularne bolesti
- DM - (engl. *diabetes mellitus*) - šećerna bolest
- GWAS - (engl. *genome-wide association study*) cjelogenomske studije povezanosti
- HDL – (engl. *high-density lipoprotein*) – lipoprotein visoke gustoće
- IL–6 – interleukin 6
- LACS – (engl. *lacunar syndrome*) – lakunarni sindrom
- LDL – (engl. *low-density lipoprotein*) – lipoprotein niske gustoće
- MELAS – (engl. *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke–like episodes*) – mitohondrijska encefalopatija, laktat acidoza i epizode slične moždanom udaru
- MMD – (engl. *moyamoya disease*) – moyamoya bolest
- MTHFR – (engl. *methylenetetrahydrofolate reductase*) – metilentetrahidrofolat reduktaza
- MRI – (engl. *magnetic resonance imaging*) - magnetska rezonanca
- OCSP – (engl. *Oxford community stroke project classification*) – Oxford klasifikacija

PACS – (engl. *partial anterior circulation syndrome*) – djelomični sindrom prednje cirkulacije

PAI-1 – (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*) – inhibitor aktivatora plasminogena-1

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 – (engl. *posterior circulation syndrome*) – sindrom stražnje cirkulacije

PUFA – (engl. *polyunsaturated fatty acids*) – polinezasićene masne kiseline

PV – protrombinsko vrijeme

RAS - renin-angiotenzinski sustav

SAH – (engl. *subarachnoid hemorrhage*) – subarahnoidalno krvarenje

SNP – (engl. *single nucleotide polymorphisms*) – polimorfizam jednog nuklotida

SSCP – (engl. *single stranded polymorphism analysis*) – analiza konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA

TACS – (engl. *total anterior circulation stroke*) – kompletni moždani udar prednje cirkulacije

T2DM – (engl. *type 2 diabetes mellitus*) - šećerna bolest tipa 2

TIA – tranzitorna ishemička ataka

t-PA – (engl. *tissue-type plasminogen activator*) – tkivni aktivator plazminogena

u-PA – (engl. *urokinase Vtype plasminogen activator*) – urokinazni aktivator plazminogena

1. UVOD

1.1 Moždani udar

Moždani udar (MU) vodeći je uzrok invaliditeta u modernom društvu (1 - 3). U razvijenim zemljama MU je na drugom mjestu među uzrocima smrtnosti (4, 5), a u Hrvatskoj vodeći uzrok smrti (6, 7). Zahvaljujući promjeni načina života i smanjenju čimbenika rizika te boljem zbrinjavanju bolesnika s moždanim udarom, incidencija se moždanog udara u razvijenim zemljama smanjila, a mortalitet je reduciran (8). Ipak, liječenje samog moždanog udara daleko je od zadovoljavajućeg. U zadnjem je desetljeću MU konačno priznat kao hitno stanje u medicini (9 - 11).

Nadalje, liječenje moždanog udara, primarna i sekundarna prevencija te rehabilitacija na specijaliziranim odjelima, pokazali su se kao učinkovite metode (12 - 14). Prošlih godina objavljeno je nekoliko preporuka za liječenje moždanog udara (15).

Cilj je primarne prevencije smanjiti rizik nastanka moždanog udara u asimptomatskih osoba. Način života i određene bolesti prepoznate su kao čimbenici rizika za nastanak moždanog udara (3, 16 - 18).

Najčešći čimbenici rizika uključuju: neadekvatnu prehranu, konzumiranje alkohola, pušenje, smanjenu tjelesnu aktivnost, hipertenziju, šećernu bolest, povišene vrijednosti kolesterola u serumu, infarkt miokarda, fibrilaciju atrijsku i karotidnu stenozu, porast C reaktivnog proteina, aterosklerozu (19), prethodni lakunarni moždani udar, stres, uzimanje visokih količina oralnih kontraceptiva, povišene vrijednosti D-dimera, antifosfolipidni sindrom, upalne bolesti poput pneumonije, pretjerani unos soli (20 - 24). Polimorfizam 4G/5G je čimbenik

rizika za lakunarni MU, dok se pojavnost 4G/4G spominje kao protektivni faktor u starijih osoba (25, 26).

Stoga bi genotipizacija polimorfizma 4G/5G mogla biti korisna u prepoznavanju osoba s rizikom za razvoj krvožilnih bolesti te doziranju bolesnika trombolitičkim tvarima, osobito tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) (27 - 30).

1.2 Polimorfizam 4G/5G gena za PAI-1

Polimorfizam gena prisutnost je dvaju ili više različitih alela jednog gena u populaciji. Različiti aleli moraju biti prisutni u više od 1% ljudi u populaciji, inače se smatraju mutacijom.

Inhibitor aktivatora plasminogena-1 (PAI-1) tvori ireverzibilno kompleks u omjeru 1:1 s tkivnim tipom plazminogen aktivatora te čini jaku inhibiciju fibrinolizi. Vrlo je važan međuodnos proteina koagulacije i fibrinolize u razvoju protrombinskog stanja i tromboembolijskih bolesti. Smanjena fibrinoliza kod smanjene sposobnosti liziranja ugruška umjesto povećane koncentracije PAI-1 povezana je s infarktom miokarda u mlađih osoba, koronarnim bolestima, formacijom ateroma (31), dubokim venskim trombozama (32), cerebrovaskularnim bolestima (33 - 35) i metaboličkim sindromom (36 - 38).

PAI-1 jednolančani je glikoprotein približne molekularne mase 52 kDa iz porodice serinskih proteaza koji regulira fibrinolitički sustav. Serpini sadrže reaktivni centar koji nalikuje proteaznom supstratu, pa nastaje inaktivni stehiometrijski kompleks proteaza-serpin. PAI-1 je široko rasprostranjen u tkivima te se stvara u endotelu, jetri, adipoznom tkivu, slezeni, stanicama

glatkog mišićnog tkiva, megakariocitima i makrofagima. PAI-2 se sintetizira u posteljici tako da se u plazmi javlja samo za vrijeme trudnoće. Zadaća mu je inaktivacija tkivnog i urokinaznog aktivatora plazminogena (t-PA, u-Pa). PAI-1 je uz α 2-antiplazmin, koji inaktivira plazmin, glavni inhibitor fibrinolize u krvotoku (39).

U čovjeka je gen za PAI-1 smješten na sedmom kromosomu i sadrži devet eksona i osam introna. U promotorskoj regiji gena za PAI-1 utvrđena je varijacija koju čini četiri ili pet gvanozina u sekvenci (polimorfizam 4G/5G), a nalazi se 675 parova baza prije transkripcije (39).

Osobe homozigoti za alel 4G (genotip 4G/4G) imaju povišenu koncentraciju plazmatskog PAI-1 za 25% u odnosu na homozigote za alel 5G (genotip 5G/5G), odnosno, alel 5G transkripcijski je manje aktivan u odnosu na alel 4G. U *in vitro* studijama prikazano je da aleli 4G i 5G različito vežu transkripcijske regulacijske proteine, što za posljedicu ima i različitu ekspresiju proteina PAI-1. Kod alela 4G dolazi do povećane transkripcije gena jer dolazi do vezanja samog transkripcijskog aktivatora, dok alel 5G veže i represor transkripcije koji ga koči (40).

Studije potvrđuju povezanost polimorfizama 4G/5G i razine plazmatskog PAI-1 u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima, dijabetes melitusom tip 2 (41) i dubokim venskim trombozama češće u muškaraca, dok je teži oblik MU s većom stopom smrtnosti prevladavao u žena, gdje su ispitanici s alelom 4G imali povišenu razinu PAI-1 (42 - 47).

1.3 Uloga genetike u nastanku moždanog udara

Prospektivna studija Sacco i suradnika na 1805 pacijenata s MU navodi kako su klasični čimbenici rizika odgovorni za samo 50% akutnog MU, a ostalih 50% su genskog uzroka. Uz heterogenu etiopatogenezu točna uloga genetike kao uzroka MU ostaje nedorečena jer su i studije obiteljskih bolesti, studije blizanaca i studije gena kandidata dale različite rezultate. Genetska predispozicija za MU nalazi se u bolestima jednog gena i u poligenim bolestima (48).

1.3.1 Bolesti jednog gena i moždani udar

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL) (49), cerebralna autosomno dominantna arteriopatiya sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom. Gen NOTCH3 na kromosomu 19p13.1–13.2 kodira receptor NOTCH3, a transmembranski proteini od 2321 aminokiselina stvaraju dio NOTCH3 unutarstaničnog komunikacijskog sustava. Smatra se da je navedeni sustav involviran u nadzor masnih stanica tijekom razvoja i ima važnu ulogu u razvoju arterija s receptorom NOTCH3 i ekspresijom na stanicama glatkih mišića u stijenci krvnih žila. CADASIL je prouzročen mutacijom gena NOTCH3. Autori navode mutaciju humanog gena NOTCH3 u oko 70% pacijenta s ponavljajućim ishemičkim atakama MU ili tranzitorna ishemička ataka (TIA) u dobi između 30 i 60 godina (prosječne starosti 46 godina), a u 505 slučajeva postoji i kognitivni deficit. Ostali pridruženi simptomi uključuju psihičke poremećaje, pseudobulbarnu simptomatologiju i migrenu s ili bez aure, a opisuje se i zahvaćanje ostalih tkiva

uključujući kožu, mišiće krvnih žila, perifernog živčevlja, srca te jetre. Magnetska rezonanca (MRI) pokazuje brojne žarišne lakunarne infarkte i difuzne subkortiklane T2 hiperintenzivitet. Iste promjene opisuju se u pacijenata s kardiovaskularnim rizikom i mogu biti indikativne za bolesti malih žila (50 - 52).

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CARASIL) (53), cerebralna autosomno recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom prvi je put opisana u Japanu 1995. godine. Opisano je 17 zdravih odraslih pacijenata s iznenadnim početkom aterosklerotske leukoencefalopije, alopecije i lumbagom (slično CADASIL-u) kao autosomnim recesivnim naslijeđivanjem. Prvi simptomi javljaju se između 25 i 30 godine starosti kao akutni lumbago, deformirajuća spondiloza, difuzna ćelavost i progresivna motorna i mentalna deterioracija. Važne razlike po kojima se razlikuje CADASIL od CARASIL-a su obiteljsko naslijeđe, encefalopatija Binswangerovog tipa i odsutnost vaskularnih čimbenika rizika (53 - 55).

Moyamoya disease (MMD), predominantno se nalazi u istočnoazijskoj populaciji s najviše opisanih slučajeva u Japanu, Koreji i Kini. Predominatno se pojavljuje kod žena. Studija povezanosti (engl. *linkage analysis*) identificirala je povezanost s kromosomima 3p24.2–p26, 6q25, 8q23, 12p12 i 17q25. Način naslijeđivanja je autosomno dominantan s nekompletnom penetracijom gena. MMD je karakterizirana stanjenjem intime u stijenci krvnih žila terminalnih završetaka karotidnih arterija, obično obostrano i simetrično, a mogu biti zahvaćene i krvne žile Willisovog kruga. Oblikuje se abnormalna krvnožilna mreža od baze mozga do novih formacija u Willisovom krugu. Bolest se

dokazuje cerebralnom angiografijom gdje opisane krvne žilice izgledaju poput dima, zato i ime moya-moya. U juvenilnom tipu MMD javlja se cerebralna ishemija zbog stenoze krvne žile koja daje kliničku sliku, dok se u adultnom tipu javlja intracerebralna hemoragija zbog rupture fragilnih kolateralnih krvnih žila formiranih u mlađoj dobi (56, 57).

Fabryeva bolest druga je najčešća bolest odlaganja (nakon Gaucherove bolesti). Nedostatak α -galaktozidaze A rezultira neadekvatnošću glikosfingolipida, uglavnom globotriaosilceramida (engl. *globotriaosylceramide*) (Gb3) nakupljajući se u lizosomima raznih stanica uključujući i endotel krvnih žila. Nakupljanje uzrokuje disfunkciju stanica vodeći do zatajenja organa. Klinički simptomi Fabryeve bolesti su neuropatske boli zbog nakupljanja lipida u senzornim okrajinama živaca, a mogu se pojaviti i u bubrežnim tubulima i glomerulima, srčanom mišiću, moždanoj kori i drugim strukturama mozga. Glavne kliničke manifestacije su zatajenje bubrega, kardiomiopatija i multipli moždani udari. MU se javljaju u oko 25% pacijenata prije 40. godine starosti podjednako u karotidnom kao i vertebrobazilarnom slivu. MU je izravni rezultat okluzije malih krvnih žila depozitima lipida, ali može biti i manifestacija embolizma velike krvne žile. Dijagnoza se postavlja nalazom genetskom analizom snižene aktivnosti α -galaktozidaze A (58-61).

Anemija srpastih stanica je autosomno recesivna bolest kod koje dolazi do zamjene valina za glutamat u β -lancu hemoglobina koji producira protein s greškom hemoglobin S (HbS). Takav protein formira velike agregate i oblikuje crvene krvne stanice poput srpa, a te abnormalne stanice uzrokuju opstrukciju krvnih žila što dovodi do hipoksije tkiva inducirajući stvaranje novih srpastih

eritrocita. Anemija srpastih stanica najčešći je uzrok moždanog udara u djece zbog vaskulopatije arterije karotis interne i njezinih ogranaka, a česti su i tzv. *silent strokes*, tj. tihi moždani udari u oko 11% pacijenata do 20. godine i 24% pacijenata do 45 godine (62-64).

Homocistinurija je bolest metabolizma metionina, nasljeđuje se autosomno recesivno te dovodi do nedostatka enzima cistation- β -sintetaze (CBS) (65) koji pretvara homocistein u cistationin. Koncentracija homocisteina u plazmi raste preko $>100 \mu\text{mol/l}$, kao i koncentracija u urinu. Munke i suradnici su 1988. godine mapirali gen CBS na kromosomu 21q22.3. Endotelna disfunkcija s proliferacijom glatkomišićnih stanica ubrzava aterosklerozu te uzrokuje tromboembolizaciju, bolest malih krvnih žila i disekciju arterija. Homocistinurija je multisistemska bolest i fenotip se sastoji od mentalne retardacije, ektopije leća, deformiteta skeleta i tromboembolijskih incidenta. Međunarodna studija navodi da je 50% pacijenata do 29. godine pretrpjelo tromboembolijski incident, a 32% MU (65 - 67).

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke (MELAS) je progresivna neurodegenerativna bolest. Svi pacijenti imaju mutaciju na mitohondrijskoj DNA. U oko 80% pacijenata je A u G točkasta mutacija u dihidrouridinskoj petlji transfer RNA (tRNA)^{Leu(UUR)} na poziciji 3243. Scaglia F. Karakteristični simptomi uključuju: mitohondrijalnu encefalopatiju, epileptične napadaje, laktoacidozu, epizode poput moždanog udara, migrenske glavobolje i druge znakove mitohondrijske bolesti. MRI u T2 tehnici prikazuje multifokalna područja korteksa velikog i malog mozga koja zahvaćaju bijelu i duboku sivu

tvar. Lezije se tipično javljaju u okcipitalno parijetalnom području i rijetko zahvaćaju normalna vaskularna područja (68 - 71).

