

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Sveučilište u Dubrovniku**

**Institut Ruđer Bošković u Zagrebu**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**

**Molekularne bioznanosti**

**Tatjana Kereš**

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA  
METILENTETRAHIDROFOLAT REDUKTAZU I SUSTAVA  
ABO S RIZIKOM NASTANKA PLUĆNE EMBOLIJE**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2022.**

Doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za hitnu i intenzivnu medicinu i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu i Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. Disertacija je rađena pod mentorstvom doc. dr. sc. Irene Jukić i doc. dr. sc. Paška Konjevode.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni

studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

### POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA METILENTETRAHIDROFOLAT REDUKTAZU I SUSTAVA ABO S RIZIKOM NASTANKA PLUĆNE EMBOLIJE

Tatjana Kereš

**Disertacija je izrađena u:** Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu i Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu, Hrvatska

**Mentori:** 1: doc. dr. sc. Irena Jukić, dr. med., viša znanstvena suradnica

2: doc. dr. sc. Paško Konjevoda, dr. med., viši znanstveni suradnik

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Nasljedni i stečeni čimbenici rizika utječu na pojavnost i ishod plućne embolije. Dva polimorfizma u genu *MTHFR*, *rs1801133* i *rs1801131*, i specifični genotip *ABO* ne utječu na pojavnost ove bolesti. Uporabom multivarijatne analize dokazano je da su određeni genotipovi *ABO* ( $i^{O1}I^A$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$ ) povezani s visokim porastom relativnog rizika umiranja (omjer hazarda 2,3) ako su D-dimeri  $\geq 4,1$  mg/L. Stoga se informacijski sadržaj dobiven kombiniranjem ovih genotipova s vrijednostima D-dimera, ureje i protrombinskim vremenom, može koristiti za izradu učinkovitog prognostičkog sustava.

**Broj stranica:** 84

**Broj slika:** 17

**Broj tablica:** 22

**Broj literaturnih navoda:** 208

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Ključne riječi:** polimorfizam gena, metilentetrahidrofolat reduktaza, sustav ABO, plućna embolija, rizik od umiranja, D-dimeri, multivarijatna analiza

**Datum obrane:** 30. ožujka 2022.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med., predsjednica

2. prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med., član

3. prof. dr. sc. Vera Cesar, član

4. doc. dr. sc. Neda Slade, zamjena člana

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**  
**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Basic Medical Sciences and Biology

**PhD thesis**

### **THE ASSOCIATION OF THE METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE AND ABO POLYMORPHISMS WITH THE RISK OF PULMONARY EMBOLISM**

Tatjana Kereš

**Thesis performed at:** Croatian Institute of Transfusion Medicine and Clinical Hospital  
Dubrava, Zagreb, Croatia

**Supervisor/s:** 1: Assist. Prof. Irena Jukić, MD, Ph.D  
2: Assist. Prof. Paško Konjevoda, MD, Ph.D.

#### **Short abstract:**

Hereditary and acquired risk factors are associated with the occurrence of pulmonary embolism. The genotypes associated with the two MTHFR SNPs, *rs1801133* i *1801131*, and the ABO system were not shown as risk factors for the PE occurrence. The multivariate analysis has shown an association between certain ABO genotypes ( $i^{O1}I^A1$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$ ) and increased relative mortality risk (Hazard Ratio 2,3), but only if D-dimers were  $\geq 4.1$  mg/L. Accordingly, the information content obtained with combining these genotypes with the variables related to the concentration of D-dimers, urea and prothrombin time may be used for generation of the effective prognostic system.

**Number of pages:** 84

**Number of figures:** 17

**Number of tables:** 22

**Number of references:** 208

**Original in:** Croatian

**Key words:** gene polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase, ABO system, pulmonary embolism, risk of death, D-dimers, multivariate analysis

**Date of the thesis defense:** 30<sup>th</sup> March 2022

#### **Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Koraljka Gall Trošelj, MD, PhD (president)
2. Prof. Rajko Kušec, MD, PhD (reviewer)
3. Prof. Vera Cesar, PhD (reviewer)
4. Assist. Prof. Neda Slade, PhD (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## ZAHVALA:

Veliku zahvalnost dugujem mentorima, doc. dr. sc. Ireni Jukić i doc. dr. sc. Pašku Konjevodi, na stručnoj i prijateljskoj podršci u planiranju, izradi i pisanju rada te konstruktivnim prijedlozima u pravim trenucima.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Goranu Kniewaldu na podršci.

Veliko hvala mojoj studijskoj savjetnici prof. dr. sc. Koraljki Gall Trošelj na strpljenju, svesrdnoj pomoći i vodstvu kroz studij.

Hvala Tomi Svaguši, dr. med., na idejnoj i logističkoj potpori.

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za hitnu i intenzivnu medicinu i djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava.

Veliko hvala dr. sc. Jasni Bingulac-Popović i djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na stručnoj potpori i obradi uzoraka.

Hvala mojoj najboljoj prijateljici Ivi koja je uvijek znala reći prave riječi ohrabrenja i podrške.

Najveću zahvalnost dugujem suprugu Mariu i sinu Tomislavu koji su me ustrajno pratili na ovom putu.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji bez čije bezrezervne pomoći, podrške i ljubavi ne bih postigla sve što jesam.

# Sadržaj

## Popis kratica

1. UVOD .....	1
1. 1. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) i metabolizam homocisteina.....	1
1. 2. Posljedice hiperhomocisteinemije .....	3
1. 3. Gen za metilentetrahidrofolat reduktazu .....	6
1. 3. 1. Polimorfizmi gena <i>MTHFR</i> .....	6
1. 3. 1. 1. Polimorfizam <i>rs1801133</i> .....	6
1. 3. 1. 2. Polimorfizam <i>rs1801131</i> .....	7
1. 4. Sustav krvnih grupa ABO.....	8
1. 4. 1. Nastanak i biokemijska svojstva ABH-antigena.....	9
1. 4. 2. Gen <i>ABO</i> .....	10
1. 4. 3. Nasljeđivanje sustava krvnih grupa ABO .....	11
1. 4. 4. Određivanje krvnih grupa ABO .....	12
1. 4. 5. Zastupljenost sustava krvnih grupa ABO u svijetu.....	13
1. 4. 6. Povezanost sustava ABO i različitih bolesti .....	13
1. 5. Plućna embolija (PE) .....	15
1. 5. 1. Epidemiologija i etiologija.....	15
1. 5. 2. Patofiziologija i patologija PE .....	18
1. 5. 3. Klinička slika .....	18
1. 5. 4. Procjena težine kliničke slike plućne embolije .....	19
1. 5. 5. Dijagnostika .....	20
1. 5. 6. Liječenje akutne plućne embolije .....	21
1. 5. 6. 1. Liječenje plućne embolije vrlo niskog, niskog i srednjeg rizika.....	21
1. 5. 6. 2. Liječenje plućne embolije visokog i vrlo visokog rizika .....	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	24
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3. 1. Ispitanici .....	25
3. 2. Metode .....	25
3. 2. 1. Uzorkovanje krvi i izdvajanje genomske DNA .....	25
3. 2. 2. Genotipiziranje gena <i>MTHFR C677T (rs1801133)</i> i <i>A1298C (rs1801131)</i> .....	26
3. 2. 3. Genotipizacija ABO metodom PCR-SSP .....	28
3. 2. 4. Troponin I .....	30
3. 2. 5. N-terminalni odsječak moždanog natrijuretskog pro-peptida (NT-proBNP) .....	31
3. 3. Analiza podataka .....	31

4. REZULTATI.....	35
4. 1. Demografski podaci.....	35
4. 2. Klinički podaci: Preživljenje bolesnika u odnosu na komorbiditete .....	36
4. 3. Preživljenje bolesnika u odnosu na parametar PESI .....	37
4. 4. Laboratorijski nalazi .....	38
4. 5. Sustav ABO i polimorfizam gena <i>MTHFR</i> u odnosu na obolijevanje od PE i ishod bolesti .....	42
4. 5. 1. Genotip <i>ABO</i> .....	42
4. 5. 2. Fenotip sustava ABO .....	44
4. 5. 3. Polimorfizam <i>rs1801133</i> i <i>rs1801131</i> .....	45
4. 6. Multivarijatna analiza rizičnih čimbenika uporabom programa rpart .....	47
4. 7. Analiza općih čimbenika mortaliteta uporabom klasifikatora JRIP i PART.....	49
4. 7. 1. Utjecaj polimorfizama gena <i>MTHFR</i> na mortalitet tijekom 30 dana.....	51
5. RASPRAVA .....	52
5. 1. Plućna embolija i genotipovi <i>rs1801131</i> i <i>rs1801133</i> .....	53
5. 2. Plućna embolija i sustav ABO .....	54
5. 3. Značaj D-dimera, genotipa <i>ABO</i> i PV u odnosu na metodu analize.....	54
5. 4. Značaj vrijednosti troponina .....	56
5. 5. Značaj NT-proBNP.....	57
5. 6. Značaj i vrijednost multivarijatne analize .....	58
5. 6. 1. Izdvajanje značajnih varijabli klasifikacijskim programima PART, JRIP i J48... ..	59
5. 7. Ograničenje studije i modela istraživanja.....	60
6. ZAKLJUČCI.....	62
7. LITERATURA .....	63
8. SAŽETAK.....	81
9. SUMMARY .....	82
10. ŽIVOTOPIS.....	83