Marfanov sindrom je multisistemska bolest vezivnog tkiva izazvana mutacijom ekstracelularnog matriks proteina fibrilin1 na kromosomu 15q21.1 koji se nasljeđuje autosomno dominantno. Fibrilin1 pojavljuje se u mnogim tkivima kao što su srčani mišići i arterije te tamo dovodi do kalcifikacije elastičnih niti, upale stijenki krvnih žila, hiperplazije intime i strukturalnog kolapsa stijenke krvne žile. Kliničke manifestacije ukazuju da oko 3,5% pacijenata pati od neurovaskularnih poremećaja; oko 65% ima TIA, 10% moždani udar, 10% infarkt leđne moždine, 10% subduralni hematoma i 5% subarahnoidalnu hemoragiju (SAH) (72, 73).

Ehlers-Danlos syndrome type IV je autosomno dominantna bolest s mutacijom gena za tip III prokolagen COL3A1 na kromosomu 2q31. Klinički simptomi su sklonost fragilnim arterijama i rupturi crijeva. Neurovaskularne komplikacije javljaju se u oko 10% pacijenata, a uključuju intracerebralne aneurizme i disekcije karotidnih i vertebralnih arterija (74).

Ishemični moždani udar prepoznat je kao komplikacija *pseudoxanthoma elasticum*. Mutacija gena ABCC6 na kromosomu 16p13 za MRP6 protein odgovorna je za kronično odlaganje kalcija u arterijama i utječe na ishemični i hemoragični tip moždanog udara kao i ostala stanja poput nasljedne kardiomiopatije, disritmije, vaskulopatije, koagulopatije, dislipidemije i hemoglobinopatije (74).

1.3.2 Poligene bolesti i moždani udar

Moždani udar se u glavnini slučajeva prikazuje kao bolest prouzročena s više čimbenika. Provedene studije slučajeva blizanaca i obitelji opisuju mnogo različitih genetskih čimbenika za moždani udar. Mnogi aleli imaju minimalni učinak samostalno, ali zajedničkim djelovanjem pridonose moždanom udaru. Bolesti jednog gena uzrokuju moždani udar u mlađih od 40. godine. Kod pojave moždanog udara u mlađih pacijenata treba uzeti u klinička razmatranja i ostale bolesti poput bolesti srca, kongenitalne bolesti srca, reumatske bolesti zalistaka, bolesti mitralnih zalistaka, endokarditisa, aritmije i povijest ranijih operacija na srcu, vaskulitisa, sistemskog lupusa, reumatoidnog artritisa, Sjögrenovog sindroma, poliarteritis nodose, sarkoidoze i upalne bolesti crijeva te hiperkoagulabilnih stanja (uključujući antifosfolipidni sindrom i antitrombin III, nedostatak proteina C ili proteina S). Ostala stanja uključuju zlouporabu kokaina i heroina, traumu, disekciju arterija, trombozu venskih sinusa i migrenu.

Moždani udar vodeći je uzrok smrti i invaliditeta u svijetu. Provedene genske studije povezale su prokoagulabilna stanja i poremećaje hemostaze i ishemični moždani udar, TAI te trombozu venskih sinusa s Faktorom V, protrombinom, Faktorom VII, fibrinogenom, PAI-1, Faktorom XIII, glikoproteinom IIb/IIIa, glikoproteinom Ib/IX, glikoproteinom Ia/IIa, angiotenzin-konvertirajućim enzimom (ACE), angiotenzinogenom, eNOS, metilentetrahidrofolat reduktazom (MTHFR), apolipoproteinom E, apolipoproteinom A1/CIII, apolipoproteinom B, lipoprotein lipazom, paraoksanazom I. (75 - 78)

1.3.3 PAI-1 i moždani udar

Regulacija ekspresije gena PAI-1 u vaskularnom tkivu održavana je koncentracijom glukoze, inzulina i proinzulinskih molekula. U kulturama endotelnih stanica vrlo niske gustoće lipoproteini (VLDL) i nezasićene masne kiseline povisuju sekreciju PAI-1. Endotelne stanice uzgojene s glatkomišićnih stanica krvnih žila produciraju više PAI-1 od endotelnih stanica uzgojenih bez dodatka tih stanica. Primjena heparina snižava produkciju PAI-1 endotelnih stanica (79).

U čovjeka je gen za PAI-1 smješten na sedmom kromosomu i sadrži devet eksona i osam introna. U promotorskoj regiji gena za PAI-1 utvrđena je varijacija koju čini četiri ili pet gvanozina u sekvenci (polimorfizam 4G/5G), a nalazi se 675 parova baza prije transkripcije. Ispitanici koji su homozigoti za alel 4G (genotip 4G/4G s frekvencijom 60%) imaju koncentraciju PAI-1 u plazmi do 25% višu od ispitanika koji su homozigoti za alel 5G (genotip 5G/5G). *In vitro*

studije utvrdile su drugačiju organizaciju transkripcijsko-regulatornog proteina na tom mjestu. Povišena transkripcija gena povezana je s alelom 4G i očituje se u aktivaciji samo transkripcijskog dijela, dok kod alela 5G dolazi do snižavanja aktivacije transkripcije jer veže i protein represor. (40)

Ispitanici s hipertrigliceridemijom i nosioci genotipa 4G/4G imaju višu koncentraciju PAI-1 u plazmi u usporedbi s nosiocima genotipa 5G/5G. Ovaj zaključak je potpomognut utvrđivanjem senzitivnog mjesta u promotorskoj regiji pored 4G/5G mjesta za VLDL.

Trigliceridi snižavaju produkciju PAI-1 u hepatocitima u studijama *in vitro*, efekt je potaknut VLDL receptorom uz nazočnost snižene aktivnosti inzulina (80, 81). Ove kliničke i laboratorijske studije ukazuju da je sindrom rezistencije inzulina kroz efekt triglicerida alternator u sintezi i sekreciji PAI-1 što povećava ateromatozni rizik (80, 82 - 84).

Genske varijacije gena PAI-1 utječu na transkripcijsku aktivnost i koncentraciju PAI-1 koja bi mogla biti uključena u patofiziologiju MU (85).

Prevalencija alela 4G bila je viša u muškaraca s kardiovaskularnom bolešću te razvojem akutnog koronarnog sindroma (86), dok druga studija Hoekstra i suradnika na 1793 ispitanika nalazi kako je genotip 4G/4G gena PAI-1 povezan s reduciranim rizikom za moždani udar u starijih osoba (45). Nalaz polimorfizma 4G/5G u studiji Wiklunda i suradnika povezuje se sa učestalijim ishemičnim moždanim udarom (87). Studija Hindorffa i suradnika povezuje polimorfizam 4G/5G s akutnim infarktom miokarda i moždanim udarom u mlađih žena (46).

Nekoliko studija pokazalo je kako čimbenici zgrušavanja imaju važnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora (88 - 92). Aktivacija sustava zgrušavanja

doprinosi agresivnosti tumora i obratno. Protumorsko djelovanje plazmina očituje se u aktivaciji faktora rasta koji potiču stanice tumora na proliferaciju, migraciju, invaziju i metastaziranje. Antitumorsko djelovanje PAI-1 je inhibicija tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) koja rezultira smanjenjom aktivacijom plazminogena, a ima i antiadhezivno djelovanje kojim sprječava vezanje urokinaze za urokinazni receptor (uPAR). Protumorsko djelovanje PAI-1 je i u poticanju angiogeneze, izazivanjem migracije endotelnih stanica iz perivaskularnog područja prema tumoru. PAI-1 štiti tumorske stanice od spontane apoptoze tako što inhibira aktivaciju plazminogena u plazmin koji ima ulogu u apoptozi posredovanoj ligandom Fas. PAI-1 se koristi kao biomarker angiogeneze i invazije tumorskih stanica glioblastoma te je dokazana korelacija polimorfizama 4G/5G i rizika od nastanka tog tumora ali kod tumora dojke nije dokazana povezanost (93 - 95).

2. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Opći cilj rada je genotipizacijom utvrditi frekvenciju alela u ispitanika s MU.

Specifični ciljevi rada su:

- utvrditi razliku i značajnost u frekvenciji polimorfizma 4G/5G, 4G/4G, 5G/5G u ispitanika s MU te utvrditi učestalost polimorfizma u skupini zdravih ispitanika u skladu s dosad objavljenim rezultatima za bijelu rasu (96)
- primarnom prevencijom u ispitanika s opisanim polimorfizmom ukazati na mogući genski rizični čimbenik za MU.

3. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog rada je procjena pojavnosti polimorfizma 4G/5G promotorske regije PAI-1 kao novog čimbenika rizika za nastajanje MU. Uočena je povezanost pacijenta homozigota za alel 4G s hipertrigliceridemijom te su takvi pacijenti imali višu razinu PAI-1 što ukazuje na genotip specifičnu interakciju s trigliceridima (97). To je potvrđeno identifikacijom VLDL osjetljivog mjesta u promotorskoj regiji blizu 4G/5G sekvence. U inzulin rezistentnom sindromu djelovanjem triglicerida mijenja se sinteza i sekrecija PAI-1, čime se povećava ateromatozni rizik (98, 99).

4. ISPITANICI I METODE

Ispitivanje je provedeno na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice tijekom 12 mjeseci. Kriteriji za uključivanje ispitanika su bolesnici koji su po prvi puta bili primljeni s kliničkom slikom akutnog MU koji je verificiran kompjuteriziranom tomografijom (CT) mozga unutar 24 sata. Isključenje iz studije provodilo se ukoliko se neuroradiološkom obradom verificirao tumor mozga ili je učinjenim laboratorijskim pretragama potvrđen akutni infarkt miokarda, sepsa ili duboka venska tromboza.

Konačni uzorak uključivao je 163 ispitanika od kojih je 133 primljeno s kliničkom slikom akutnog MU. Troje ispitanika isključeno je nakon potvrđene dijagnoze subarahnoidalne hemoragije (SAH) i tumora mozga.

Dijagnoza se postavila na temelju anamneze, neurološkog statusa, a potvrdila CT-om u roku 24 sata.

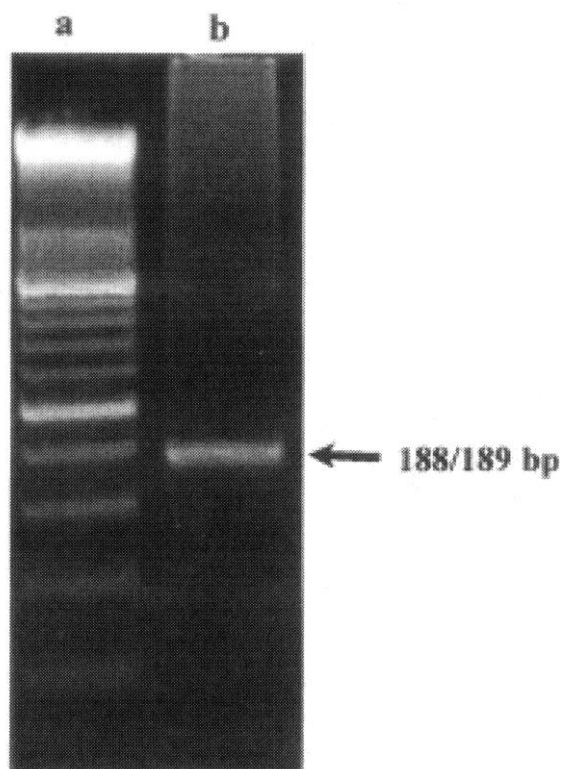
Kontrolnu skupinu činilo je 27 ispitanika koji su bili primljeni na dijagnostičku obradu zbog vertiginoznih tegoba te na učinjenom CT-u nije bilo znakova MU. Svim ispitanicima, dragovoljnim sudionicima u ispitivanju, učinjene su laboratorijske i druge pretrage (kompletna krvna slika (KKS), glukoza, urea, kreatinin, lipidogram, CRP, elektroliti, ABS, kolagulacijske pretrage, kardioselektivni enzimi, CD karotidnih i vertebralnih arterija, TCD, EEG, CT mozga).

4.1 Uzorkovanje

Krv za genotipizaciju uzorkovana je pod vakumom u epruvete s 7,5 % K₃EDTA antikoagulantnim sredstvom (po dvije epruvete od 3 ml, Becton Dickinson Vacutainer™, Plymouth, Velika Britanija). Genomska DNA izolirana je iz pune krvi 160 ispitanika standardnom metodom isoljavanja (33). Izolirana DNA resuspendirana je u TE puferu (10 mM Tris, pH 7,4 koji sadrži 0,1 mM EDTA), te čuvana na 2 – 8°C.

4.2 PCR

Lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) umnožen je ulomak dužine 188 (4G) ili 189 (5G) parova baza ovisno o prisutnoj inserciji ili deleciji na genu. U reakciji su korištene 5' i 3' početnice (34): TAACCCCTGGTCCCGTTC i CAGAGGACTCTTTCC (MWG-Biotech, Ebersberg, Njemačka). Konačne koncentracije reaktanata lančane reakcije polimeraze su: 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (Roche, Mannheim, Njemačka), 0,15 μM početnica, 0,3 μg DNA, 1,0 U Taq polimeraze (Roche, Mannheim, Njemačka) u ukupnom volumenu od 50 μL. Reakcije umnažanja izvođene su u aparatu Techne Progene Thermal Cycler (Techne, Cambridge, Velika Britanija) uz sljedeće uvjete: početna denaturacija na 95°C/5 min, zatim 35 ciklusa na 95°C/45 sek, 60°C/45 sek, 72°C/45 sek, te završna elongacija na 72°C/10 min. Uspješnost umnažanja DNA provjerava se elektroforezom (120V/15 min) na gelu Clearose® BG (Elchrom Scientific, Cham, Švicarska) s etidijevim bromidom (0,5 μg/ml) uz upotrebu molekularnog biljega MWM XIII (Roche, Mannheim, Njemačka) (100).

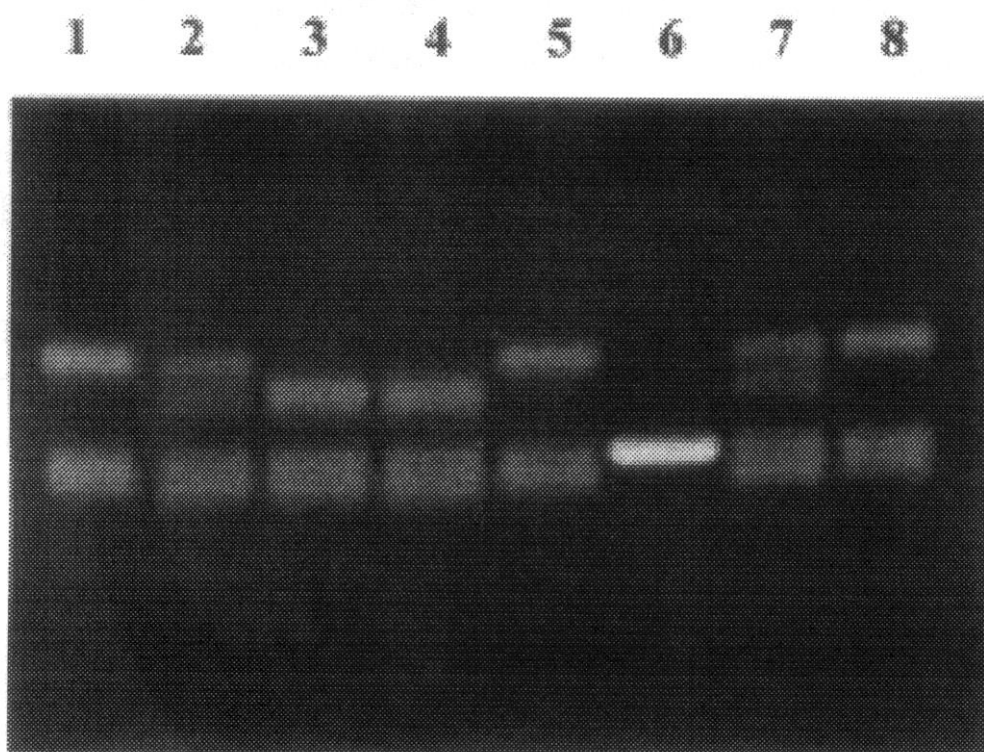


Slika 1. PCR amplifikacija. a) molekularni biljeg, b) PCR produkt gena PAI-1 duljine 188/189 bp.

4.3 SSCP

Nakon PCR umnažanja slijedila je analiza konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA (engl. *Single Stranded Polymorphism Analysis*, SSCP) denaturacijom PCR ulomaka (35). Napravljena je svaki put svježa otopina za denaturaciju miješanjem 1 mL 100% formamida i 10 μ L 1 M NaOH, uz par zrnaca *bromphenolblue*. U 15 μ L otopine za denaturaciju dodano je 5 μ L PCR produkta. Smjesa je denaturirana 7 minuta na 95°C i potom brzo stavljena na led da se održi jednolančani oblik DNA. Denaturirane jednolančane DNA

razdvajane su u elektroforetskom sustavu Elchrom®SAE 2000 s visokim razlučivanjem korištenjem GMA™ gelova (Elchrom® Scientific, Cham, Švicarska). Elektroforeza je izvođena u 30 mM TAE puferu stalne temperature (14°C) uz napon od 30 V (2,5 V/cm) tijekom noći (18 sati). Gel je bojan 45 minuta fluorescentnom bojom SYBR Gold (*Molecular Probes*, Leiden, Nizozemska) otopljenom u 30 mM TAE puferu (1:10 000). Denaturirane vrpce DNA vizualizirane su na UV transluminatoru (254 nm) i fotografirane filmom Polaroid 667. U svaku seriju analize genotipova bila je uključena negativna (svi reagensi osim DNA) i pozitivna kontrola poznatih genotipova (101, 102).



Slika 2. SSCP analiza polimorfizama 4G/5G. (linije 1 - 3) kontrolni uzorci; (linije 4 - 5 i 7 - 8) uzorci nepoznatih genotipova. (linije 1, 5, 8) homozigot za alel 5G; (linije 2, 7) heterozigot 4G/5G; (linije 3, 4) homozigot za alel 4G; (linija 6) nedenaturirana DNA

4.4 Statistička analiza podataka

U deskriptivnoj statistici korišteni su prikazi apsolutnih i relativnih brojeva (postotaka), a numeričke varijable prikazane su kroz aritmetičke sredine \pm standardne devijacije, odnosno medijane i interkvartilne raspone. Kategorijske varijable bit će analizirane korištenjem X^2 testa dok su se razlike između kvantitativnih varijabli analizirale Mann-Whitney U testom (razlike između ispitivane i kontrolne skupine) te Kruskal-Wallisovim testom (razlike unutar ispitivane skupine između pojedinih PAI-1 genotipova). U multivarijantnoj predikciji pripadnosti skupini s akutnim MU korištena je binarna logistička regresija, kojom su izraženi omjeri šanse *odds ratio*, 95% intervali pouzdanosti i izračunat postotak varijance pripisiv svakoj od analiziranih prediktorskih varijabli. Logistička regresija koristila se za procjenu međudjelovanja između pojedinih prediktorskih varijabli, uključujući i genotipove, kako bi se procijenio učinak međudjelovanja među pojedinim prediktorskim varijablama na nastanak akutnog moždanog udara. Provela se i analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže za navedeni gen (prema uputama <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) i referenci (103). Statistički značajnim rezultatom smatrala se razina značajnosti $P < 0,05$. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 21.0.

5. REZULTATI

Tablica 1. Opisna statistika ispitivanih kategorijskih varijabli, te razlike između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 test

		Skupina			
		Kontrola		MU	
		N	%	N	%
Spol	Muški	9	33,3%	71	53,4%
	Ženski	18	66,7%	62	46,6%
Otpust kući**	Ne	2	7,4%	70	52,6%
	Da	25	92,6%	63	47,4%
Hipertenzija	Ne	5	18,5%	13	9,8%
	Da	22	81,5%	120	90,2%
Antihipertenzivi	Ne	9	33,3%	46	34,8%
	Da	18	66,7%	86	65,2%
Antiagregacijski lijekovi	Ne	26	96,3%	127	95,5%
	Da	1	3,7%	6	4,5%
Fibrilacija atrijske (od ranije)	Ne	25	92,6%	103	77,4%
	Da	2	7,4%	30	22,6%
Pušenje*	Ne	13	48,1%	98	73,7%
	Da	14	51,9%	35	26,3%
Dijabetes*	Ne	23	85,2%	82	61,7%
	Da	4	14,8%	51	38,3%
Alkohol	Ne	22	81,5%	94	70,7%
	Da	5	18,5%	39	29,3%
CT mozga pozitivan**	Ne	27	100,0%	0	,0%
	Da	0	,0%	133	100,0%
Tip IVC	LACS	0	,0%	50	37,9%
	PACS	0	,0%	46	34,8%
	POCI	0	,0%	6	4,5%
	TACS	0	,0%	30	22,7%
Prethodni MU*	Ne	20	74,1%	123	92,5%
	Da	7	25,9%	10	7,5%
Likvor*	Negativan	27	100,0%	109	82,0%
	Pozitivan	0	,0%	24	18,0%
Obiteljska anamneza DM	Ne	27	100,0%	127	95,5%
	Da	0	,0%	6	4,5%
Koagulogram	Negativan	17	63,0%	78	58,6%
	Pozitivan	10	37,0%	55	41,4%
PRETILOST	Ne	20	74,1%	88	66,2%
	Da	7	25,9%	45	33,8%
PAI-1	4G 4G	7	25,9%	32	24,1%
	4G 5G	9	33,3%	55	41,4%
	5G 5G	11	40,7%	46	34,6%

* χ^2 test, $P < 0,05$; ** χ^2 test, $P < 0,001$

Tablica 2. Rezultati X² testa iz Tablice 1.

		Skupina
Spol	X2 test	3,609
	df	1
	P	0,057
Otpust kući	X2 test	18,546
	df	1
	P	<0,001
Hipertenzija	X2 test	1,719
	df	1
	P	0,190
Antihipertenzivi	X2 test	0,023
	df	1
	P	0,880
Antiagregacijski lijekovi	X2 test	0,035
	df	1
	P	0,852
Fibrilacija atrijska (od ranije)	X2 test	3,219
	df	1
	P	0,073
Pušenje	X2 test	6,888
	df	1
	P	0,009
Dijabetes	X2 test	5,509
	df	1
	P	0,019
Alkohol	X2 test	1,314
	df	1
	P	0,252
CT mozga pozitivan	X2 test	160,000
	df	1
	P	<0,001
Prethodni MU	X2 test	8,008
	df	1
	P	0,005
Likvor	X2 test	5,732
	df	1
	P	0,017
Obiteljska anamneza DM	X2 test	1,266
	df	1
	P	0,261
Koagulogram	X2 test	0,173
	df	1
	P	0,677

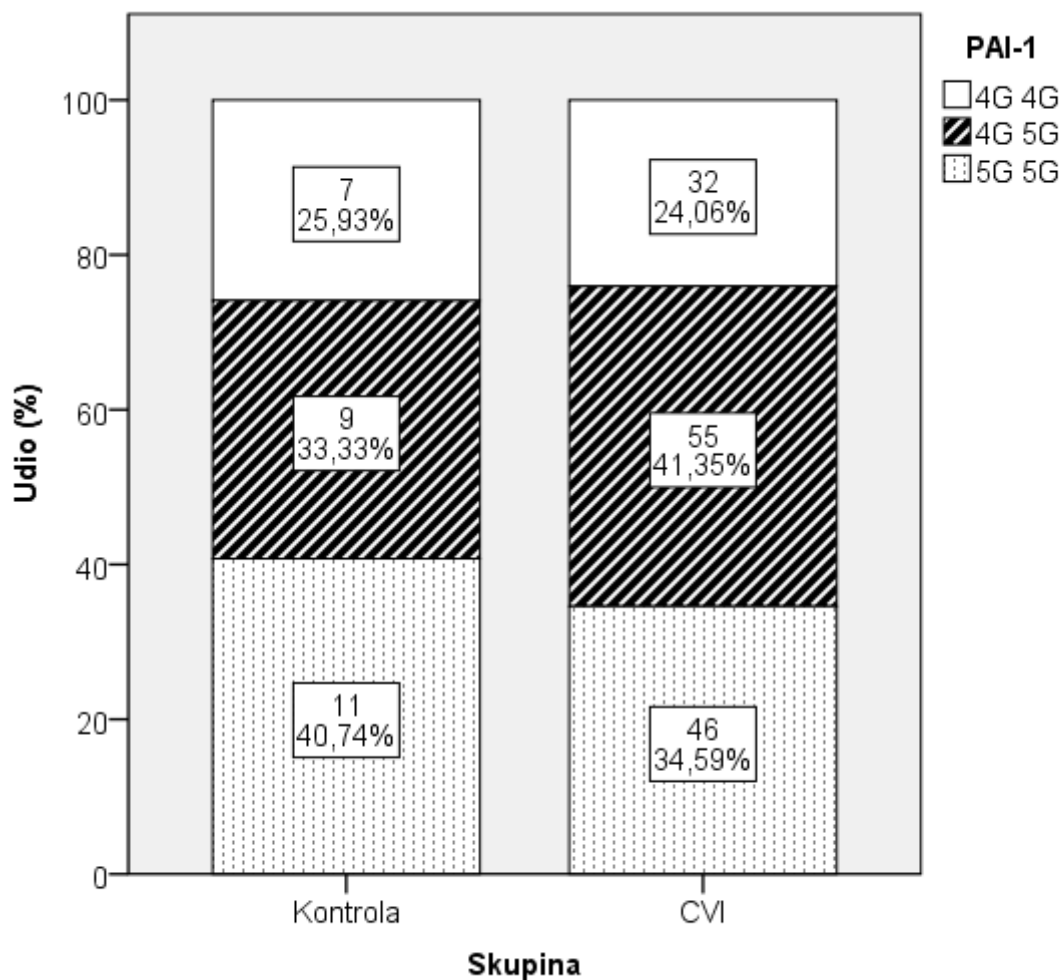
Pretilost	X2 test	0,640
	df	1
	P	0,424
PAI-1	X2 test	0,632
	df	2
	P	0,729

Tablica 1. prikazuje opisanu statistiku ispitivanih kategorijskih varijabli te razlike između ispitivane i kontrolne skupine. U ispitivanu skupinu uključeno je 133 pacijenata koji su imali dijagnozu moždanog udara (MU), dok je u kontrolnoj skupini bilo 27 ispitanika bez dokazanog akutnog MU.

Značajne razlike između ispitivane i kontrolne skupine zabilježene su u otpustu kući (odnosno nezadržavanju na odjelu) koje je bilo skoro dvostruko češće u kontrolnoj skupini ($P < 0,001$). Zanimljiv je podatak da je značajno više pušača bilo u kontrolnoj skupini ($P = 0,019$). Prethodni MU bio je značajno češći u kontrolnoj skupini ($P = 0,005$), dok je pozitivan nalaz CT-a, očekivano (jer je jedan od dijagnostičkih kriterija) značajno češći u ispitivanoj skupini. Učestalost diabetesa mellitusa (DM) u ispitivanoj skupini bila je više nego dvostruko veća nego u kontrolnoj skupini (38,3% naprema 14,8%; $P = 0,019$).

S obzirom da je glavni cilj rada genotipizacijom utvrditi frekvenciju alela u ispitanika s akutnim moždanim udarom (MU), pojedina zastupljenost PAI genotipova prikazana je u Tablici 1, te grafički na Slici 1.

Slika 1. Frekvencija polimorfizma 4G/5G, 4G/4G, 5G/5G u ispitanika i kontrolnoj (zdravoj) skupini



Zastupljenost genotipova PAI-1 nije se statistički značajno razlikovala između ispitivane i kontrolne skupine ($P=0,729$).

Tablica 3. Izračun Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma za genotipove PAI-1 u ispitivanoj skupini

PAI-1	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	32	26,6
Heterozigot	55	65,8
Rijetki homozigot	46	40,6
Var allele freq:	0,55	
$\chi^2 =$	3,56	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,059	1 df

Tablica 4. Izračun Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuna za genotipove PAI-1 u kontrolnoj skupini

PAI-1	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	7	4,9
Heterozigot	9	13,2
Rijetki homozigot	11	8,9
Var allele freq:	0,57	
$\chi^2 =$	2,74	
χ^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,098	1 df

Načinjena je dodatna analiza Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma, odnosno razlike u zastupljenosti pojedinih genotipova PAI-1 u ispitivanoj (Tablica 3.) i kontrolnoj skupini (Tablica 4.) s obzirom na očekivanu frekvenciju u populaciji. Iako se razlika od očekivane frekvencije PAI-1 genotipa nije pokazala značajnom, ta je razlika (osobito u ispitivanoj skupini) na samoj granici značajnosti ($P=0,059$) što upućuje da bi na većem ispitivanom uzorku moglo doći i do značajnih odstupanja od Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma.

Tablica 5. Usporedba promatranih kvantitativnih kliničkih parametara između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

	Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Dob (godine)**	Kontrola	27	74,22	9,93	61,00	91,00	66,00	72,00	85,00
	MU	133	82,04	9,07	47,00	97,00	77,00	84,00	89,00
Dana bolničkog liječenja	Kontrola	27	16,30	8,37	4,00	30,00	9,00	16,00	24,00
	MU	133	14,96	8,53	2,00	61,00	10,00	13,00	16,50
Težina MU (NIHSS)**	Kontrola	27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MU	133	10,51	5,83	0,00	26,00	5,50	10,00	14,00
Ishod MU (Barthel)*	Kontrola	2	100,00	0,00	100,00	100,00	75,00	100,00	75,00
	MU	55	57,65	32,74	0,00	100,00	25,00	70,00	85,00

* P<0,05; ** P<0,001

Tablica 6. Rezultati Mann-Whitney U testa iz Tablice 3.