## Popis kratica

AD	test diskriminacije alela (engl. <i>Allele Discrimination</i> )
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin-aminotransferaza
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AST	aspartat-aminotransferaza
BCC	bazocelularni karcinom (engl. <i>Basal Cell Carcinoma</i> )
BGMUT	Blood Group Antigen Mutation Database
CBS	cistationin- $\beta$ -sintaza
CMIA	engl. <i>Chemiluminescent Microparticle Immunoassay</i>
CRP	C-reaktivni protein (engl. <i>C-Reactive Protein</i> )
CSE	cistationin- $\gamma$ -liaza
Ct	engl. <i>Threshold Cycle</i>
cTnI	troponin I (engl. <i>Cardiac Troponin I</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DOAC	izravni oralni antikoagulantni lijekovi (engl. <i>Direct Oral Anticoagulants</i> )
eGFR	procjenjena brzina glomerularne filtracije (engl. <i>Estimated Glomerular Filtration Rate</i> )
FAM	5(6)-karboksifluorescein
FVIII	čimbenik zgrušavanja VIII
GGT	gama-glutamiltransferaza
GUK	glukoza u krvi
GWAS	Genome Wide Association Study
HbA1c	glikolizirani hemoglobin
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>High Density Lipoprotein</i> )
HGH	hormon rasta čovjeka (engl. <i>Human Growth Hormone</i> )
HR	omjer rizika (engl. <i>Hazard Ratio</i> )
ITM	indeks tjelesne mase
K2EDTA	dikalij etilendiamintetraoctena kiselina
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
LDL	lipoprotein male gustoće (engl. <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LITE	Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology
MPV	engl. <i>Mean Platelet Volume</i>
MSCT	višeslojna komjuterizirana tomografija (engl. <i>Multislice Computed Tomography</i> )
MTHFR	Metilentetrahidrofolat reduktaza
NO	dušikov oksid
NT-proBNP	engl. <i>N-Terminal Prohormone of Brain Natriuretic Peptide</i>
OR	engl. <i>Odds Ratio</i>
OS	oksidacijski stres
pb	parovi baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PCR-SSP	engl. <i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers</i>
PE	plućna embolija
PESI	indeks težine plućne embolije (engl. <i>Pulmonary Embolism Severity Index</i> )
PIOPED II	Prospective Investigation of Pulmonary Embolism Diagnosis II



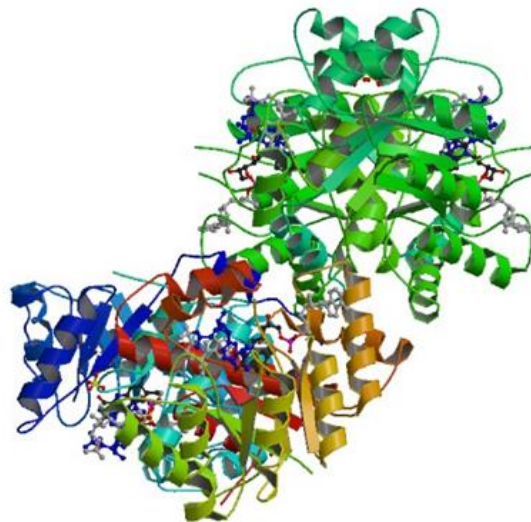
PK	pozitivna kontrola
PV	protrombinsko vrijeme
Q1	prvi kvartil
Q3	treći kvartil
qPCR	engl. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RDW	engl. <i>Red blood cell Distribution Width</i>
RLU	relativne jedinice svjetla (engl. <i>Relative Light Units</i> )
SAM	S-adenozilmetionin
SaO2	zasićenost arterijske krvi kisikom
SARS-CoV-2	engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SCC	planocelularni karcinom kože (engl. <i>Squamous Cell Carcinoma</i> )
SD	standardna devijacija
SNP	engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sPESI	pojednostavljeni indeks težine plućne embolije (engl. <i>Simplified Pulmonary Embolism Severity Index</i> )
THF	tetrahidrofolat
UDP-Gal	uridindifosfat galaktoza
UDP-GalNAc	uridindifosfat N-acetilgalaktozamin
VIC	engl. <i>Victoria</i>
VTE	venska tromboembolija
vWF	čimbenik zgrušavanja von Willebrand

# 1. UVOD

Suvremena medicina nezamisliva je bez genetskih istraživanja koja pomažu u dijagnostici različitih oboljenja. Ujedno stvaraju i preduvjete za razvoj i primjenu suvremenog i učinkovitog liječenja. Velik značaj pridaje se i procjeni čimbenika rizika, okolišnih ili nasljednih, koji mogu utjecati na pojavnost bolesti. Kardiovaskularne bolesti, karcinomi, šećerna bolest, prirođene bolesti i psihijatrijski poremećaji posljedica su i varijacija u genima, a okolišni čimbenici mogu utjecati na njihovu pojavnost i stupanj izraženosti. Iako česte, navedene bolesti predstavljaju izazov u istraživanju zbog toga što je identificiranje gena i genskih promjena zahtjevan i složen postupak. Jedan od ciljeva genetskog istraživanja je bolje razumijevanje mehanizama nastanka bolesti, kako bi se mogli predložiti novi pristupi u njihovoj prevenciji i liječenju. Napredak tehnologije u molekularnoj biologiji i medicini omogućio je vrlo detaljna istraživanja na razini genomske DNA, što omogućava povezivanje oboljenja s varijacijama u genima.

## 1. 1. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) i metabolizam homocisteina

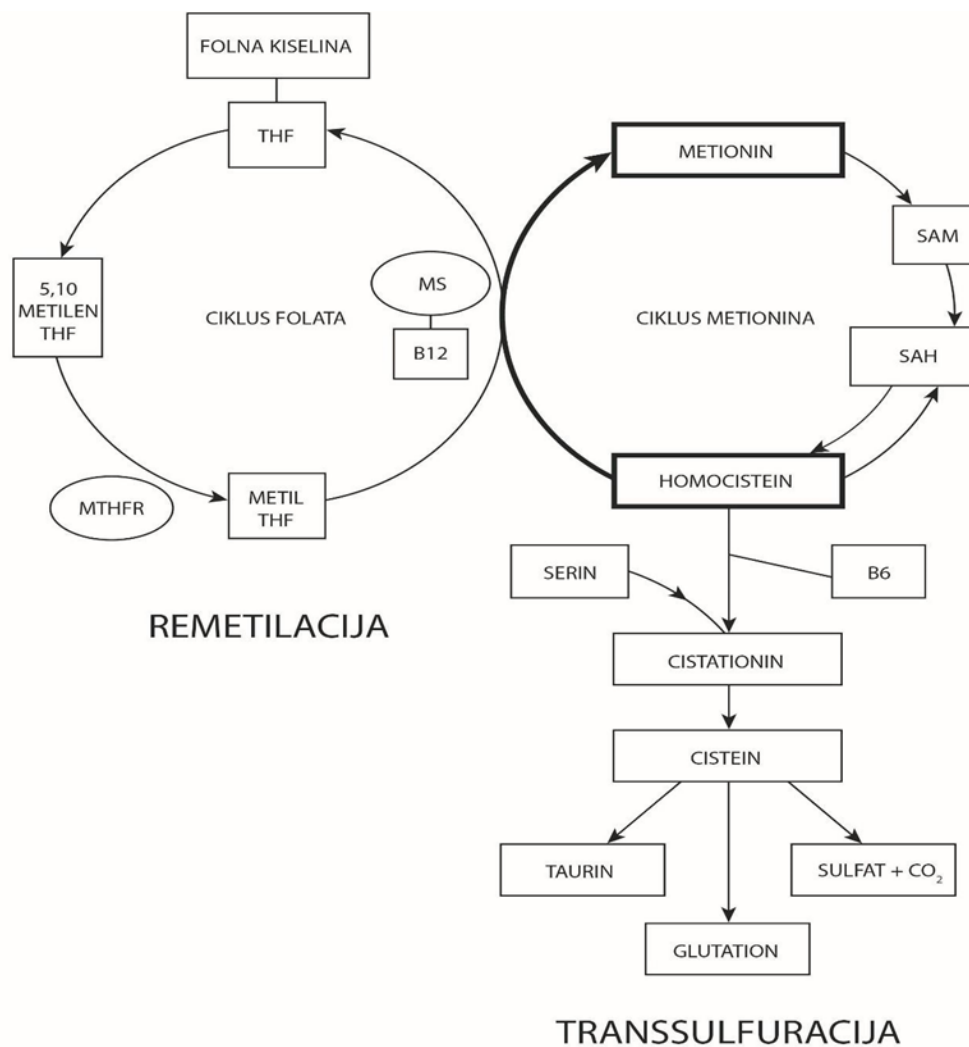
Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji sudjeluje u metabolizmu folata. Građen je od 656 aminokiselina i ima molekulsku masu 74.6 kDa. Najsnažnije je ispoljen u testisima, mozgu i bubregu. Sastoji se od N-terminalne katalitičke domene koja veže 5,10-metilen-tetrahidrofolat (5,10-metilen THF) i C-terminalne regulatorne domene koja veže S-adenozilmetionin (SAM) (1) (Slika 1).



**Slika 1.** Trodimenzionalna struktura enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (2).

MTHFR katalizira pretvorbu 5,10-metilen-THF u 5-metil-tetrahidrofolat (5-metil-THF) koji je donor ugljika u pretvorbi homocisteina u metionin. Pretvorbu katalizira enzim metionin sintaza, uz kofaktor vitamin B<sub>12</sub>. Metionin je prekursor S-adenozilmetionina koji je donor metilne skupine neophodne za nastanak homocisteina i metilaciju molekule DNA (3,4). Tetrahidrofolat nastao u reakciji metionin sintaze prelazi u 5,10-metilen-THF djelovanjem serin-hidroksimetil-transferaze 1, uz koenzim vitamin B<sub>6</sub>.

Postoji i put pretvorbe homocisteina u metionin neovisan o vitaminu B<sub>12</sub>. Donor metilne skupine je u tom slučaju betain. Od homocisteina može nastati i cistein, tijekom trans-sulfuracije. U ovu su reakciju uključeni enzimi cistationin-β-sintaza (CBS) i cistationin-γ-liaza (CSE), čija aktivnost ovisi o vitaminu B<sub>6</sub> (Slika 2) (5).



**Slika 2.** Pojednostavljen prikaz metabolizma folata u odnosu na aktivnost MTHFR (6,7).

Homocistein se u cirkulaciji, u fiziološkim uvjetima, nalazi u niskim koncentracijama (<12μmol/L). Održavanje niske razine potencijalno toksičnog homocisteina u stanicama ovisi

o njihovim transportnim mehanizmima. Hiperhomocisteinemija upućuje na poremećaj u metabolizmu homocisteina. Zbog izlučivanja viška ovog metabolita u cirkulaciju sprečavaju se toksična oštećenja u stanicama, ali se, s druge strane, oštećenju izlažu krvne žile. Brojne studije su pokazale da homocistein narušava funkciju endotela, uzrokuje poremećaj u metabolizmu lipida i ubrzava razvoj ateroskleroze, što za posljedicu ima nastanak tromboze.

Poremećaj homeostaze homocisteina može biti posljedica genskih promjena u enzimima i/ili nedostatka vitamina koji sudjeluju u njegovom metabolizmu (8).

Nedostatak cistationin- $\beta$ -sintaze genetski je poremećaj karakteriziran povišenim koncentracijama homocisteina i čestim trombozama. Najčešći uzrok nedostatka CBS u bijelaca je polimorfizam *I278T* (*c.833T>C*; *rs5742905*) (9). S druge strane, remetilacijski put metabolizma homocisteina također može biti narušen i zbog manjka vitamina B<sub>12</sub>. U potonjem se slučaju 5-metil-THF nakuplja u stanici, a sinteza S-adenozilmetionina je smanjena. Posljedice nisu dramatične, zbog toga što nakupljeni 5-metil-THF inhibira potrošnju staničnih zaliha SAM zbog pojačanog katabolizma homocisteina, u enzimskoj reakciji za koju je potrebna CBS (8).

5-metil-THF je ključan metabolit u sintezi metionina. Neposredna posljedica poremećaja sinteze 5-metil-THF, zbog manjka folata ili uslijed polimorfizma gena *MTHFR*, je smanjena sinteza metionina. Zbog toga se metabolizam homocisteina usmjerava prema putu trans-sulfuracije, koji je nedostatan za potpuno metaboliziranje homocisteina zbog nekoliko razloga. Primarno, smanjena sinteza metionina dovodi do snižene unutarstanične razine S-adenozilmetionina. Nadalje, nedostatak 5-metil-THF potiče povećanu potrošnju S-adenozilmetionina čime se pojačano nakuplja homocistein, kao nusprodukt reakcije metilacije. Povišeni homocistein, uz nisku koncentraciju S-adenozilmetionina, uzrokuje smanjenu aktivaciju sintaze cistationina koja je ključna za trans-sulfuraciju (Slika 2) (8).

Homeostaza homocisteina ovisi o vitaminima skupine B. Folna kiselina je donor metilne skupine, a riboflavin i vitamin B<sub>12</sub> su koenzimi remetilacijskog puta sinteze metionina. Piridoksin (vitamin B<sub>6</sub>), je koenzim u reakciji trans-sulfuracije (8).

## 1. 2. Posljedice hiperhomocisteinemije

Homocistein, kao slobodna aminokiselina, može biti u reduciranom (tiol) ili oksidiranom obliku (simetrični disulfid homocistein). U plazmi se samo 1% homocisteina nalazi u slobodnom, sulfhidrilnom obliku. Čak se 99% homocisteina nalazi u oksidiranom obliku, u obliku

homocistein-disulfida, miješanog disulfida, ili vezano na proteine plazme, primarno albumin. U prisutnosti iona metala i kisika dolazi do autooksidacije homocisteina, pri čemu nastaju superoksidni i hidrosilni anioni, vodikov-peroksid ( $H_2O_2$ ) i tiolni slobodni radikali. Toksičnost homocisteina ovisi o posttranslacijskim modifikacijama proteina plazme, hemoglobina, LDL (od *engl. Low Density Lipoprotein*) i  $\gamma$ -globulina, što dovodi do promjena strukture i funkcije ovih proteina. Posljedično dolazi do stvaranja novih antigena koji pokreću autoimuni upalni proces koji rezultira smrću stanice (10,11).

Hiperhomocisteinemija dovodi do brojnih promjena koje imaju utjecaj i na krvne žile. Homocistein uzrokuje oksidacijski stres (OS); poremećaj ravnoteže antioksidansa i oksidansa, u korist oksidansa (12). Do poremećaja može doći zbog povećanog stvaranja oksidansa, smanjenja antioksidacijske zaštite stanice i neuspješnog popravka nastalih oštećenja DNA (13). Oksidacijski stres posredovan homocisteinom razvija se zbog povećanog nastanka slobodnih kisikovih vrsta, smanjene aktivnosti antioksidacijskih sustava, izravnog citotoksičnog djelovanja na endotel i poticanjem upale. U stanju hiperhomocisteinemije, slobodne kisikove vrste nastaju zbog autooksidacije homocisteina (9,14). Pojačan oksidacijski stres uzrokuje lipidnu peroksidaciju na membranama endotelnih stanica i oksidaciju lipoproteina u plazmi. Produkti lipidne peroksidacije mogu potaknuti aktivnost trombocita vežući se na njihove receptore za tromboksan. Trombociti metaboliziraju homocistein u cistein, pri čemu nastaje sumporovodik koji aktivira metabolizam arahidonske kiseline. Ovo za posljedicu ima pojačano stvaranje tromboksana A<sub>2</sub> koji potiče daljnju aktivaciju i agregaciju trombocita (9).

Homocistein uzrokuje trombotičku dijatezu djelovanjem na endotel, trombocite, čimbenike zgrušavanja, trombolizu i vezivno tkivo. Protrombotičko djelovanje ostvaruje mnogostrukim mehanizmima: smanjivanjem biorasplošivosti dušikovog oksida (NO) i prostaciklina, povećavanjem koncentracije i aktivnosti tkivnog čimbenika (*engl. Tissue Factor*), povećavanjem aktivnosti čimbenika koagulacije V, smanjenjem inaktivacije aktiviranog čimbenika V aktiviranim proteinom C, povećanjem razine čimbenika koagulacije VIII, poticanjem aktiviranja čimbenika X, inhibiranjem vezanja antitrombina III za endotel, smanjivanjem broja veznih mjesta za tkivni aktivator plazminogena na endotelu preko aneksina A<sub>2</sub>, smanjivanjem sinteze i koncentracije trombomodulina na površini stanice, smanjivanjem aktivacije proteina C, modificiranjem afiniteta apolipoproteina za plazminom modificirani fibrin, inhibiranjem fibrinolize, te poticanjem aktiviranja i agregiranja trombocita (7,15-17).

Hiperhomocisteinemija je povezana i s povećanim rizikom za nastanak kongenitalnih poremećaja; na primjer, poremećaja zatvaranja neuralne cijevi i srca, rascjepa usne/nepca,

sindroma Down. Budući da je poznato da hiperhomocisteinemija utječe na razinu metilacije DNA, pretpostavlja se da abnormalna metilacija DNA tijekom embriogeneze može biti patogeni čimbenik za nastanak ovih kongenitalnih poremećaja (18).