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (godine)	997,000	-3,641	<0,001
Dana bolničkog liječenja	1639,500	-,712	0,476
Težina MU (NIHSS)	13,500	-8,164	<0,001
Ishod MU (Barthel)	3,000	-2,260	0,024

Tablice 5. i 6. prikazuju usporedbu promatranih kvantitativnih kliničkih parametara između ispitivane i kontrolne skupine. Ispitivana skupina bila je značajno starija (P<0,001): medijan dobi iznosio je 84 godine (interkvartilni raspon, IQR: 77,0 – 89,0), dok je u kontrolnoj skupini medijan dobi iznosio 72,0 (IQR: 66,0 – 85,0) godina. Ishod MU bio je značajno niži u ispitivanoj skupini (P=0,024), dok je težina MU objektivno ocijenjena samo u ispitivanoj skupini, odnosno kod ispitanika s dokazanim akutnim MU.

Tablica 7. Usporedba promatranih kvantitativnih laboratorijskih i antropometrijskih parametara između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

	Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Minimum	Maximum	Centile		
							25.	Medijan	75.
Tax	Kontrola	27	36,91	0,42	36,50	38,00	36,60	36,80	37,00
	MU	133	36,67	1,19	23,90	38,00	36,50	36,80	37,00
APTV	Kontrola	10	30,90	3,25	27,00	36,00	27,75	31,00	33,25
	MU	55	32,18	4,54	23,00	48,00	29,00	32,00	35,00
PV - % aktivno*	Kontrola	10	75,90	8,49	63,00	88,00	68,50	76,00	83,00
	MU	55	85,36	17,86	28,00	122,00	76,00	88,00	95,00
PV – INR*	Kontrola	10	1,23	0,10	1,10	1,41	1,14	1,21	1,31
	MU	54	1,18	0,29	0,90	2,39	1,03	1,10	1,23
Fibrinogen	Kontrola	9	5,56	1,69	3,70	8,40	4,15	5,40	7,15
	MU	55	4,50	1,44	1,90	8,10	3,50	4,20	5,50
TV*	Kontrola	9	15,33	1,41	13,00	17,00	14,00	16,00	16,50
	MU	55	16,73	1,56	14,00	21,00	16,00	17,00	18,00
Fibrinoliza - euglob. test. (min)	Kontrola	9	174,44	47,20	80,00	210,00	140,00	210,00	210,00
	MU	55	174,65	49,19	45,00	250,00	140,00	200,00	210,00
BMI	Kontrola	27	26,13	2,78	20,30	29,80	24,00	26,90	28,00
	MU	133	25,77	3,10	19,00	37,10	23,50	25,70	27,75
uk. Kolesterol	Kontrola	27	6,31	1,43	2,90	9,30	5,40	6,00	7,10
	MU	133	5,80	1,35	3,20	9,60	4,90	5,70	6,70
HDL	Kontrola	25	1,39	0,74	0,84	4,50	0,91	1,19	1,57
	MU	133	1,51	1,31	0,49	11,40	1,07	1,27	1,60
LDL *	Kontrola	25	4,02	0,90	1,80	5,70	3,40	4,00	4,40
	MU	133	3,63	1,08	1,20	7,10	2,90	3,40	4,30
trigliceridi	Kontrola	27	2,17	1,59	0,60	7,19	1,21	1,58	2,58
	MU	133	1,76	0,98	0,49	5,50	1,06	1,47	2,32
SE	Kontrola	27	23,41	15,73	4,00	57,00	11,00	18,00	35,00
	MU	132	27,45	23,03	1,00	123,00	11,00	21,00	35,75
CRP	Kontrola	27	17,53	38,20	4,99	200,00	5,00	5,00	12,00
	MU	133	22,00	39,13	2,00	289,60	5,00	6,00	19,50
L	Kontrola	27	8,00	2,36	5,00	13,00	5,99	7,78	9,80
	MU	133	9,18	3,28	4,39	25,80	7,00	8,63	10,15
GUK	Kontrola	27	7,65	5,10	4,00	31,00	5,10	6,00	8,80
	MU	133	8,53	4,45	1,00	28,60	5,80	7,00	9,75
HbA1c	Kontrola	27	5,63	1,04	3,50	8,70	5,00	5,60	6,50
	MU	133	6,20	2,17	3,50	12,20	4,50	5,50	6,90

* P<0,05; ** P<0,001

Tablica 8. Rezultati Mann-Whitney U testa iz Tablice 7.

	Mann-Whitney U	Z	P
Tax	1463,000	-1,524	0,127
APTV	228,000	-,858	0,391
PV - % aktivno	146,500	-2,338	0,019
PV - INR	155,500	-2,118	0,034
Fibrinogen	151,500	-1,856	0,063
TV	132,500	-2,266	0,023
Fibrinoliza - euglob. test. (min)	239,000	-,172	0,864
BMI	1568,500	-1,034	0,301
uk. kolesterol	1404,500	-1,782	0,075
HDL	1467,000	-,932	0,352
LDL	1235,500	-2,036	0,042
trigliceridi	1552,500	-1,107	0,268
SE	1675,000	-,491	0,623
CRP	1748,000	-,219	0,826
L	1411,000	-1,752	0,080
GUK	1406,000	-1,775	0,076
HbA1c	1772,000	-0,109	0,914

Tablice 7. i 8. prikazuju usporedbu promatranih kvantitativnih laboratorijskih i antropometrijskih parametara između ispitivane i kontrolne skupine. Značajno veće razine u ispitivanoj skupini zabilježene su za PV-% aktivno ($P=0,019$) i TV ($P=0,023$), dok su PV INR ($P=0,034$) i LDL ($P=0,042$) bili značajno niži u ispitivanoj skupini.

Tablica 9. Odnos raspodjele PAI-1 genotipa i promatranih kategorijskih varijabli u skupini ispitanika imaju akutni MU: X² test

		PAI-1					
		4G 4G		4G 5G		5G 5G	
		N	%	N	%	N	%
Spol	Muški	17	53,1%	32	58,2%	22	47,8%
	Ženski	15	46,9%	23	41,8%	24	52,2%
Otpust kući	Ne	15	46,9%	31	56,4%	24	52,2%
	Da	17	53,1%	24	43,6%	22	47,8%
Hipertenzija	Ne	1	3,1%	5	9,1%	7	15,2%
	Da	31	96,9%	50	90,9%	39	84,8%
Antihipertenzivi*	Ne	13	40,6%	12	22,2%	21	45,7%
	Da	19	59,4%	42	77,8%	25	54,3%
Antiagregacijski lijekovi	Ne	30	93,8%	54	98,2%	43	93,5%
	Da	2	6,3%	1	1,8%	3	6,5%
Fibrilacija atrija (od ranije)	Ne	21	65,6%	46	83,6%	36	78,3%
	Da	11	34,4%	9	16,4%	10	21,7%
Pušenje	Ne	24	75,0%	41	74,5%	33	71,7%
	Da	8	25,0%	14	25,5%	13	28,3%
Dijabetes	Ne	18	56,3%	36	65,5%	28	60,9%
	Da	14	43,8%	19	34,5%	18	39,1%
Alkohol	Ne	20	62,5%	40	72,7%	34	73,9%
	Da	12	37,5%	15	27,3%	12	26,1%
Tip IVC	LACS	12	38,7%	17	30,9%	21	45,7%
	PACS	12	38,7%	25	45,5%	9	19,6%
	POCI	1	3,2%	4	7,3%	1	2,2%
	TACS	6	19,4%	9	16,4%	15	32,6%
Prethodni MU	Ne	30	93,8%	51	92,7%	42	91,3%
	Da	2	6,3%	4	7,3%	4	8,7%
Likvor	Negativan	24	75,0%	46	83,6%	39	84,8%
	Pozitivan	8	25,0%	9	16,4%	7	15,2%
Obiteljska anamneza DM	Ne	30	93,8%	53	96,4%	44	95,7%
	Da	2	6,3%	2	3,6%	2	4,3%
Koagulogram*	Negativan	24	75,0%	26	47,3%	28	60,9%
	Pozitivan	8	25,0%	29	52,7%	18	39,1%
PRETILOST	Ne	21	65,6%	36	65,5%	31	67,4%
	Da	11	34,4%	19	34,5%	15	32,6%

*X² test, P<0,05; **X² test, P<0,001

Tablica 10. Rezultati X² testa iz Tablice 9.

		PAI-1
Spol	X2 test	1,081
	df	2
	P	0,583
Otpust kući	X2 test	0,736
	df	2
	P	0,692
Hipertenzija	X2 test	3,179
	df	2
	P	0,204
Antihipertenzivi	X2 test	6,627
	df	2
	P	0,036
Antiagregacijski lijekovi	X2 test	1,582
	df	2
	P	0,453
Fibrilacija atrija (od ranije)	X2 test	3,784
	df	2
	P	0,151
Pušenje	X2 test	0,139
	df	2
	P	0,933
Dijabetes	X2 test	0,743
	df	2
	P	0,690
Alkohol	X2 test	1,376
	df	2
	P	0,502
Tip IVC	X2 test	11,135
	df	6
	P	0,084
Prethodni MU	X2 test	,170
	df	2
	P	0,918
Likvor	X2 test	1,400
	df	2
	P	0,496
Obiteljska anamneza DM	X2 test	0,325
	df	2
	P	0,850
Koagulogram	X2 test	6,556
	df	2
	P	0,038

PRETILOST	X2 test	0,047
	df	2
	P	0,977

U tablicama 9. i 10. prikazani su odnosi raspodjele genotipa PAI-1 i promatranih kategorijskih varijabli u skupini ispitanika koji imaju akutni MU. U skupini pacijenata koji su uzimali antihipertenzive značajno je najzastupljeniji genotip 4G/5G ($P=0,036$) kao i u onih pacijenata koji su imali pozitivan nalaz koagulograma ($P=0,038$).

Tablica 11. Odnos raspodjele genotipa PAI-1 i promatranih kvantitativnih varijabli u skupini ispitanika koji imaju akutni MU: Kruskal-Wallisov test

PAI-1	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
Ishod MU (Barthel)	4G 4G	14	54,64	36,19	0	95	20,00	67,50	90,00
	4G 5G	22	64,36	30,31	0	100	37,50	72,50	91,25
	5G 5G	19	52,11	33,22	0	100	10,00	50,00	80,00
Težina MU (NIHSS)	4G 4G	32	9,31	5,24	0	19	5,00	7,00	13,50
	4G 5G	55	10,49	5,27	3	23	6,00	10,00	12,00
	5G 5G	46	11,37	6,75	3	26	5,00	10,50	18,00
Dob (godine)	4G 4G	32	82,78	9,61	57	96	76,50	85,00	90,00
	4G 5G	55	82,22	8,50	47	92	80,00	84,00	88,00
	5G 5G	46	81,30	9,48	52	97	76,00	82,00	88,25
Dani bolničkog liječenja	4G 4G	32	16,41	10,72	2	61	10,25	13,00	21,75
	4G 5G	55	14,85	8,09	7	42	10,00	12,00	16,00
	5G 5G	46	14,09	7,31	3	45	9,75	13,00	16,00
Tax	4G 4G	32	36,34	2,30	24	38	36,50	36,65	37,00
	4G 5G	55	36,79	0,42	36	38	36,50	36,80	37,10
	5G 5G	46	36,77	0,41	36	38	36,40	36,80	37,00
APTV	4G 4G	8	30,13	4,49	23	35	25,50	32,00	33,75
	4G 5G	29	32,03	4,49	23	42	28,50	32,00	35,00
	5G 5G	18	33,33	4,54	28	48	30,75	32,00	34,50
PV - % aktivno	4G 4G	8	84,50	8,21	74	94	76,50	84,50	93,25
	4G 5G	29	86,21	18,66	28	122	78,00	90,00	98,00
	5G 5G	18	84,39	20,23	37	122	73,00	84,50	98,75
PV - INR	4G 4G	8	1,12	0,08	1,03	1,25	1,04	1,13	1,17
	4G 5G	28	1,19	0,31	0,90	2,39	1,01	1,09	1,23
	5G 5G	18	1,19	0,31	0,90	2,27	1,01	1,12	1,25
Fibrinogen	4G 4G	8	5,01	1,67	2,80	8,10	4,13	4,30	6,18
	4G 5G	29	4,17	1,40	1,90	7,70	3,45	3,90	4,60
	5G 5G	18	4,79	1,36	3,00	7,50	3,60	4,40	5,83
TV	4G 4G	8	16,25	1,49	15,00	19,00	15,00	16,00	17,50
	4G 5G	29	16,83	1,58	14,00	21,00	16,00	17,00	18,00
	5G 5G	18	16,78	1,59	15,00	21,00	15,75	16,50	18,00
Fibrinoliza - euglob. Test. (min)	4G 4G	8	155,63	53,01	45,00	210,00	127,50	170,00	195,00
	4G 5G	29	174,86	53,03	65,00	250,00	135,00	210,00	210,00
	5G 5G	18	182,78	40,70	100,00	210,00	160,00	205,00	210,00

PAI-1		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
VISINA	4G 4G	32	171,66	7,33	157,00	186,00	165,50	172,00	177,75
	4G 5G	55	172,11	8,54	154,00	189,00	165,00	170,00	180,00
	5G 5G	46	169,89	8,97	153,00	190,00	163,75	169,00	176,50
TEŽINA	4G 4G	32	76,63	11,29	55,00	103,00	68,50	75,50	83,00
	4G 5G	55	76,16	12,95	55,00	100,00	65,00	77,00	85,00
	5G 5G	46	74,70	11,04	55,00	102,00	65,00	75,00	80,00
BMI	4G 4G	32	25,96	3,06	22,00	32,50	23,53	25,60	28,23
	4G 5G	55	25,63	3,46	19,00	37,10	23,10	25,50	27,80
	5G 5G	46	25,82	2,69	20,20	30,90	23,90	26,10	27,55
uk. kolesterol	4G 4G	32	5,70	1,11	3,50	8,20	4,99	5,60	6,70
	4G 5G	55	5,71	1,35	3,20	9,10	4,60	5,70	6,66
	5G 5G	46	5,98	1,50	3,58	9,60	4,90	5,60	7,00
HDL	4G 4G	32	1,36	0,59	0,62	4,00	1,04	1,25	1,59
	4G 5G	55	1,50	1,43	0,49	11,40	1,05	1,25	1,55
	5G 5G	46	1,61	1,52	0,63	11,40	1,10	1,36	1,68
LDL	4G 4G	32	3,48	0,91	1,55	5,90	2,85	3,35	4,10
	4G 5G	55	3,56	1,07	1,20	6,50	2,79	3,50	4,30
	5G 5G	46	3,80	1,20	1,60	7,10	3,08	3,50	4,43
trigliceridi	4G 4G	32	1,79	1,03	0,51	4,90	1,04	1,46	2,32
	4G 5G	55	1,79	1,04	0,49	5,50	1,01	1,54	2,34
	5G 5G	46	1,70	0,88	0,54	4,00	1,10	1,39	2,29
SE	4G 4G	32	27,72	28,04	3,00	123,00	11,00	18,50	34,25
	4G 5G	54	26,69	19,69	1,00	88,00	12,75	22,50	35,00
	5G 5G	46	28,15	23,34	1,00	93,00	10,00	20,50	39,00
CRP	4G 4G	32	21,18	33,54	4,90	151,00	4,99	6,00	19,28
	4G 5G	55	19,01	31,63	4,90	174,10	5,00	5,00	17,40
	5G 5G	46	26,13	49,87	2,00	289,60	4,99	6,95	21,75
L	4G 4G	32	9,73	4,49	5,00	25,80	6,00	8,80	11,18
	4G 5G	55	9,42	3,17	4,39	20,10	7,61	9,20	10,20
	5G 5G	46	8,51	2,20	4,50	14,30	7,00	8,04	9,69
GUK	4G 4G	32	7,20	3,22	1,00	17,00	5,30	6,00	8,60
	4G 5G	55	9,48	5,46	4,80	28,60	5,80	7,00	11,20
	5G 5G	46	8,32	3,56	4,00	21,00	6,15	7,25	10,08
HbA1c	4G 4G	32	5,94	2,06	4,00	12,20	4,50	5,50	6,75
	4G 5G	55	6,44	2,52	3,50	12,00	4,50	5,60	8,00
	5G 5G	46	6,08	1,78	4,00	11,00	4,50	5,60	6,98

Tablica 12. Rezultati Kruskal-Wallisovog testa iz Tablice 9.