Kliničke manifestacije hiperhomocisteinemije najčešće su istodobno prisutne u više organskih sustava. Promjene se događaju i na očima, u vidu brzoprogridirajuće miopije i subluksacije leće (19).

Povišena razina homocisteina može povećati rizik od nastanka shizofrenije. Povišene razine ukupnog homocisteina u trećem tromjesečju trudnoće mogu uzrokovati oštećenje krvnih žila posteljice, što može ograničiti opskrbu kisikom. Posljedično može imati i izravan učinak na strukturu mozga fetusa, te tako povećati rizik od razvoja shizofrenije (20,21). Homocistein također može imati ulogu u shizofreniji poticanjem oksidacijskog stresa (22).

Još 1969. godine je zanimanje za preuranjene slučajeve aterotromboze i tromboembolije u bolesnika s izraženom homocisteinurijom dovelo do spoznavanja povezanosti homocisteina s poremećajima vaskularnog sustava (8). Hiperhomocisteinemija je snažan čimbenik rizika za nastanak ateroskleroze, infarkta miokarda i tromboembolijskih incidenata (23). U meta-analizi 24 retrospektivne (3289 ispitanika) i 3 prospektivne studije (476 ispitanika) zaključeno je da je koncentracija homocisteina veća za 5  $\mu\text{mol/L}$ , u odnosu na normalne vrijednosti, povezana s 27% (95% CI: 1-59) većim rizikom od venske tromboze u prospektivnim studijama i 60% (95% CI: 10-134) u retrospektivnim studijama (24).

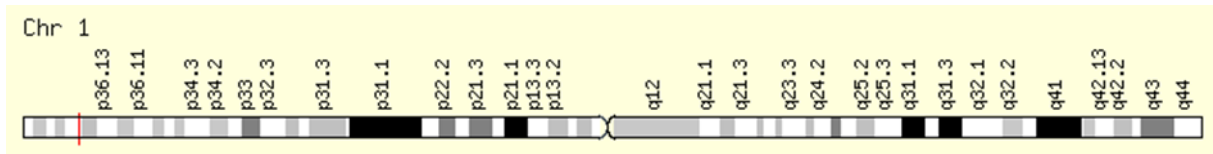
Dodatno, pretpostavlja se da je smanjena katalitička aktivnost MTHFR povezana s psihičkim bolestima, šećernom bolešću, psorijazom i karcinomima (4).

Određivanjem koncentracije homocisteina i otkrivanjem genske pozadine poremećaja koji se manifestira povišenom koncentracijom homocisteina teško je identificirati pojedince koji će razviti hiperhomocisteinemiju i homocistinuriju, zbog toga što postoje i drugi čimbenici koji ih uzrokuju. U metabolizmu homocisteina sudjeluju folati, koenzimi vitamin B<sub>12</sub> i vitamin B<sub>6</sub>. Stoga je nadoknada ovih vitamina važna za fiziologiju metabolizma homocisteina (8,25,26). Manjak vitamina skupine B je primarni uzrok blage do umjerene hiperhomocisteinemije. Dodatak vitamina prehrani u većini slučajeva dovodi do gotovo potpune normalizacije vrijednosti homocisteina u plazmi.

Važno je otkriti i uzeti u obzir sve čimbenike rizika koji mogu povećati podložnost za povećanu koncentraciju homocisteina i eventualni razvoj kardiovaskularnih bolesti (27,28).

### 1. 3. Gen za metilentetrahidrofolat reduktazu

Gen *MTHFR* (*Metilentetrahidrofolat reduktaza*) nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1 (1p36.22). Sastoji se od 12 eksona, a dugačak je 2,2 kilobaze (kb) (29). Gen *MTHFR* kodira istoimeni protein, metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR).



Slika 3. Položaj gena *MTHFR* na kromosomu 1 (30).

#### 1. 3. 1. Polimorfizmi gena *MTHFR*

Postoje brojni polimorfizmi gena *MTHFR* koji za posljedicu imaju smanjenu aktivnost enzima. Ovakve polimorfizme posjeduje približno 40% populacije (1). Polimorfizmi gena *MTHFR* najčešći su uzrok umjerene hiperhomocisteinemije. Polimorfizmi *rs1801133* i *rs1801131* najviše pridonose smanjenju aktivnosti MTHFR (27).

##### 1. 3. 1. 1. Polimorfizam *rs1801133*

Godine 1988. otkriven je polimorfizam gena *MTHFR*, *rs1801133*, zbog kojeg enzim u homozigota *TT* posjeduje približno 30% aktivnosti u odnosu na homozigote *CC* (31). Nalazi se u eksonu 4 (*C677T*) i uzrokuje zamjenu alanina valinom na položaju 222 (*A222V*), u N-terminalnoj katalitičkoj domeni enzima. Ovo za posljedicu ima smanjenu termostabilnost enzima. Termolabilnost MTHFR, primjećena u uvjetima *in vitro*, na 46 °C, dovela je do otkrića ovog polimorfizma (31).

Godine 1991., Kang i suradnici dokazali su povezanost termolabilne inačice MTHFR i povišenih vrijednosti homocisteina s koronarnom bolešću (27). Klinička slika i biokemijski pokazatelji izravno koreliraju sa smanjenom enzimatskom aktivnošću MTHFR, zbog prisustva polimorfizma *rs1801133* (27).

Studija iz 1995. godine detaljnije je opisala utjecaj ovog polimorfizma na stabilnost i aktivnost MTHFR. Polimorfizam je analiziran u 40 bolesnika s preuranjenim nastupom bolesti krvnih žila, no istraživanje nije rezultiralo konačnim zaključkom o povezanosti ovog polimorfizma s istraživanim fenotipom (3).

U homozigota *TT* i heterozigota *CT* smanjeno je stvaranje metiltetrahidrofolata, a time je smanjena i pretvorba homocisteina u metionin. To za posljedicu ima njegovu povišenu

koncentraciju u plazmi, koja je u homozigota *TT* u prosjeku 25% viša, u odnosu na homozigote *CC* (32). Genotip *TT* povezan je s 20% (95% CI: 8-32) većim rizikom od nastanka venske tromboze, u usporedbi s genotipom *CC* (24).

Hiperhomocisteinemija u osoba s ovim polimorfizmom može varirati i ovisi o mnogim čimbenicima, na primjer razini folata (27). Dokazano je da se uzimanjem folne kiseline može smanjiti koncentracija homocisteina u nositelja polimorfizma *rs1801133* (4,9).

Prevalencija polimorfizma *rs1801133* ovisi o etničkom podrijetlu i geografskom položaju populacije. U Europi, 10-12% homozigota *TT* živi u Španjolskoj, Francuskoj i Mađarskoj. Prevalencija je niža u Finskoj, Nizozemskoj, Rusiji i Njemačkoj i iznosi 4-6%. Najveća zastupljenost genotipa *TT* u Europi zabilježena je u Italiji. U Sjevernoj i Južnoj Americi je prevalencija ovog genotipa viša u populacijama latinoameričkog podrijetla, srednje je zastupljena u stanovništva europskog podrijetla, a vrlo niska (1-2%) u Afroamerikanaca. Niska zastupljenost genotipa *TT* u zadnjoj skupini u skladu je s njegovom niskom zastupljenošću u populaciji Afrike (34).

### **1. 3. 1. 2. Polimorfizam *rs1801131***

Polimorfizam gena *MTHFR*, *rs1801131*, rjeđi je u odnosu na *rs1801133*. Učestalost homozigota *CC* u Kanadi je 10%, u Nizozemskoj oko 9% (35), u iranskoj populaciji samo 4% (36), dok je u Italiji 12,5% (37).

Zamjena adenina citozinom u eksonu 7 (*A1298C*) uzrokuje zamjenu glutamina alaninom na položaju 429 u C-terminalnoj, regulatornoj regiji enzima. Polimorfizam *rs1801131* otkriven je u studiji kojom se istraživala uloga *MTHFR* u nastanku defekata neuralne cijevi (38). Polimorfizam *rs1801131* reducira aktivnost *MTHFR*, ali manje u odnosu na polimorfizam *rs1801133*. Zato je i njegov utjecaj na koncentraciju homocisteina manji, u odnosu na *rs1801133*. Homozigoti za *rs1801131* (*CC*) imaju približno 60% rezidualne aktivnosti enzima (13). Ovaj se genotip povezuje s rizikom od nastanka arterijske i venske tromboze, osobito ako je prisutan i manjak folata (14). Povezuje se i s češćom pojavom depresije (39) i neplodnošću u muškaraca, ako je združen s polimorfizmom *rs1801133* (40).

S obzirom na to da je povišenje koncentracije homocisteina posljedica poremećaja metabolizma homocisteina zbog polimorfizma u genu *MTHFR*, zaključuje se da ovi polimorfizmi pripadaju rizičnim čimbenicima za nastanak tromboze (41).



Do danas objavljeni rezultati dobiveni u nekoliko studija povezuju različite genetske čimbenike s rizikom pojavnosti tromboza. Trégouët i suradnici su, korištenjem metode GWAS (od *engl. Genome Wide Association Study*), analizirali približno 317000 pojedinačnih polimorfizama nukleotida (SNP, od *engl. Single Nucleotide Polymorphism*) u 453 osobe oboljele od venske tromboembolije (VTE) i 1327 kontrolnih ispitanika. Povezali su jedan SNP u genu za čimbenik V i dva SNP u genu *ABO* s povećanom pojavnošću tromboze (42). U drugoj velikoj studiji, u kojoj je analizirano 336469 polimorfizama u 13974 zdravih žena bijele rase, utvrđena je povezanost polimorfizama *MTHFR (rs1801133)* i *CBS (rs6586282)* s trombozama (43). Trećom studijom, u kojoj se također koristila metoda GWAS, i u koju je bilo uključeno približno 45000 ispitanika, otkrivena je povezanost polimorfizama gena za čimbenik V, fibrinogena i sustava *ABO* i s pojavnošću venskih tromboza (44). U studiji na 1542 ispitanika s venskim trombozama istovjetni su polimorfizmi dodatno povezani s pojavnošću venskih tromboza (45).

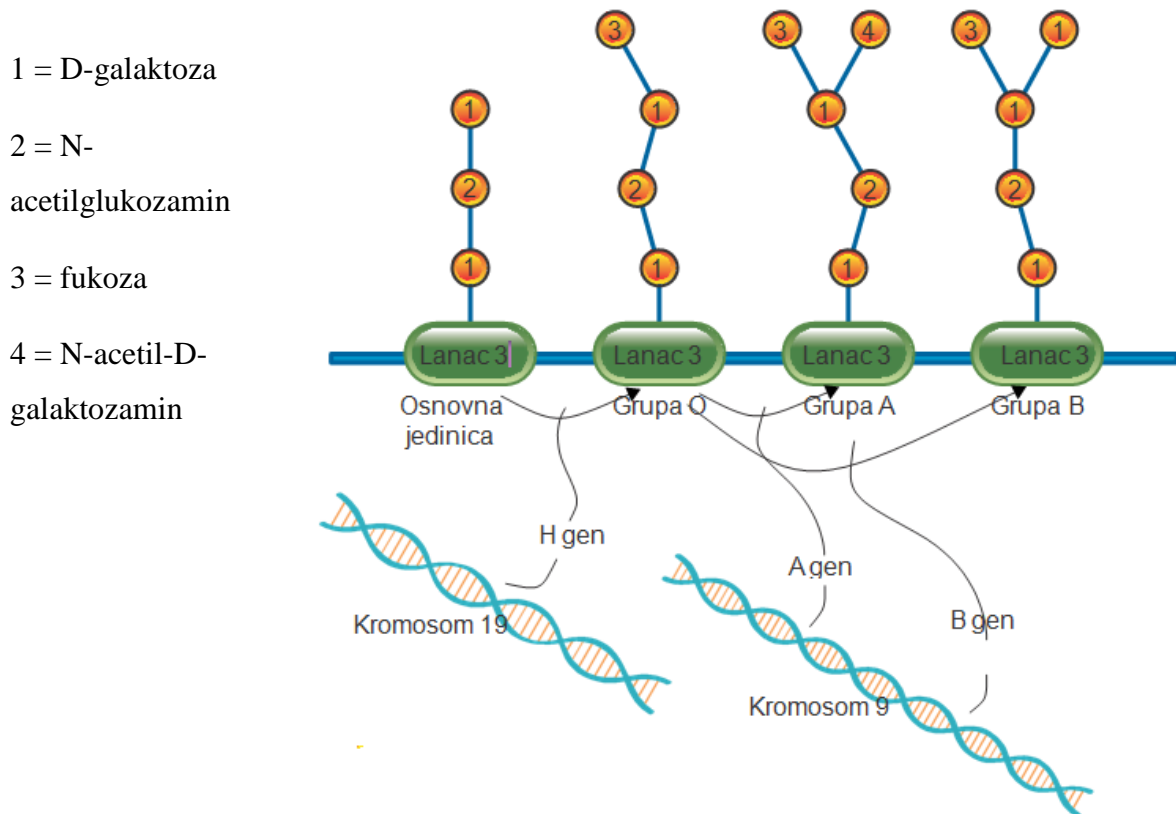
#### **1. 4. Sustav krvnih grupa ABO**

Sustav krvnih grupa ABO otkrio je, početkom 20. stoljeća, austrijski patolog Karl Landsteiner (46). Klasificirao ih je u odnosu na prisutnost antigena A i B na površini eritrocita. Trideset godina kasnije je za svoj rad dobio Nobelovu nagradu (46). Nekoliko godina kasnije, 1907. godine, ovo su otkriće potvrdili Čeh Jan Janski i Amerikanac William Moss. Osnove nasljeđivanja ovog sustava otkrili su Ludwik Hirszfild i Erich von Dungem, 1910. godine. Godine 1924. Felix Bernstein je dokazao postojanje nekoliko alela na jednom lokusu. Englezi Watkins i Morgan su, krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća, razjasnili biokemijsku građu, odnosno oligosaharidne strukture antigena ABH i imunodominantne šećere koji omogućuju njihovo razlikovanje (N-acetilgalaktozamin za antigen A, D-galaktoza za antigen B i fukoza za antigen H). Bilo je jasno da ovi oligosaharidi ne mogu biti primarni produkti gena. Zbog toga su pretpostavili da sintetiziranje ovih oligosaharida ovisi o aktivnosti enzima, primarnih genskih produkata. Konačna potvrda dobivena je kloniranjem alela gena *ABO* (47).

Yamamoto i suradnici su 1990. godine objavili rezultate temeljene na kloniranju alela gena *ABO*, na temelju kojih je moguće razumjeti sustav krvnih grupa ABO (48). Utvrđeno je da zamjena aminokiselina arginin, glicin, i leucin (A-transferaza) te glicin, serin, metionin i alanin (B-transferaza) nekim drugim aminokiselinama dovodi do razlika u specifičnosti prijenosa određenih monosaharida, te da alel *i* ne kodira funkcionalnu glikoziltransferazu (48).

### 1. 4. 1. Nastanak i biokemijska svojstva ABH-antigena

ABH-antigeni nastaju u enzimatskim reakcijama koje kataliziraju A- i B-glikoziltransferaze (transferaza A - alfa 1-3-N-acetilgalaktozamintransferaza; transferaza B - alfa 1-3-galaktoziltransferaza). Ovi su enzimi kodirani funkcionalnim alelima (aleli  $I^A$  i  $I^B$ ) koji se nalaze na lokusu ABO (9q34.2). Njihovom se aktivnošću na H-antigen, disaharid  $Fuca1-2-Gal\beta$ -, prenose specifični monosaharidi (Slika 4).



**Slika 4.** Shematski prikaz modifikacija ABH-antigena. Preuzeto i prilagođeno prema Blannu i Ahmedu (49).

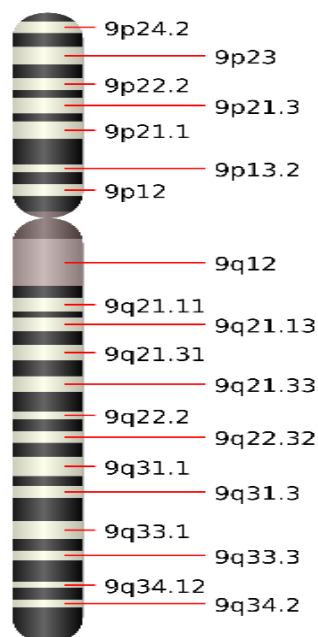
Alel  $i$  kodira nastanak katalitički insuficijentne glikoziltransferaze, najčešće zbog prisustva mutacije tipa delecije. Krvnu grupu A određuje prisustvo terminalnog monosaharida N-acetil-D-galaktozamina, odnosno trisaharida  $GalNAc\alpha1-3(Fuca1-2)Gal\beta$ -. Krvnu grupu B određuje prisustvo monosaharida D-galaktoza, odnosno trisaharida  $Gal\alpha1-2(Fuca1-2)Gal\beta$ -. Krvna grupa O određena je prisustvom nemodificiranog, ranije spomenutog H-antigena, disaharida  $Fuca1-2-Gal\beta$  (Slika 4).