	Kruskal-Wallis	df	P
Ishod MU (Barthel)	1,58	2	0,454
Težina MU (NIHSS)	1,72	2	0,424
Dob (godine)	0,82	2	0,663
Dana bolničkog liječenja	0,46	2	0,796
Tax	0,37	2	0,831
APTV	1,39	2	0,500
PV - % aktivno	0,55	2	0,759
PV - INR	0,05	2	0,974
Fibrinogen	3,94	2	0,139
TV	1,38	2	0,501
Fibrinoliza - euglob. Test. (min)	2,82	2	0,244
VISINA	2,36	2	0,308
TEŽINA	0,64	2	0,725
BMI	0,55	2	0,758
uk. kolesterol	0,45	2	0,798
HDL	1,91	2	0,385
LDL	1,16	2	0,559
trigliceridi	0,08	2	0,962
SE	0,50	2	0,777
CRP	0,02	2	0,992
L	2,58	2	0,276
GUK	4,62	2	0,099
HbA1c	0,70	2	0,705

Odnos raspodjele genotipa PAI-1 i promatranih kvantitativnih varijabli u skupini ispitanika koji imaju akutni MU prikazan je u Tablicama 11. i 12.

Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima pojedinih kvantitativnih varijabli s obzirom na PAI-1 genotipove.

Tablica 13. Predikcija pozitivnog CT nalaza s obzirom na odabrane kliničke prediktorske varijable: binarna logistička regresija, uključeni svi ispitanici

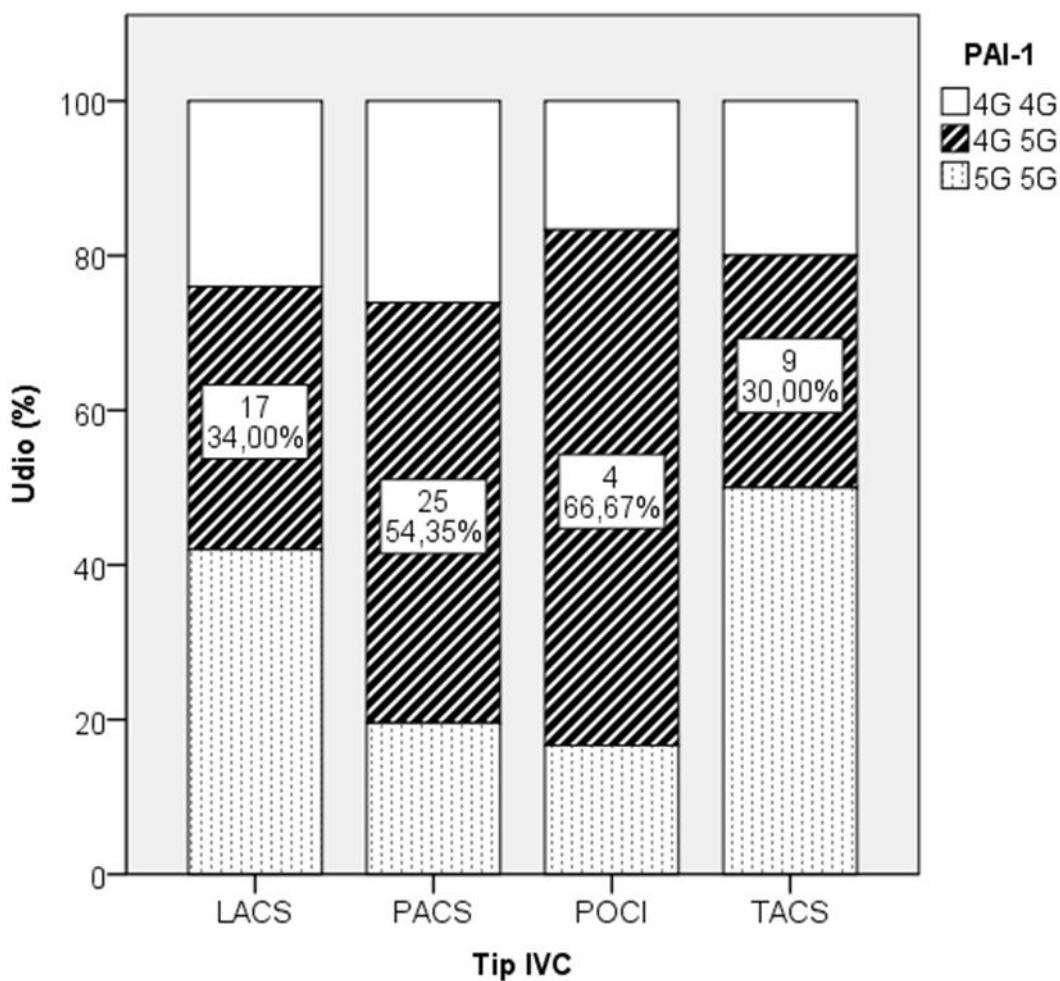
	B	S.E.	Wald	df	OR	95% CI za OR		P
						Donji	Gornji	
Dob	0,09	0,03	8,86	1	1,09	1,03	1,16	0,003
Muški spol	1,13	0,62	3,35	1	3,11	0,92	10,48	0,067
Fibrilacija atrija	0,70	0,84	0,69	1	2,01	0,39	10,35	0,405
Antihipertenzivi	-0,45	0,57	0,62	1	0,64	0,21	1,95	0,430
Diabetes melitus	1,39	0,69	4,00	1	4,01	1,03	15,62	0,046
PrethodniMU	-1,00	0,72	1,97	1	0,37	0,09	1,49	0,161
Pretilost	0,39	0,59	0,44	1	1,48	0,47	4,65	0,505
Ukupni kolesterol	0,47	0,68	0,48	1	1,60	0,42	6,00	0,489
HDL	0,31	0,29	1,18	1	1,37	0,78	2,40	0,277
LDL	-0,88	0,82	1,17	1	0,41	0,08	2,05	0,279
Trigliceridi	-0,26	0,33	0,65	1	0,77	0,41	1,46	0,420
Pozitivan koagulogram	0,67	0,59	1,28	1	1,96	0,61	6,27	0,258
PAI-1: 4G 4G (ref.)			0,32	2				0,850
PAI-1: 4G 5G	0,30	0,70	0,18	1	1,35	0,34	5,34	0,673
PAI-1: 5G 5G	-0,03	0,67	0,00	1	0,97	0,26	3,65	0,968

Tablica 13. prikazuje predikciju pozitivnog CT nalaza s obzirom na odabrane kliničke prediktorske varijable. U regresijsku analizu uključeni su svi ispitanici budući da su svi bili podvrgnuti istim dijagnostičkim procedurama i kriterijima. Ovom analizom pokušalo se ustanoviti koje odabrane kliničke varijable u multivarijantnom okružju značajno prediktiraju pozitivan nalaz CT-a, odnosno akutni MU. Regresijski model bio je statistički značajan ($P=0,001$) te je objašnjavao 35,6% varijance zavisne varijable i ispravno klasificirao 87,3% ispitanika. Kao najjači značajni prediktor akutnog MU bio je diabetes mellitus (ispitanici koji imaju pozitivnu dijagnozu DM imaju 4,01 puta veću šansu pozitivnog CT nalaza za MU: (OR=4,01; 95%CI: 1,03 – 15,62; $P=0,046$)) te starija dob (OR=1,09; 95%CI: 1,03 – 1,16; $P=0,003$), kontrolirano za sve ostale varijable u modelu.

Tablica 14. Odnos PAI polimorfizma s vrstom MU: X² test

		Tip IVC								P
		LACS		PACS		POCI		TACS		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
PAI-1	4G 4G	12	24,0%	12	26,1%	1	16,7%	6	20,0%	0,084
	4G 5G	17	34,0%	25	54,3%	4	66,7%	9	30,0%	
	5G 5G	21	42,0%	9	19,6%	1	16,7%	15	50,0%	

Slika 2. Odnos PAI polimorfizma s vrstom MU

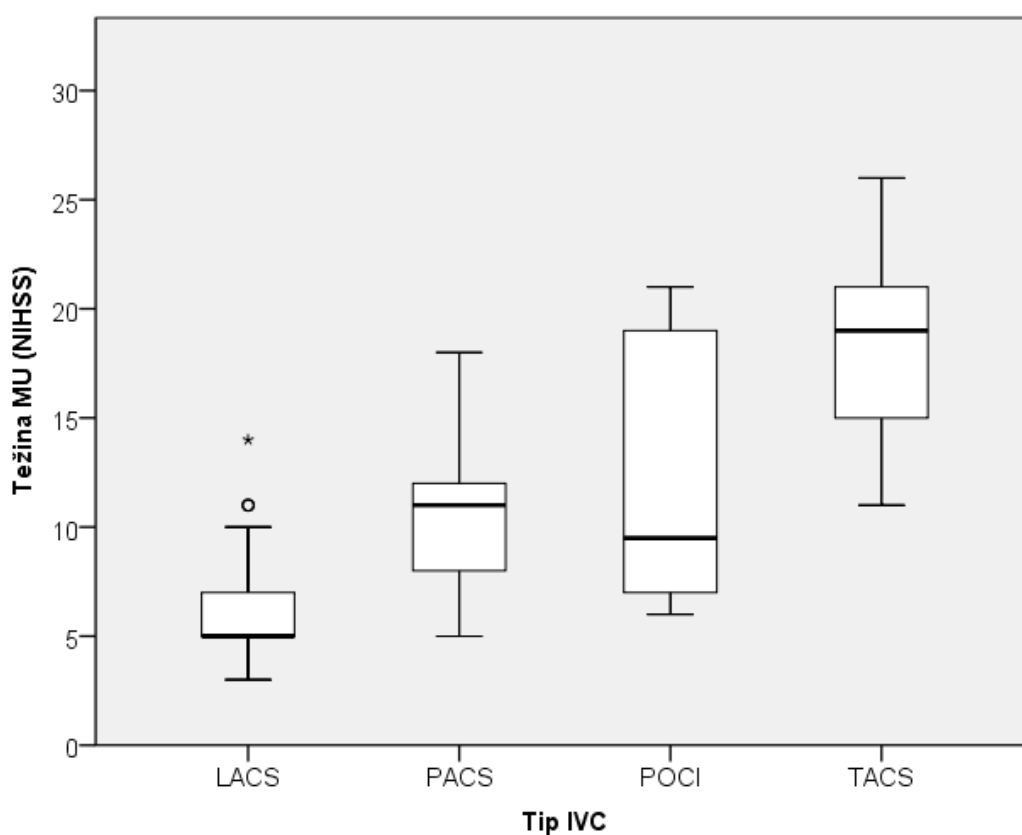


Tablica 14. i Slika 2 . prikazuju međudnose polimorfizma PAI-1 s vrstom MU. Razlike u raspodjeli pojedinih polimorfizama PAI-1 nisu bile statistički značajne iako je sama P vrijednost bila u graničnom rasponu (P=0,084) te bi se s povećanjem broja ispitanika vjerojatno i dobile značajne razlike.

Tablica 15. Odnos težine MU s vrstom MU: Kruskal-Wallisov test

		Tip IVC				P
		N	Medijan	25. centila	75. centila	
Težina MU (NIHSS)	LACS	50	5,0	5,0	7,0	<0,001
	PACS	46	11,0	8,0	12,0	
	POCI	6	9,5	7,0	19,0	
	TACS	30	19,0	15,0	21,0	

Slika 3. Odnos težine MU s vrstom MU



Odnos težine MU s vrstom MU prikazano je u Tablici 15. te Slici 3. Razvidno je da TACS ima značajno veći NIHSS zbroj u odnosu na sve ostale podskupine MU ($P < 0,001$) odnosno LACS ima značajno niži NIHSS zbroj u odnosu na ostale podskupine MU. Jedino nema značajnih razlika između podskupina PACS i POCI ($P = 0,272$).

6. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje pojavnosti polimorfizma promotorske regije gena inhibitor aktivatora plasminogena-1 (PAI-1) u bolesnika s moždanim udarom. U ispitivanu skupinu uključeno je 133 pacijenata koji su imali dijagnozu moždanog udara (MU), dok je u kontrolnoj skupini bilo 27 ispitanika bez dokazanog akutnog MU.

Utvdili smo razliku i značajnost u frekvenciji genotipova i alela polimorfizma 4G/5G, 4G/4G, 5G/5G u ispitanika s MU te utvdili učestalost genotipova i alela u skupini zdravih ispitanika u skladu s dosad objavljenim rezultatima za bijelu rasu. Pojedina zastupljenost genotipova PAI-1 je prikazana u Tablici 1, te grafički na Slici 1. Zastupljenost genotipova PAI-1 nije se značajno razlikovala između ispitivane (4G/4G 25,9%, 4G/5G 33,3%, 5G/5G 40,7%) i kontrolne skupine (4G/4G 24,1%, 4G/5G 41,4%, 5G/5G 34,6%). U radovima provedenima na domaćoj populaciji genotipizacijom naočigled zdravih ispitanika dobivena je učestalost (4G/4G 23,8%, 4G/5G 47,6%, 5G/5G 28,6%) (39) dok se u radu Ristić i suradnici u pacijenata oboljelih od multiple skleroze nalazi učestalost (4G/4G 17,4%, 4G/5G 65,2%, 5G/5G 17,4%) u komparaciji s kontrolnom skupinom (4G/4G 30,7%, 4G/5G 49,5%, 5G/5G 19,8%). Ispitivana skupina bila je značajno starija ($P < 0,001$): medijan dobi iznosio je 84 godine (interkvartilni raspon, IQR: 77,0 – 89,0), dok je u kontrolnoj skupini medijan dobi iznosio 72,0 (IQR: 66,0 – 85,0) godina. Hoekstra i suradnici navodi genotipe 4G/4G gena PAI-1 kao protektivni čimbenik i reducirani rizik za MU kod starijih (45). Hindorff i suradnici navodi 4G/5G kao čimbenik rizika za akutni infarkt miokarda i moždani udar u mladih žena (4G/4G 21,8%, 4G/5G 41,0%, 5G/5G 37,2%) (46).

Značajno je više pušača bilo u kontrolnoj skupini ($P=0,019$). Qureshi i suradnici navode pušenje kao dodatni čimbenik rizika u postmenopauzalnih navodno zdravih žena (104).

Učestalost diabetesa mellitusa (DM) u ispitivanoj skupini bila je više nego dvostruko veća od one u kontrolnoj skupini (38,3% naprema 14,8%; $P=0,019$). Pandolfi i suradnici opisuju pozitivnu linearnu korelaciju između HbA1c i aktivnosti PAI-a u pacijenata s dijabetesom tipa 2. U dijabetičnih pacijenata s regulacijom razine glukoze u krvi dijetom, peroralnim hipoglikemicima ili inzulinom dolazi do snižavanja aktivnosti PAI-1 (105). Henry u svojoj studiji ističe kako je metabolički determinirana PAI-1 aktivnost u plazmi (106). Polimorfizam 4G/5G povezuje se s dijabetesom tipa 2 u općoj populaciji (107 - 110). U pacijentica s gestacijskim dijabetesom uz povećani BMI i trudnoća u starijoj dobi, nalazi se veća učestalost polimorfizma 4G/5G u usporedbi sa zdravim trudnicama (111 - 114). Dokazan je i utjecaj hiperglikemije u pacijenata s akutnim MU u kojih je postignuta reperfuzija trombolizom tPA (115), a povezuje se i dijabetičnom retinopatijom (116 - 118) i kroničnom bubrežnom insuficijencijom (119, 120). Kod sindroma inzulinske rezistencije opisuju se mehanizam više koncentracije fibrinogena i aktivnosti PAI-1 (80, 81, 121). PAI-1 je opisan kao važan čimbenik i u pojavi metaboličkog sindroma gdje visceralna debljina potiče adipocite na sintezu PAI-1 (36, 37, 122, 123). Raniji radovi povezuju lipoproteine s učestalijim cerebrovaskularnim i kardiovaskularnim incidentima. Chen i suradnici navode kako je povišena vrijednost lipida i kolesterola povezana s učestalijom pojavnošću ishemičkog MU, a ne polimorfizam PAI-a te dobivaju vrijednosti (4G/4G 40%, 4G/5G 46,0%, 5G/5G 14%) (24, 124). Naši rezultati prikazuju ispitanike s povišenim vrijednostima

LDLa kao čimbenika koji narušava fibrinolizu i potiče na ekspresiju (56, 57). U našim rezultatima i pored upotrebe statina došlo je do MU. Studije prikazuju upotrebu statina u terapiji kod polimorfizama 4G/5G (125 - 127) a dijetne s manjim unosom masnoća dovode do smanjenja ekspresije PAI-1 (128, 129). PAI-1 je gen kandidat za hipertenziju (130).

Pojavnost pojedinih genotipova različita je u pojedinim rasama: frekvencija alela 4G je veća kod pripadnika bijele rase nego kod Hispanaca i pripadnika crne rase, što je rezultiralo i većom aktivnošću PAI-1 u toj populaciji (131 - 133).

Aktivnost PAI-1 ovisi o spolu – muškarci imaju veću aktivnost od žena (134). Također ovisi i o dobi te tjelesnoj aktivnosti – PAI-1 aktivnost starenjem raste (135).

7. ZAKLJUČCI

U našem kliničkom radu uočena je veća pojavnost 4G/5G polimorfizma promotorske regije inhibitor aktivatora plasminogena-1 (PAI-1) u ispitanika s MU u odnosu prema ispitanicima bez MU. U ispitanika s navedenim polimorfizmom uočena je pojavnost hipertriglicidemije i hiperglikemije te porast C reaktivnog proteina. Djelovanjem mjera primarne prevencije u navedenih ispitanika; regulacijom tjelesne težine, glikemije, povišenih masnoća te upale može se utjecati na pojavnost MU u populacije, a time utjecati i na smanjenje mortaliteta pučanstva u Republici Hrvatskoj.

Ovo istraživanje nastavak je dosadašnjih kliničkih istraživanja u cilju pronalaženja rizičnih čimbenika. U domaćoj literaturi ne opisuje se ovakvo istraživanje te se ono postavlja kao *conditio sine qua non* unaprijeđenja ovog segmenta istraživačkog rada Referentnog Centra za cerebrovaskularne poremećaje Klinike za neurologiju Kliničke bolnice Sestre milosrdnice, jer smatramo da bez postojanja standarda definiranih za navedene polimorfizme ne možemo donositi kompetentne sudove o specifičnim promjenama kod različitih patoloških stanja i procesa u centralnom živčanom sustavu.

8. SAŽETAK

Moždani udar (MU) vodeći je uzrok invaliditeta u modernom društvu. U razvijenim zemljama MU je na drugom mjestu među uzrocima smrtnosti, a u Hrvatskoj vodeći uzrok smrti. Zahvaljujući promjeni načina života, smanjenju rizičnih čimbenika i boljem zbrinjavanju bolesnika s moždanim udarom, incidencija moždanog udara u razvijenim zemljama se smanjila, a mortalitet je reduciran. Ipak, liječenje samog moždanog udara daleko je od zadovoljavajućeg. U zadnjem desetljeću MU konačno je priznat kao hitno stanje u medicini.

Nadalje, liječenje moždanog udara, primarna i sekundarna prevencija te rehabilitacija na specijaliziranim odjelima, pokazali su se kao učinkovite metode. Prošlih godina objavljeno je nekoliko preporuka za liječenje moždanog udara.

Cilj je primarne prevencije smanjiti rizik nastanka moždanog udara u asimptomatskih osoba. Način života i određene bolesti prepoznati su kao čimbenik rizika za nastanak moždanog udara.

Najčešći čimbenici rizika uključuju neadekvatnu prehranu, konzumiranje alkohola, pušenje, smanjenu tjelesnu aktivnost, hipertenziju, šećernu bolest, povišene vrijednosti kolesterola u serumu, infarkt miokarda, fibrilaciju atrijsku i karotidnu stenozu, stres, uzimanje visokih količina oralnih kontraceptiva, polimorfizam 4G/5G kao čimbenik rizika za lakunarni MU, dok se pojavnost 4G/4G spominje kao protektivni faktor u starijih.

Stoga bi genotipizacija polimorfizma 4G/5G mogla biti korisna u prepoznavanju osoba s rizikom za razvoj žilnih bolesti te doziranju bolesnika fibrinolitičkim tvarima, osobito t-PA.

9. SUMMARY

Stroke (MU) is the leading cause of disability in modern society. In developed countries, the MU is in second place among the causes of mortality and in Croatia leading causes of death. Due to changing lifestyles and reducing risk factors, better management of patients with stroke, the incidence of stroke in developed countries declined, and mortality is reduced. Yet the treatment of stroke is far from satisfactory. In the last decade MU is finally recognized as emergency in medicine.

Furthermore, treatment of stroke, primary and secondary prevention and rehabilitation in the specialized departments, have proven to be effective methods. In recent years several recommendations for the treatment of stroke were published. The goal of primary prevention is to reduce the risk of stroke in asymptomatic individuals. Lifestyle and certain diseases have been identified as a risk factor for stroke. The most common risk factors include inadequate diet, alcohol consumption, smoking, reduced physical activity, hypertension, diabetes, elevated cholesterol levels, myocardial infarction, atrial fibrillation and carotid stenosis. Stress, taking high amounts of oral contraceptives, polymorphism 4G/5G as a risk factor for lacunar stroke, while the incidence of 4G/4G mentioned as a protective factor in the elderly. Therefore, the gene polymorphism 4G/5G could be useful in identifying individuals at risk for developing cardiovascular disease, and dosing of patients fibrinolytic agents, like t-PA.

10. LITERATURA

1. Bonita R, Broad JB, Beaglehole R. Changes in stroke incidence and case-fatality in Auckland, New Zealand, 1981-91. *Lancet*. 1993;342(8885):1470-3.
2. Weaver CS, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall FJ, Bath PM. Sample size calculations in acute stroke trials: a systematic review of their reporting, characteristics, and relationship with outcome. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004;35(5):1216-24.
3. Brainin M, Bornstein N, Boysen G, Demarin V. Acute neurological stroke care in Europe: results of the European Stroke Care Inventory. *European journal of neurology*. 2000;7(1):5-10.
4. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet Global health*. 2013;1(5):e259-81.
5. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2011;21(10):718-79.
6. Demarin V. Emerging strategies in the prevention and diagnosis of stroke. *Acta Clinica Croatica*. 1997;36 (Suppl):7-17.
7. Ljubičić M, Kuzman M. Hrvatski zdravstveno statistički ljetopis za 2007. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2009.

8. Kunst AE, Amiri M, Janssen F. The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(8):2126-30.
9. Nesbitt J, Moxham S, Ramadurai G, Williams L. Improving pain assessment and management in stroke patients. *BMJ quality improvement reports*. 2015;4(1).
10. Keir SL, Wardlaw JM, Warlow CP. Stroke epidemiology studies have underestimated the frequency of intracerebral haemorrhage. A systematic review of imaging in epidemiological studies. *Journal of neurology*. 2002;249(9):1226-31.
11. Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1998;352 Suppl 3:SIII1-4.
12. Breitenfeld T, Vargek-Solter V, Supanc V, Roje-Bedekovic M, Demarin V. Stroke unit-where all stroke patients should be treated. *Acta Clin Croat*. 2009;48(3):341-4.
13. Demarin V, Vukovic V, Azman D. Management of stroke in central and east Europe. *Acta neuropsychiatrica*. 2009;21 Suppl 2:70-1.
14. Supanc V, Vargek-Solter V, Basic-Kes V, Breitenfeld T, Ramic S, Zavoreo I, et al. The evaluation of the stroke unit in Croatia at the University Hospital Sestre milosrdnice, Zagreb: 1995-2006 experience. *Collegium antropologicum*. 2009;33(4):1233-8.
15. Paolucci S, Martinuzzi A, Scivoletto G, Smania N, Solaro C, Aprile I, et al. Assessing and treating pain associated with stroke, multiple sclerosis, cerebral palsy, spinal cord injury and spasticity. Evidence and recommendations from the Italian Consensus conference on Pain in

Neurorehabilitation. European journal of physical and rehabilitation medicine. 2016.

16. Basic Kes V, Zavoreo I, Vargek-Solter V, Aleksic Shihabi A, Bencina B, Bozic J, et al. Quantitative and qualitative evaluation tool in planning stroke treatment strategies: the "Safe implementation of treatments in stroke Monitoring Study (SITS MOST)" registry. Acta neurologica Belgica. 2014;114(2):95-106.

17. Lenti L, Brainin M, Titianova E, Morovic S, Demarin V, Kalvach P, et al. Stroke care in Central Eastern Europe: current problems and call for action. International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society. 2013;8(5):365-71.

18. Demarin V. Stroke a challenge in the diagnosis and therapy. Acta medica Croatica : časopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti. 2001;55(4-5):145-8.

19. Ding S, Zhang M, Zhao Y, Chen W, Yao G, Zhang C, et al. The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke. The American journal of the medical sciences. 2008;336(1):27-31.

20. Poorthuis MH, Algra AM, Algra A, Kappelle LJ, Klijn CJ. Female- and Male-Specific Risk Factors for Stroke: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA neurology. 2016.

21. Guerra F, Scappini L, Maolo A, Campo G, Pavasini R, Shkoza M, et al. CHA2DS2-VASc risk factors as predictors of stroke after acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. European heart journal Acute cardiovascular care. 2016.

22. Zhong W, Geng N, Wang P, Li Z, Cao L. Prevalence, causes and risk factors of hospital readmissions after acute stroke and transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2016;37(8):1195-202.
23. Valtorta NK, Kanaan M, Gilbody S, Ronzi S, Hanratty B. Loneliness and social isolation as risk factors for coronary heart disease and stroke: systematic review and meta-analysis of longitudinal observational studies. *Heart*. 2016;102(13):1009-16.
24. Chen X, Zhou L, Zhang Y, Yi D, Liu L, Rao W, et al. Risk factors of stroke in Western and Asian countries: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC public health*. 2014;14:776.
25. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation*. 2000;101(1):67-70.
26. Madach K, Aladzsiy I, Szilagyi A, Fust G, Gal J, Penzes I, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Critical care*. 2010;14(2):R79.
27. Rosand J, Altshuler D. Human genome sequence variation and the search for genes influencing stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003;34(10):2512-6.

28. Meschia JF. Addressing the heterogeneity of the ischemic stroke phenotype in human genetics research. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33(12):2770-4.
29. Hegele RA, Dichgans M. Advances in stroke 2009: update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2009. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010;41(2):e63-6.
30. Alberts MJ, Tournier-Lasserre E. Update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2004. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(2):179-81.
31. Jood K, Ladenvall P, Tjarnlund-Wolf A, Ladenvall C, Andersson M, Nilsson S, et al. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(10):2077-81.
32. Pop TR, Vesa SC, Trifa AP, Crisan S, Buzoianu AD. PAI-1 4G/5G and MTHFR C677T polymorphisms increased the accuracy of two prediction scores for the risk of acute lower extremity deep vein thrombosis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2014;55(1):153-7.
33. Zhang C, Li J, Li L, Luo B. [The study of PAI-1 promotor region gene polymorphism in cerebrovascular disease]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 2001;18(5):383-7.
34. Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thrombosis and haemostasis*. 1997;77(4):730-4.

35. Takada A, Takada Y, Urano T, Sakakibara K, Shozuhara H, Toyama K. Changes in plasma levels of t-PA, PAI-1 and t-PA-PAI-1 complex in patients with cerebrovascular thrombosis infused with t-PA. *Thrombosis research*. 1990;59(2):375-81.
36. Lasic D, Uglesic B, Vujnovic Z, Krnic S. PAI-1 as a component of the metabolic syndrome in depression and schizophrenia - Croatian experience. *Psychiatria Danubina*. 2015;27(1):71-2.
37. Lopez-Legarrea P, Mansego ML, Zulet MA, Martinez JA. SERPINE1, PAI-1 protein coding gene, methylation levels and epigenetic relationships with adiposity changes in obese subjects with metabolic syndrome features under dietary restriction. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2013;53(3):139-44.
38. Sales MF, Soter MO, Candido AL, Fernandes AP, Oliveira FR, Ferreira AC, et al. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G polymorphism and metabolic/proinflammatory factors in polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2013;29(10):936-9.
39. Begonja A ŠA, Štefanović M, Topić E. PCR-SSCP genotipizacija polimorfizma 4G/5G inhibitora-1 aktivatora plazminogena. *Biochemia Medica*. 2002;12:1-2.
40. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*. 1991;19(19):5444.

41. Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(10):2200-7.
42. Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola A, Rubiera M, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Cuadrado E, et al. PAI-1 4G/5G polymorphism is associated with brain vessel reocclusion after successful fibrinolytic therapy in ischemic stroke patients. *The International journal of neuroscience*. 2010;120(4):245-51.
43. Attia J, Thakkinstian A, Wang Y, Lincz L, Parsons M, Sturm J, et al. The PAI-1 4G/5G gene polymorphism and ischemic stroke: an association study and meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2007;16(4):173-9.
44. Golomb MR, Heiny M, Garg BP. Two cousins with neonatal stroke, PAI-1 4G variant and MTHFR A1298C mutation. *Journal of child neurology*. 2007;22(6):753-5.
45. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003;34(12):2822-8.
46. Hindorff LA, Schwartz SM, Siscovick DS, Psaty BM, Longstreth WT, Jr., Reiner AP. The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *Journal of cardiovascular risk*. 2002;9(2):131-7.
47. Endler G, Lalouschek W, Exner M, Mitterbauer G, Haring D, Mannhalter C. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promotor region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients

with minor stroke than in controls. *British journal of haematology*. 2000;110(2):469-71.

48. Sacco RL, Foulkes MA, Mohr JP, Wolf PA, Hier DB, Price TR. Determinants of early recurrence of cerebral infarction. The Stroke Data Bank. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1989;20(8):983-9.

49. Tan RY, Markus HS. CADASIL: Migraine, Encephalopathy, Stroke and Their Inter-Relationships. *PloS one*. 2016;11(6):e0157613.

50. Choi JC, Song SK, Lee JS, Kang SY, Kang JH. Diversity of stroke presentation in CADASIL: study from patients harboring the predominant NOTCH3 mutation R544C. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2013;22(2):126-31.

51. Dichgans M. CADASIL: a monogenic condition causing stroke and subcortical vascular dementia. *Cerebrovascular diseases*. 2002;13 Suppl 2:37-41.

52. Vikelis M, Papatriantafyllou J, Karageorgiou CE. A novel CADASIL-causing mutation in a stroke patient. *Swiss medical weekly*. 2007;137(21-22):323-5.

53. Haffner C, Vinters HV. CADASIL, CARASIL, CARASAL: The linguistic subtleties of cerebral small vessel disease. *Neurology*. 2016;87(17):1752-3.

54. Arima K, Yanagawa S, Ito N, Ikeda S. Cerebral arterial pathology of CADASIL and CARASIL (Maeda syndrome). *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2003;23(4):327-34.

55. Ito S, Takao M, Fukutake T, Hatsuta H, Funabe S, Ito N, et al. Histopathologic Analysis of Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL): A Report of a New

Genetically Confirmed Case and Comparison to 2 Previous Cases. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2016.

56. Sharma A, Soneji N, Farah G. Clinical and angiographic findings in Moya Moya. *The American journal of case reports*. 2014;15:147-51.

57. Somarajan A, Ashalatha R, Syam K. Moya Moya disease : an unusual clinical presentation. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2005;53:49-51.

58. Feldt-Rasmussen U. Fabry disease and early stroke. *Stroke research and treatment*. 2011;2011:615218.

59. Kikumoto Y, Kai Y, Morinaga H, Iga-Murahashi M, Matsuyama M, Sasaki T, et al. Fabry disease exhibiting recurrent stroke and persistent inflammation. *Internal medicine*. 2010;49(20):2247-52.

60. Lidove O, Chauveheid MP, Caillaud C, Froissart R, Benoist L, Alamowitch S, et al. Aseptic meningitis and ischaemic stroke in Fabry disease. *International journal of clinical practice*. 2009;63(11):1663-7.

61. Politei JM. Can we use statins to prevent stroke in Fabry disease? *Journal of inherited metabolic disease*. 2009;32(4):481-7.

62. Dowling MM, Kirkham FJ. Stroke in sickle cell anaemia is more than stenosis and thrombosis: the role of anaemia and hyperemia in ischaemia. *British journal of haematology*. 2016.

63. Dowling MM, Quinn CT, Ramaciotti C, Kanter J, Osunkwo I, Inusa B, et al. Increased prevalence of potential right-to-left shunting in children with sickle cell anaemia and stroke. *British journal of haematology*. 2016.

64. Muntz DS, Bundy DG, Strouse JJ. Personalized Reminders Increase Screening for Stroke Risk in Children with Sickle Cell Anemia. *Southern medical journal*. 2016;109(9):506-10.
65. Ding R, Lin S, Chen D. The association of cystathionine beta synthase (CBS) T833C polymorphism and the risk of stroke: a meta-analysis. *Journal of the neurological sciences*. 2012;312(1-2):26-30.
66. Sirachainan N, Sasanakul W, Visudtibhan A, Tapanapruksakul P, Charoenkwan P, Kadegasem P, et al. The effect of polymorphisms of MTHFR C677T, A1298C, MS A2756G and CBS 844ins68bp on plasma total homocysteine level and the risk of ischemic stroke in Thai children. *Thrombosis research*. 2008;122(1):33-7.
67. Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, Negrini R, Bani P, Albertini A, et al. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33(3):664-9.
68. Finsterer J, Wakil SM. Stroke-like episodes, peri-episodic seizures, and MELAS mutations. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2016;20(6):824-9.
69. Finsterer J, Barton P. Regression of stroke-like lesions in MELAS-syndrome after seizure control. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. 2010;12(4):330-4.
70. Farrar MA, Lin CS, Krishnan AV, Park SB, Andrews PI, Kiernan MC. Acute, reversible axonal energy failure during stroke-like episodes in MELAS. *Pediatrics*. 2010;126(3):e734-9.

71. Chanson JB, Mohr M, Tranchant C, Echaniz-Laguna A. MELAS as a cause of stroke in the elderly. *Revue neurologique*. 2009;165(11):990-2.
72. Chembala J, Natarajan I, Roffe C. Thrombolysis in a stroke patient with Marfan syndrome. *JRSM short reports*. 2012;3(4):22.
73. Souirti Z, Boujraf S, Charai N, Chtaou N, Belahsen F, Messouak O, et al. Infectious endocarditis complicated by an ischemic stroke and revealing Marfan syndrome. *Journal of cardiovascular disease research*. 2011;2(2):127-9.
74. Lv W, Lin Y, Song W, Sun K, Yu H, Zhang Y, et al. Variants of COL3A1 are associated with the risk of stroke recurrence and prognosis in the Chinese population: a prospective study. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2014;53(2):196-203.
75. Omori T, Kawagoe M, Moriyama M, Yasuda T, Ito Y, Hyakuta T, et al. Multifactorial analysis of factors affecting recurrence of stroke in Japan. *Asia-Pacific journal of public health*. 2015;27(2):NP333-40.
76. Barili F, Dainese L, Polvani G, Biglioli P. Multifactorial bases of stroke after cardiac surgery. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38(4):1140; author reply 1.
77. Lees KR. Multifactorial approach to stroke investigation and prevention. *Lancet*. 1998;352(9132):923-4.
78. Lai SM, Alter M, Friday G, Sobel E. A multifactorial analysis of risk factors for recurrence of ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994;25(5):958-62.
79. Van Goor ML, Gomez Garcia E, Leebeek F, Brouwers GJ, Koudstaal P, Dippel D. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter

polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;93(1):92-6.

80. de la Cruz-Mosso U, Munoz-Valle JF, Salgado-Bernabe AB, Castro-Alarcon N, Salgado-Goytia L, Sanchez-Corona J, et al. Body adiposity but not insulin resistance is associated with -675 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene in a sample of Mexican children. *Jornal de pediatria*. 2013;89(5):492-8.

81. Ardigo D, Franzini L, Valtuena S, Numeroso F, Piatti PM, Monti L, et al. The increase in plasma PAI-1 associated with insulin resistance may be mediated by the presence of hepatic steatosis. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):240-5.

82. Di Minno MN, Palmieri V, Lombardi G, Pezzullo S, Cirillo F, Di Somma C, et al. Lack of change in insulin levels as a biological marker of PAI-1 lowering in GH-deficient adults on r-HGH replacement therapy. *Thrombosis research*. 2009;124(6):711-3.

83. Lopez-Bermejo A, Casano-Sancho P, Petry CJ, Jaramillo AM, Rodriguez-Gonzalez FX, Dunger DB, et al. Insulin resistance after precocious pubarche: relation to PAI-1-675 4G/5G polymorphism, and opposing influences of prenatal and postnatal weight gain. *Clinical endocrinology*. 2007;67(4):493-9.

84. Sobel BE, Schneider DJ, Lee YH, Pratley RE. Insulin resistance increases PAI-1 in the heart. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(1):102-7.

85. Huang X, Li Y, Huang Z, Wang C, Xu Z. Pai-1 gene variants and COC use are associated with stroke risk: a case-control study in the Han Chinese women. *Journal of molecular neuroscience* : MN. 2014;54(4):803-10.

86. Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ. Intramural plasminogen activator inhibitor type-1 and coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(11):1979-89.
87. Wiklund PG, Nilsson L, Ardnor SN, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(8):1661-5.
88. Takayama Y, Hattori N, Hamada H, Masuda T, Omori K, Akita S, et al. Inhibition of PAI-1 Limits Tumor Angiogenesis Regardless of Angiogenic Stimuli in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer research*. 2016;76(11):3285-94.
89. Saadoun H, Lamy PJ, Thezenas S, Pouderoux S, Bibeau F, Montels F, et al. Prognostic impact of the inclusion of uPA/PAI-1 tumor levels in the current adjuvant treatment decision-making for early breast cancer. *Future oncology*. 2014;10(2):195-209.
90. Allott EH, Morine MJ, Lysaght J, McGarrigle SA, Donohoe CL, Reynolds JV, et al. Elevated Tumor Expression of PAI-1 and SNAI2 in Obese Esophageal Adenocarcinoma Patients and Impact on Prognosis. *Clinical and translational gastroenterology*. 2012;3:e12.
91. Xu X, Xie Y, Lin Y, Xu X, Zhu Y, Mao Y, et al. PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism (rs1799768) contributes to tumor susceptibility: Evidence from meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;4(6):1127-33.
92. Bajou K. [Role of PAI-1 plasminogen activator inhibitor in tumor invasion and angiogenesis]. *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*. 2002;157(5-6):313-8.

93. Castello R, Espana F, Vazquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thrombosis research*. 2006;117(5):487-92.
94. Dublin E, Hanby A, Patel NK, Liebman R, Barnes D. Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *The American journal of pathology*. 2000;157(4):1219-27.
95. Hildenbrand R, Schaaf A, Dorn-Beineke A, Allgayer H, Sutterlin M, Marx A, et al. Tumor stroma is the predominant uPA-, uPAR-, PAI-1-expressing tissue in human breast cancer: prognostic impact. *Histology and histopathology*. 2009;24(7):869-77.
96. Van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Kluft C, Grobbee DE. The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1. *Blood*. 2003;101(5):1841-4.
97. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(1):20-6.
98. Nilsson L, Gafvels M, Musakka L, Ensler K, Strickland DK, Angelin B, et al. VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor. *Journal of lipid research*. 1999;40(5):913-9.
99. Grenett HE, Benza RL, Fless GM, Li XN, Davis GC, Booyse FM. Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 gene by insulin,

hypertriglyceridemic VLDL, and Lp(a) in transfected, cultured human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(11):1803-9.

100. Grenett HE, Khan N, Jiang W, Booyse FM. Identification of the Hind III polymorphic site in the PAI-1 gene: analysis of the PAI-1 Hind III polymorphism by PCR. *Genetic testing*. 2000;4(1):65-8.

101. Nordstrom T, Ronaghi M, Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R, Nyren P. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2000;31 (Pt 2):107-12.

102. To KY, Liu CI, Liu ST, Chang YS. Detection of point mutations in the chloroplast genome by single-stranded conformation polymorphism analysis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1993;3(1):183-6.

103. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology*. 2009;169(4):505-14.

104. Qureshi AI, Suri MF, Kirmani JF, Divani AA. Cigarette smoking among spouses: another risk factor for stroke in women. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(9):e74-6.

105. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(8):1378-82.

106. Henry M, Tregouet DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, et al. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family

study with part of the Stanislas Cohort. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(1):84-91.

107. Leipold H, Knoefler M, Gruber C, Klein K, Haslinger P, Worda C. Plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphism and gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and gynecology*. 2006;107(3):651-6.

108. Meigs JB, Dupuis J, Liu C, O'Donnell CJ, Fox CS, Kathiresan S, et al. PAI-1 Gene 4G/5G polymorphism and risk of type 2 diabetes in a population-based sample. *Obesity*. 2006;14(5):753-8.

109. Nagi DK, McCormack LJ, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Knowler WC, Grant PJ. Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of PAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1997;20(8):1304-9.

110. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, et al. Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes. *BMC medical genetics*. 2010;11:52.

111. Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism in women with pre-eclampsia. *Genetic testing*. 2003;7(3):265-8.

112. Manderson JG, Mullan B, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI, McCance DR. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia*. 2002;45(7):991-6.

113. Astedt B, Lindoff C. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in plasma of premature and term newborns. *Acta paediatrica*. 1997;86(1):111-3.

114. Estelles A, Gilabert J, Andres C, Espana F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thrombosis and haemostasis*. 1990;64(2):281-5.
115. Chapman MP, Moore EE, Moore HB, Gonzalez E, Gamboni F, Chandler JG, et al. Overwhelming tPA release, not PAI-1 degradation, is responsible for hyperfibrinolysis in severely injured trauma patients. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2016;80(1):16-23; discussion -5.
116. Saleem S, Azam A, Maqsood SI, Muslim I, Bashir S, Fazal N, et al. Role of ACE and PAI-1 Polymorphisms in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. *PloS one*. 2015;10(12):e0144557.
117. Azad N, Agrawal L, Emanuele NV, Klein R, Bahn GD, McCarren M, et al. Association of PAI-1 and fibrinogen with diabetic retinopathy in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes care*. 2014;37(2):501-6.
118. Basu A, Menicucci G, Maestas J, Das A, McGuire P. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) facilitates retinal angiogenesis in a model of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(10):4974-81.
119. Piatkowska M, Kotschy M, Nartowicz E, Rajewski W. [Tissue plasminogen activator antigen (t-PA Ag) and tissue plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in the course of hemodialysis in patients with chronic renal failure]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 1997;2(9):205-7.
120. De Cosmo S, Margaglione M, Tassi V, Garrubba M, Thomas S, Olivetti C, et al. ACE, PAI-1, decorin and Werner helicase genes are not associated

with the development of renal disease in European patients with type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 1999;15(4):247-53.

121. Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. *Annals of medicine*. 2000;32 Suppl 1:78-84.

122. De la Cruz-Mosso U, Munoz-Valle JF, Salgado-Goytia L, Garcia-Carreon A, Illades-Aguilar B, Castaneda-Saucedo E, et al. Relationship of metabolic syndrome and its components with -844 G/A and HindIII C/G PAI-1 gene polymorphisms in Mexican children. *BMC pediatrics*. 2012;12:41.

123. Coffey CS, Asselbergs FW, Hebert PR, Hillege HL, Li Q, Moore JH, et al. The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels. *Cardiology research and practice*. 2011;2011:541467.

124. Chen CH, Eng HL, Chang CJ, Tsai TT, Lai ML, Chen HY, et al. 4G/5G promoter polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1, lipid profiles, and ischemic stroke. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2003;142(2):100-5.

125. Gettins PG, Dolmer K. The High Affinity Binding Site on Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) for the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP1) Is Composed of Four Basic Residues. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(2):800-12.

126. Di Y, Liu Z, Tian J, Zong Y, Yang P, Qu S. TFPI or uPA-PAI-1 complex affect cell function through expression variation of type II very low density lipoprotein receptor. *FEBS letters*. 2010;584(15):3469-73.

127. Marcucci R, Brogi D, Sofi F, Giglioli C, Valente S, Liotta AA, et al. PAI-1 and homocysteine, but not lipoprotein (a) and thrombophilic polymorphisms, are

independently associated with the occurrence of major adverse cardiac events after successful coronary stenting. *Heart*. 2006;92(3):377-81.

128. Claro F, Jr., Morari J, Moreira LR, Sarian LO, Pinto GA, Velloso LA, et al. Unmanipulated native fat exposed to high-energy diet, but not autologous grafted fat by itself, may lead to overexpression of Ki67 and PAI-1. *SpringerPlus*. 2015;4:279.

129. Kudo T, Nakayama E, Suzuki S, Akiyama M, Shibata S. Cholesterol diet enhances daily rhythm of Pai-1 mRNA in the mouse liver. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;287(4):E644-51.

130. Tiryaki O, Buyukhatipoglu H, Usalan C. Plasma plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and P-selectin levels in urgent hypertension: effect of single dose captopril and nifedipine on fibrinolytic activity. *Clinical and experimental hypertension*. 2010;32(6):347-51.

131. Garcia-Gonzalez IJ, Valle Y, Sandoval-Pinto E, Valdes-Alvarado E, Valdez-Haro A, Munoz-Valle JF, et al. The -844 G>A PAI-1 polymorphism is associated with acute coronary syndrome in Mexican population. *Disease markers*. 2015;2015:460974.

132. Penrod NM, Poku KA, Vaughan DE, Asselbergs FW, Brown NJ, Moore JH, et al. Epistatic interactions in genetic regulation of t-PA and PAI-1 levels in a Ghanaian population. *PloS one*. 2011;6(1):e16639.

133. Lu Y, Wang M, Liu Z, Wang F, Da Y, Jia J. No association between the promoter polymorphisms of PAI-1 gene and sporadic Alzheimer's disease in Chinese Han population. *Neuroscience letters*. 2009;455(2):97-100.

134. Schoenhard JA, Asselbergs FW, Poku KA, Stocki SA, Gordon S, Vaughan DE, et al. Male-female differences in the genetic regulation of t-PA

and PAI-1 levels in a Ghanaian population. *Human genetics*. 2008;124(5):479-88.

135. Francis RM, Romeyn CL, Coughlin AM, Nagelkirk PR, Womack CJ, Lemmer JT. Age and aerobic training status effects on plasma and skeletal muscle tPA and PAI-1. *European journal of applied physiology*. 2014;114(6):1229-38.

11. ŽIVOTOPIS

Prim. Ervin Jančić, Primarijus, doktor medicine, specijalist neurolog, uži specijalist intenzivne medicine na Odjelu za živčane bolesti Opće bolnice Karlovac. Oženjen, otac dvoje djece, Lovro (2001), Lucija (2005), supruga Ivana mr.ph.

Obrazovanje

2014. – Primarijus

2010. – 2012. – uža specijalizacija (dvije godine) – Intenzivna medicina

2008. – 2009. poslijediplomska stručna edukacija "Odgovorna uprava i rukovođenje zdravljem"

2004. – 2005. poslijediplomska stručna edukacija iz neurofizioloških tehnika: Evocirani potencijali i Elektromioneurografija

2000. – 2004. (četiri godine) specijalizacija iz Kliničke neurologije

2002. – 2004. (dva semestra) stručni poslijediplomski studij "Klinička neurologija", Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2000. – 2001. (dva semestra) doktorski znanstveni studij "Biomedicina" Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

1999. – 2000. Pedagoška grupa predmeta (pedagogija, metodika, psihologija i didaktika), Filozofski fakultet u Zagrebu, Pedagoške znanosti, Sveučilište u Zagrebu

1997. – 1999. (četiri semestra) poslijediplomski studij "Biomedicina" i "Opća kirurgija" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

1990. – 1996. dodiplomski studij opće medicine Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Ostale aktivnosti

– u izbor za nastavnika u naslovno zvanje predavača za područje: biomedicina i zdravstvo (3.), polje: kliničke medicinske znanosti (3.02.), grana: neurologija (3.02.30.), Sveučilište u Karlovcu, Studij sestrinstva (2010.)

– asistent, izabran u suradničko zvanje, znanstveno područje biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje temeljne medicinske znanosti, na Katedri za društvene znanosti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, s nepunim radnim vremenom od 01.10.2008. do 31.12.2009.

– imenovani sudski vještak medicinske struke Županijskog suda u Karlovcu (2004. 2009. 2014...)

– predavač u srednjoj medicinskoj školi stručnog predmeta Neurologija (2004. - 2010, 2013. - 2015.)

– objavio kao prvi autor poglavlje u sveučilišnom udžbeniku

– koautor dva poglavlja u sveučilišnom udžbeniku

– nekoliko radova u CC, SCI, Index Medicus i ostalim indeksiranim časopisima

– sudjelovanje na međunarodnim kongresima s prihvaćenim radovima

– sudjelovanje na nacionalnim kongresima s prihvaćenim radovima

Radno iskustvo

- 2014. – Primarijus, specijalist neurolog, uži specijalist intenzivne medicine u Službi za živčane bolesti Opće bolnice Karlovac
- 2012. – specijalist neurolog, uži specijalist intenzivne medicine u Službi za živčane bolesti Opće bolnice Karlovac
- 2004. – specijalist neurolog u Službi za živčane bolesti Opće bolnice Karlovac
- 2000. – 2004. specijalizacija iz Kliničke neurologija Klinička bolnica Sestre milosrdnice Zagreb
- 1999. – 2000. liječnik u Službi Hitne medicinske pomoći, Doma zdravlja Karlovac
- 1997. – 1998. obvezni staž u Općoj bolnici Karlovac
- 1991. – 1995. sudjelovanje u Domovinskom ratu u funkciji od bolničara u satniji do načelnika zdravstvene službe 110. brigade HV-a

Reference:

Belavić M, Jančić E, Mišković P, Brozović-Krijan A, Bakota B, Žunić J. Secondary stroke in patients with polytrauma and traumatic brain injury treated in an Intensive Care Unit, Karlovac General Hospital. *Injury* 2015.

Bauer V, Alerić A, Jančić E, Knežević B, Prpić D, Kačavenda A. Subjective and perceptual analysis of voice quality and relationship with neurological dysfunction in multiple sclerosis patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2013;115: 17-20.

Bauer V, Alerić Z, Jančić E, Miholović V. Voice Quality in Parkinson's disease in the Croatian language speakers. *Collegium antropologicum* 2011;35 (2):209-212.

Jančić E, Cvitanović H, Miholović V, Kralj D, Hranilović B: Epidemiology of central nervous system tumors in Karlovac area (Croatia), 1995-2010. *Collegium antropologicum* 2011;35 (2):331-333.

Sorta-Bilajac I, Baždarić K, Brkljačić Žagrović M, Jančić E, Brozović B, Čengić B, Čorluka S, George J Agich; How nurses and physicians face ethical dilemmas - the Croatian experience. *Nursing Ethics* 2011;18(3):341-355.

Cvitanović H, Knezević E, Kuljanac I, Jančić E; Skin disease in a geriatric patients group in outpatient dermatologic clinic Karlovac, Croatia. *Collegium antropologicum* 2010;34 (2):247-251.

Cvitanović H, Jančić E, Knežević E, Kuljanac. Satisfaction of patients with healthcare quality in Outpatients dermatology clinic Karlovac, Croatia. *Medicina* 2011;47(1):82-90.

Cvitanović H, Jančić E, Cvitanović V, Vukić V; War health care system in Karlovac area during war in Croatia 1991-1995. *AMHA - Acta Medico-Historica Adriatica* 2010;8(1):119-134.

Cvitanović H, Jančić E, Knežević E, Kuljanac I. Skin changes in patients with diabetes mellitus in Karlovac county. *Medicina* 2009;45(4):370-388.

Jančić E, Katić-Bubaš J, Bradić N, Neuroethics. *Medicina* 2008;44(2):186-190.

Bradić N, Cuculić D, Jančić E; Terrorism in Croatia. *Prehospital and Disaster Medicine* 2003;18(2) 88-91.

Bauer V, Aleric Z, Jancic E. Comparing Voice Self-Assessment with Auditory Perceptual Analysis in Patient with Multiple Sclerosis. *International Archives Otorhinolaryngology* 2014;12:20.

Laginja S, Šeremet J, Štiglic D, Jančić E. Can Non-Adhesive Short Stretch Bandages Change a Life? *Coll. Antropol* 2014; 38 (8):1121-1133.

Šeremet J, Laginja S, Radović E, Mužić V, Jančić E. Impact of Adolescents Awareness on perception of Sexually Transmitted Infections. Coll. Antropolopol 2014; 38(8)2014.

Hranilović B, Jančić E. Potential Years of Life Lost Due to Premature Mortality from Cancer in Karlovac County (Croatia) 2006-2010. Coll. Antropolopol 2014;38 (8):1229-1232.

Cvitanović H, Jančić E. Influence of Stressful Life Events on Coping in Psoriasis. Coll. Antropolopol 2014;38(8):1237-1240.

Bauer V, Alerić Z, Jančić E, Bujas T; Rare tumors of the neuroectodermal origin report five cases. International Journal of Head and Neck Surgery 2012; 3(2): 108-111.

Alerić Z, Bauer V, Jančić E; Surgical Procedures in the First Five Years of the Otorhinolaryngology Department in General Hospital Karlovac. Acta Med Carolostadi 2013; 1: 7-10.

Cvitanović H, Jančić E, Cvitanović V, Vukić V: Organization and Military Medical Doctrine in Karlovac County, Croatia. MCIF. 2013.

Bradić N, Jančić E. Prehospital Treatment of the Arrhythmias – The Role of Amiodarone. Annals of Emergency Medicine 2000. 35(5):S69-70.

Marčinko D., Filipčić I., Karničnik S., Jančić E., Hotujac Lj. Spontane diskinezije u shizofreniji. Socijalna psihijatrija 2002;30: 3-6.

Poglavlje u knjigama

Cvitanović V, Cvitanović H, Jančić E, Žunić J, Strikić N, Medved I. Medicinski centar Karlovac u Domovinckom ratu, 248-259. U Hebrang A i sur.(ur) Hrvatski sanitet tijekom srpsko-crnogorske agresije na Republiku Hrvatsku 1990—1995. Zagreb : Medicinska naklada, 2015.

Žunić, I. Gunjača, E. Jančić, A. Žilić J. Liječenje bolesnika podmakle životne dobi u JIL-u, 1147-1157 U: Jukić M, Gašparović V, Husedžinović I, Majerić Kogler V, Perić M, Žunić J (ur). Intenzivna Medicina. Medicinska naklada, Zagreb 2008.

Jančić E, Žunić J. Osnovni principi neurološke intenzivne skrbi. U: Jukić M, Gašparović V, Husedžinović I, Majerić Kogler V, Perić M, Žunić J (ur). Intenzivna Medicina. Medicinska naklada, Zagreb 2008.

Župan Ž, Antončić I, Jančić E, Žunić J. Nadzor funkcije živčanog sustava tijekom intenzivnog liječenja bolesnika. 282-292. U: Jukić M, Gašparović V, Husedžinović I, Majerić Kogler V, Perić M, Žunić J (ur). Intenzivna Medicina. Medicinska naklada, Zagreb 2008.

12. PRILOZI

BARTHELOV INDEKS

Ime i prezime: _____

Datum i godina rođenja: _____

Datum popunjavanja Barthelovog indexa: _____

Osobna njega

0 - Ovisnost o pomoći druge osobe

5 - Neovisnost (umivanje, pranje zuba, češljanje, brijanje) uz prilagođeni češalj, brijlač ili slično

Kupanje

0 - Ovisnost

5 - Neovisnost

Hranjenje

0 - Ovisnost

5 - Potrebna pomoć za rezanje, mazanje na kruh i sl.

Oblačenje

0 - Ovisnost

5 - Potrebna određena pomoć ali većinu može sam/a

10 - Neovisnost (uključujući kopčanje gumba, patentnog zatvarača, vezica)

Premještanje (postelja – invalidska kolica – okretanje u postelji)

- 0 – Ovisnost, bez ravnoteže za sjedenje
- 5 – Znatna pomoć (jedna ili dvije osobe fizički) za posjedanje
- 10 – Mala fizička pomoć
- 15 – Neovisnost

Pokretljivost u invalidskim kolicima

- 0 – Nemogućnost upravljanja ni elektromotornim kolicima
- 5 – Pokretljivost u elektromotornim invalidskim kolicima
- 10 – Pokretljivost u invalidskim kolicima

Pokretljivost (u istom nivou)

- 0 – Nepokretnost u razdaljini manjoj od 50 metara
- 5 – Neovisnost u invalidskim kolicima u razdaljini većoj od 50 metara
- 10 – Hodanje uz pomoć jedne osobe u razdaljini većoj od 50 metara
- 15 – Neovisnost (ali uz uporabu pomagala, npr. uz štap) više od 50 metara

Kretanje po stubama

- 0 – Ovisnost
- 5 – Potrebna pomoć (fizička, pomagala za nošenje)
- 10 – Neovisnost

Korištenje WC-a

- 0 – Ovisnost
- 5 – Potrebna određena pomoć
- 10 – Neovisnost (u skidanju i oblačenju, brisanju)

Kontrola stolice

- 0 – Inkontinentnost (treba klizmu, supozitorij i slično)
- 5 – Povremene nezgode zbog inkontinencije
- 10 – Neovisnost

Kontrola mjehura

0 – Inkontinentnost ili kateteriziranje i nemogućnost samostalnog obavljanja kateterizacije /aplikacije urinara

5 – Povremene nezgode zbog inkontinencije

10 – Neovisnost

UKUPNO _____