Ispoljenost pojedinog ABH-antigena ovisi o prisustvu monosaharida i njihovih međusobnih veza na disaharidnim prekursorima na koje se vežu. Utvrđeno je postojanje najmanje pet različitih prekursorskih lanaca disaharida. Krvna grupa A ima dva fenotipa, A1 i A2, koji se

razlikuju po broju antigena na površini stanice. U krvnoj grupi A1, glikoziltransferaza veže terminalni monosaharid na sve tipove disaharidnih lanaca i ima 800000 – 2000000 antigena. U krvnoj grupi A2, glikoziltransferaza veže terminalni monosaharid samo na prekursorske lance disaharida tipa 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-) i 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-). Zbog toga je broj ovih antigena na površini eritrocita 200000 do 300000. Kod krvne grupe B, glikoziltransferaza veže galaktozu samo na prekursorske lance tipa 2 i zbog toga je na površini membrane eritrocita osoba s krvnom grupom B izloženo 700000 do 1000000 antigena. S obzirom na to da ABH-antigeni nastaju u enzimskim reakcijama, prisustvo, odnosno odsustvo supstrata uridindifosfat N-acetilgalaktozamina (UDP-GalNAc) ili uridindifosfat galaktoze (UDP-Gal) utječe na ispoljenost ABH-antigena. U novorođenčadi je ispoljenost antigena manja za 25-50% u odnosu na odrasle osobe (50).

#### **1. 4. 2. Gen ABO**

Gen ABO čovjeka smješten je na kromosomu 9 (9q34.1-q34.2) (Slika 5). Gen ima tri alela:  $I^A$ ,  $I^B$  i  $i$ . Sadrži 19514 parova baza (pb), sedam eksona i šest introna. Zadnja dva eksona (6 i 7) kodiraju domenu ABO-glikoziltransferaze, proteina koji je građen od 354 aminokiseline. Ova glikoziltransferaza modificira sadržaj antigena na eritrocitima i tako određuje fenotip krvne grupe. Aleli  $I^A$  i  $I^B$  razlikuju se u sedam točaka; zbog zamjena nukleotida na položajima 297, 526, 657, 703, 796, 803 i 930. Aleli  $I^{A1}$  i  $I^{A2}$  razlikuju se u odnosu na jednu supstituciju (C467T) i jednu deleciju (C1059→pomak okvira čitanja). Alel  $i$  razlikuje se od alela  $I^A$  zbog delecije jednog nukleotida (guanina) na položaju 261, što za posljedicu ima nastanak prijevremenog STOP-kodona. Aleli  $i^{O2}$  i  $i^{O1}$  razlikuju se u devet supstitucija na položajima 106, 188, 189, 220, 297, 646, 681, 771 i 829. Aleli  $i^{O2}$  i  $I^{A1}$  razlikuju se u tri supstitucije nukleotida na položajima 297, 526 i 802 (51).



**Slika 5.** Struktura kromosoma 9 (52).

### 1. 4. 3. Nasljeđivanje sustava krvnih grupa ABO

Sustav krvnih grupa ABO je pod kontrolom jednog gena koji se prezentira alelima:  $i$ ,  $I^A$  i  $I^B$ . Nasljeđivanje krvnih grupa ABO sustava i manifestiranje specifičnog fenotipa ovisi o dominaciji pojedinih alela. Kako su aleli  $I^A$  i  $I^B$  dominantni u odnosu na alel  $i$ , samo će osobe koje naslijede alele  $ii$  imati krvnu grupu O. Alel  $I^A$  određuje grupu A, alel  $I^B$  određuje grupu B. Osobe koje imaju kombinaciju alela  $I^A I^A$  ili  $I^A i$  imaju krvnu grupu A. Osobe koje su naslijedile kombinaciju  $I^B I^B$  ili  $I^B i$  nositelji su krvne grupe B. Osobe koje su naslijedile  $I^A I^B$  imaju oba fenotipa, jer A i B pokazuju kodominaciju. Stoga roditelji s krvnim grupama A i B mogu imati dijete krvne grupe AB. Roditelji koji imaju alele  $I^B i$  i  $I^A i$  mogu imati i dijete krvne grupe O (Tablice 1 i 2) (53).

Prema podacima pohranjenim u bazu podataka **Blood Group Antigen MUTation Database** (BGMUT), u sustavu ABO postoji 335 alela (54). Aleli se, u pravilu, razlikuju u samo nekoliko baza, u kodirajućem ili u nekodirajućem dijelu gena. Najčešće se dokazuje prisutnost polimorfizama tipa zamjene (supstitucije) ili intragenska rekombinacija (*engl. crossingover*). Od 65 alela  $I^A$ , šest kodira glikoziltransferazu za antigen A1, a 11 kodira glikoziltransferazu za antigen A2. Alel  $I^B$  javlja se u 47 inačica. Čak 58 alela uključeno je u sintezu inaktivnih transferaza; 45 posjeduje deleciju 261delG, a preostali aleli posjeduju zamjene nukleotida koje dovode do nastanka potpuno ili djelomično inaktivnih transferaza. U serološkom

imunohematološkom se ispitivanju podtipovi razlikuju s obzirom na jačinu aglutinacije eritrocita s reagensima anti-A, anti-B i anti-AB (51).

**Tablica 1.** Nasljeđivanje genotipa ABO.

Krvne grupe roditelja Genotipovi ABO		Otac					
		O1O1	O1O2	O1A1	O1A2	O2A1	O2A2
Majka	O1O1	O1O1/O1O1	O1O1/O1O2	O1O1/O1A1	O1O1/O1A2	O1O1/O2A1	O1O1/O2A2
	O1O2	O1O2/O1O1	O1O2/O1O2	O1O2/O1A1	O1O2/O1A2	O1O2/O2A1	O1O2/O2A2
	O1A1	O1A1/O1O1	O1A1/O1O2	O1A1/O1A1	O1A1/O1A2	O1A1/O2A1	O1A1/O2A2
	O1A2	O1A2/O1O1	O1A2/O1O2	O1A2/O1A1	O1A2/O1A2	O1A2/O2A1	O1A2/O2A2
	O2A1	O2A1/O1O1	O2A1/O1O2	O2A1/O1A1	O2A1/O1A2	O2A1/O2A1	O2A1/O2A2
	O2A2	O2A2/O1O1	O2A2/O1O2	O2A2/O1A1	O2A2/O1A2	O2A2/O2A1	O2A2/O2A2
	O1B	O1B/O1O1	O1B/O1O2	O1B/O1A1	O1B/O1A2	O1B/O2A1	O1B/O2A2
	O2B	O2B/O1O1	O2B/O1O2	O2B/O1A1	O2B/O1A2	O2B/O2A1	O2B/O2A2
	A1A1	A1A1/O1O1	A1A1/O1O2	A1A1/O1A1	A1A1/O1A2	A1A1/O2A1	A1A1/O2A2
	A1A2	A1A2/O1O1	A1A2/O1O2	A1A2/O1A1	A1A2/O1A2	A1A2/O2A1	A1A2/O2A2
	A1B	A1B/O1O1	A1B/O1O2	A1B/O1A1	A1B/O1A2	A1B/O2A1	A1B/O2A2
	A2B	A2B/O1O1	A2B/O1O2	A2B/O1A1	A2B/O1A2	A2B/O2A1	A2B/O2A2
BB	BB/O1O1	BB/O1O2	BB/O1A1	BB/O1A2	BB/O2A1	BB/O2A2	

**Tablica 2.** Nasljeđivanje genotipa i fenotipa ABO.

Aleli	$I^A$	$I^B$	$i$
$I^A$	$I^A I^A$ A	$I^A I^B$ AB	$I^A i$ A
$I^B$	$I^B I^A$ AB	$I^B I^B$ B	$I^B i$ B
$I$	$i I^A$ A	$i I^B$ B	$ii$ O

#### 1. 4. 4. Određivanje krvnih grupa ABO

Standardnim serološkim metodama, korištenjem antiseruma anti-A i anti-B, moguće je odrediti glavne fenotipove sustava krvnih grupa ABO: A, B, O i AB, te podtipove unutar fenotipova A i O, na temelju jačine aglutinacije eritrocita s anti-A, anti-B i anti-AB reagensima.

Metodama molekularne biologije koje se temelje na lančanoj reakciji polimerazom i početnicama koje se vežu za razlikovne dijelove slijeda nukleotida (PCR-SSP, od *engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*) omogućena je genotipizacija ABO. Ovom je metodom moguće odrediti glavne alele ABO:  $i^{O1}$ ,  $i^{O2}$ ,  $I^A1$ ,  $I^A2$  i  $I^B$ , odnosno 15 različitih genotipova ABO (55).

#### **1. 4. 5. Zastupljenost sustava krvnih grupa ABO u svijetu**

Zastupljenost pojedinih krvnih grupa sustava ABO u svijetu se značajno razlikuje i može biti koristan podatak u praćenju migracija stanovništva. Često su raspodjele pokazatelji posljedica ratova i invazija (56).

Više od 50% svjetske populacije nositelji su krvne grupe O. Najviše je zastupljena u Srednjoj i Južnoj Americi, potom u Sjevernoj Americi i Africi, te u Zapadnoj Europi. Najmanje je prisutna u istočnoj Europi. U južnoameričkih Indijanaca "O" je jedini fenotip. U Aboridžina se mogu naći samo krvne grupe O i A. Dijelovi Afrike i Australije imaju povećanu učestalost krvne grupe O, dok je njena učestalost manja na europskom i azijskom kontinentu (54). Populacija s većom frekvencijom fenotipa A potječe iz sjeverne i centralne Europe, kao i dijela istočne Europe, Poljske i Ukrajine. Fenotip A2 najčešći je u Laponaca, u sjevernoj Skandinaviji, te, iznimno rijetko, u Aziji. Krvna grupa B češće je zastupljena u sjevernoj Indiji i središnjoj Aziji, dok je u zapadnoeuropskim zemljama relativno rijetka. Krvna grupa AB je najrjeđe zastupljena, poglavito u zapadnom svijetu (1-7%), a najviše je zastupljena u Japanu, te istočnim pokrajinama Kine i Koreje (54,57).

#### **1. 4. 6. Povezanost sustava ABO i različitih bolesti**

U brojnim se studijama istraživala povezanost sustava ABO s različitim bolestima, npr. kardiovaskularnim, gastrointestinalnim, zloćudnim i infektivnim (58,59). Rezultati povezanosti tromboze sa sustavom ABO razlikuju se u pojedinim istraživanjima. U nekim se populacijama povećani rizik za trombotičke događaje povezuje s alelom  $I^A$ , a u nekima s alelom  $I^B$  i diplotipom  $I^A I^B$  (60,61). Poznati polimorfizmi za čimbenik zgrušavanja V (*G1691A*), protrombin (*G20210A*) i *rs1801133* (*genotip TT*) dodatno povećavaju taj rizik (62).

Postoje dokazi o povezanosti sustava ABO i infektivnih bolesti. Pretpostavlja se da su razlike u građi antigena ABO sustava, s obzirom na oligosaharidne komponente, u različitim dijelovima svijeta omogućile širenje infektivnih bolesti (63). Prema većini autora, nositelji krvnih grupa ne-O lakše se zaražavaju virusom SARS-CoV-2 (64). Opisana je i sklonost pojedinih bakterija, virusa i parazita za vezanje s antigenima određenih krvnih grupa, koji

djeluju kao receptori. Nositelji krvne grupe O relativno su rezistentni na teški oblik malarije (65).

Postoji i veliki interes za istraživanjem moguće povezanosti sustava ABO sa zloćudnim bolestima. Tako je već prije pola stoljeća uočena češća pojava karcinoma, poglavito gastrointestinalnog trakta, u osoba s krvnim grupama A i AB (66). Kasnije je dokazano da biljezi zloćudnog tumora imaju značajke slične antigenu A, pa ih imunološki sustav nositelja ovih krvnih grupa teže otkriva. S krvnom grupom O povezuje se češća učestalost melanoma, a s krvnom grupom B sarkom kosti i karcinom mokraćnog mjehura (67).

U istraživanjima karcinoma dojke utvrđeno je da žene s krvnom grupom A imaju veću pojavnost i brže napredovanje bolesti, a češće i lošiji ishod liječenja, u usporedbi sa ženama krvne grupe O (68). U ovoj skupini žene rjeđe obolijevaju od karcinoma dojke, imaju bolje rezultate liječenja i nižu smrtnost. Nositeljice krvne grupe AB imaju neznatno veću sklonost i vjerojatnost ponovnog obolijevanja, te kraće vrijeme preživljenja, dok se karcinom dojke rjeđe javlja u skupini žena krvne grupe B, neopterećenih obiteljskom anamnezom (68).

Zanimljivo je istraživanje vezano uz pojavnost karcinoma pluća u skupinama ispitanika s pojedinim krvnim grupama. Uz pušenje je, kao snažan rizični čimbenik za razvoj karcinoma pluća, uočeno da od ove vrste karcinoma oboli više ljudi s krvnom grupom A, a manje je oboljelih s krvnom grupom O (69).

Rezultati studije na 95420 ispitanika upućuju da je ne-O krvna skupina značajno povezana sa smanjenim rizikom od svih vrsta karcinoma kože. U usporedbi s ispitanicima s krvnom grupom O, ispitanici s ne-O krvnom grupom imali su 14% manji rizik od razvoja planocelularnog karcinoma kože (SCC) i 4% smanjen rizik od razvoja bazocelularnog karcinoma (BCC) (70).

Poznato je da fenotip ABO korelira s razinom čimbenika VIII (FVIII) i čimbenika von Willebrand (vWF). vWF je glikoprotein koji sintetiziraju endotelne stanice i megakariociti. Endotelne stanice su glavni stanični izvor cirkulirajućeg vWF. Stoga se vWF smatra pouzdanim biljekom aktivacije endotelnih stanica (38). Trombociti otpuštaju  $\alpha$ -granule koje sadrže vWF, dok endotelne stanice oslobađaju tjelešca Weibel-Paladeova u kojima je vWF uskladišten (71-73).

vWF ima dvostruku ulogu u hemostazi: potiče adheziju trombocita djelujući kao ligand za njihove glikoproteine i služi kao nosač FVIII (74).

Nakon aktivacije, FVIII se odvaja od vWF, te s čimbenikom IX aktivira čimbenik X što dovodi do stvaranja trombina (75,76). Na površini FVIII i vWF nalaze se antigeni ABO. vWF koji ima vezane antigene A ili B ima dvostruko dulje poluvrijeme života u odnosu na vWF koji ih nema, i to objašnjava veće koncentracije ovog čimbenika u krvi osoba s krvnim grupama A, B i AB, u odnosu na osobe s krvnom grupom O (77). Nositelji ne-O krvnih grupa, zbog veće koncentracije vWF, imaju predispoziciju za pojačanu adheziju i agregaciju trombocita, te pomak koagulacijske ravnoteže prema stvaranju ugruška, što je i potvrđeno u brojnim studijama. Razine vWF i FVIII u plazmi snažno su međusobno povezane, i povezane su s rizikom od VTE (78-81).

U studiji *Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology* (LITE), u kojoj je bilo 19231 sudionika i 159 VTE događaja, razina vWF i FVIII bila je linearno povezana s povećanim rizikom od VTE (79).

Istraživanja povezanosti kardiovaskularnih bolesti sa sustavom ABO upućuju na veći rizik u nositelja ne-O krvnih grupa (82,83). Ipak, u usporedbi s višestruko potvrđenom povezanošću krvnih grupa sustava ABO s venskim trombozama, većinom studija nisu dobiveni jednoznačni rezultati u odnosu na povezanost sustava ABO s bolešću arterija (84).

## **1. 5. Plućna embolija (PE)**

### **1. 5. 1. Epidemiologija i etiologija**

Plućna embolija je začepljenje jedne ili više grana plućne arterije ugruškima koji se stvaraju bilo gdje u tijelu. Ugrušci najčešće nastaju u dubokim venama natkoljenice i zdjelice. Oni koji nastaju u području potkoljenica uglavnom ne izazivaju plućnu emboliju. Rjeđi izvori ugruška su desna pretkljetka i kljetka, vene gornjih udova i ramenog obruča, a vrlo rijetko ugrušak u plućnoj cirkulaciji može nastati *in situ* (85). Prema učestalosti, PE je treća najčešća kardiovaskularna bolest, nakon akutnog infarkta miokarda i cerebrovaskularnog inzulta (86). Procjenjuje se da je godišnja incidencija 39-115/100000. Različita je u odnosu na dobro definirane čimbenike rizika u različitim populacijama, a naročito u odnosu na etničku pripadnost i geografsko područje (87,88). Incidencija raste sa životnom dobi, tako da je u osoba starijih od 80 godina osam puta veća nego u osoba u pedesetim godinama života (86).

PE je velik javnozdravstveni problem i jedan od najčešćih uzroka smrti u razvijenim zemljama. Procjenjuje se da je u 2014. godini više od 370000 smrti u Europi bilo povezano s plućnom embolijom. Mortalitet je moguće reducirati brzim postavljanjem dijagnoze i adekvatnim



liječenjem. U odsustvu liječenja, smrtnost je do 34%, dok se liječenjem smanjuje na 2-8% (89). Klinička prezentacija bolesti često je nespecifična, što otežava dijagnosticiranje. Za ranu dijagnostiku i prevenciju smrtnih ishoda potreban je specifičan biljeg za otkrivanje genske predispozicije za pojavnost PE i provođenje prevencije u rizičnoj populaciji (90).

Plućna embolija je multifaktorijalna bolest koja je rezultat genetskih i stečenih čimbenika rizika. S obzirom da je najčešće komplikacija duboke venske tromboze, čimbenici rizika za nastanak duboke venske tromboze smatraju se i čimbenicima rizika nastanka PE. Prema rezultatima studije PIOPED II (*engl. Prospective Investigation of Pulmonary Embolism Diagnosis II*), većina bolesnika s plućnom embolijom ima barem jedan čimbenik rizika (91), naslijeđen ili stečen.

Najčešći genetski čimbenici rizika su polimorfizmi gena za čimbenik zgrušavanja V i protrombin (92). Stečeni čimbenici rizika uključuju visoku životnu dob, ranije preboljenje tromboze, zloćudnu bolest, nepokretnost, traumu, kirurške zahvate i bolničko liječenje. Bolesnici s trombozama često imaju nekoliko čimbenika rizika, što je pokazala studija na 587 bolesnika s venskim tromboembolijama u Sjedinjenim Američkim Državama. Ovom je studijom pokazano šest predisponirajućih čimbenika za pojavnosti VTE: nepokretnost duža od 48 sati tijekom 30 dana prije pojave VTE (45%), bolničko liječenje unatrag tri mjeseca (39%), kirurški zahvat u periodu od tri mjeseca prije dijagnosticiranja VTE (34%), zloćudna bolest (34%), infekcija (34%) i bolničko liječenje u tijeku (26%) (93).

Učestalost PE veća je u žena tijekom trudnoće i babinja, te u razdobljima uzimanja oralne kontracepcije ili hormonskog nadomjesnog liječenja (94).

Brojnim studijama istraživala se pojavnost plućne embolije tijekom trudnoće i u postpartalnom razdoblju. Incidencija bolesti niža je tijekom trudnoće u odnosu na postpartalno razdoblje (95). U trudnoći dolazi do fizioloških promjena u sustavu zgrušavanja, kako bi se održala funkcija posteljice i spriječilo prekomjerno krvarenje tijekom poroda. Čimbenici zgrušavanja VII, VIII, X i vWF su povišeni kao rezultat hormonskih promjena (95). Osim toga, fizičke promjene u trudnoći uzrokuju povećan pritisak na vene zdjelice i smanjen venski protok u nogama (95,96). Procjenjuje se da je rizik od tromboze 4,5 puta veći tijekom trudnoće (97,98), a 22 puta veći u razdoblju do 6 tjedana nakon poroda (99). Plućna embolija ostaje vodeći uzrok smrtnosti majki u razvijenim zemljama i čini približno 20% smrtnih slučajeva vezanih uz trudnoću (100,101).

U mlađih je žena uzimanje kontraceptiva najčešći uzrok tromboembolijskih incidenata, a rizik je najveći tijekom prva četiri mjeseca uzimanja hormona (102). Studije su pokazale da uzimanje

hormonske nadomjesne terapije značajno povećava rizik od tromboembolijskih incidenata, a rizik dodatno raste s dobi, debljinom, dokazanom trombofilijom i preboljelim tromboembolijskim incidentom (102-105).

Plućna embolija uzrok je približno 15% svih postoperativnih smrti, a operacije kuka, zdjelice, kralježnice i amputacije donjih ekstremiteta imaju najveći rizik za pojavnost PE (106,107).

Podaci o spolu, kao neovisnom čimbeniku rizika za razvoj plućne embolije, još su uvijek kontradiktorni. Analiza mortaliteta u Sjedinjenim Američkim Državama pokazala je da je stopa smrtnosti muškaraca od plućne embolije 20-30% veća u odnosu na žene (108). Incidencija plućne embolije u populaciji mlađoj od 55 godina veća je u žena, a u starijoj je populaciji incidencija veća u muškaraca (109).

Imobilizacija, osobito tijekom hospitalizacije značajno povećava rizik od nastanka tromboembolijskih incidenata (110). Produženo sjedenje i putovanje također povećavaju rizik od nastanka venskih tromboembolija dva do tri puta, a kolokvijalno se nazivaju „e-thrombosis“ (dugo sjedenje za računalom) i „economy class syndrome“ (dugo putovanje u skućenom prostoru) (111,112).

Prevalencija venskih tromboembolija u bolesnika sa zloćudnim bolestima iznosi 12% (113). Oboljeli od zloćudnih bolesti imaju povećanu sklonost zgrušavanju zbog prekomjerne sinteze čimbenika zgrušavanja, a tromboembolijski incidenti uočavaju se u 5% bolesnika sa zloćudnim bolestima. Čest su uzrok nepovoljnog ishoda, naročito u uznapredovalim stadijima bolesti, i u bolesnika starije životne dobi (114).

Pušenje je najvjerojatnije jedan od rizičnih čimbenika u nastanku plućne embolije (115-117), a debljina, u kombinaciji s drugim rizičnim čimbenicima, također povećava rizik od PE (118).

Hiperkoagulabilnost, kao podležeci patofiziološki mehanizam plućne embolije, nastaje zbog nasljednih ili stečenih čimbenika. Nasljedne čimbenike rizika predstavljaju polimorfizmi gena odgovorni za održavanje hemostaze krvi, te su heterozigoti ili homozigoti za urođenu trombofiliju skloniji venskoj tromboemboliji. Najčešći su polimorfizmi gena za čimbenik V, protrombin, *MTHFR* i inhibitor aktivacije plazminogena (119-121). U dodatne stečene čimbenike rizika, osim ranije navedenih, ubrajaju se nedavni trombotski incident, fibrilacija atriya i antifosfolipidni sindrom (122-124).

## **1. 5. 2. Patofiziologija i patologija PE**

Ugrušak se formira distalno u venama, a strujom krvi se prenosi do plućne cirkulacije (124). Opstrukcija plućnog krvožilja ugruškom klinički se odražava na cirkulaciju i izmjenu plinova, što dovodi do manifestacije bolesti. Začepljenje krvne žile rezultira porastom plućnog arterijskog tlaka i plućne vaskularne rezistencije. Povišen tlak u plućnoj arteriji nastaje kada je okludirano 30-50% plućne cirkulacije, a pridonosi mu i vazokonstrikcija potaknuta postojanjem ugruška te izlučivanje neurohormonalnih i proinflammatoryh medijatora: serotonina, katekolamina, tromboksana A<sub>2</sub>, endotelina i leukotriena (125-128). Poremećaj u izmjeni plinova posljedica je poremećene cirkulacije. Smanjeni protok u embolijom zahvaćenim područjima pluća i povećani protok u dijelovima pluća koji nisu zahvaćeni embolijom dovode do nesrazmjera ventilacije i perfuzije, što za posljedicu ima smanjenu razinu kisika u arterijskoj krvi (129).

## **1. 5. 3. Klinička slika**

Manifestacija plućne embolije varira: od hemodinamske nestabilnosti do samo blagih simptoma otežanog disanja. Nije rijetkost da je PE asimptomatska, te se slučajno otkrije tijekom dijagnostike drugih bolesti. Simptomi zbog kojih se najčešće posumnja na emboliju su dispneja i tahipneja, bol u prsima, kašalj, hemoptize, presinkopa i gubitak svijesti.

Klinička slika ovisi o veličini ugruška i razini opstrukcije, te općem zdravstvenom stanju bolesnika. Masivni jašući ugrušci nalaze se na račvištu plućnog trunkusa i opstruiraju barem polovicu cirkulacije. Najčešće završavaju smrtnim ishodom. Ugrušci smješteni periferno, uz dodatno narušene kardiovaskularne rezerve, uzrokuju infarkt pluća, koji je potencijalna podloga za nastanak krvarenja i plućnog edema. Bolesnici u kojih se razviju atelektaze, plućni edem i krvarenja, imaju narušenu plućnu funkciju. U bolesnika u kojih je došlo do rezolucije ugruška, pluća se mogu oporaviti do razine normalne funkcije (130,131).

U brzjoj kliničkoj procjeni važno je tražiti znakove hemodinamske nestabilnosti. Dispneja se definira kao subjektivan osjećaj nedostatka zraka, a nastaje zbog nesrazmjera ventilacije i perfuzije. Tahipneja nastaje kao posljedica stimulacije receptora u plućnom intersticiju. Bol u prsima može imati pleuritični i anginozni karakter. Čest nalaz je krvarenje, zbog čega je suh i podražajan kašalj praćen hemoptizom. Uslijed mogućeg smanjenja minutnog volumena, dio bolesnika ima neki oblik neurološkog deficita, u obliku presinkope ili sinkope. Bolnost i edem noge, unilateralno ili bilateralno, pobuđuje sumnju na duboku vensku trombozu koja često prethodi, ili se manifestira istodobno, s epizodom plućne embolije (124).

#### 1. 5. 4. Procjena težine kliničke slike plućne embolije

Prisutnost urušaja ili hipotenzije, odnosno hemodinamske nestabilnosti, važna je pri procjeni rizika od smrtnosti u bolesnika s embolijom. Danas su u upotrebi sustav bodovanja PESI (od *engl. Pulmonary Embolism Severity Index Score*) i njegova pojednostavljena inačica sPESI (od *engl. Simplified Pulmonary Embolism Severity Index*). Zbrajanjem 11 parametara: životna dob, spol, zloćudna bolest, zatajenje srca, kronična bolest pluća, frekvencija srca  $\geq 110$  u minuti, sistolički krvni tlak  $< 100$  mm Hg, frekvencija disanja  $\geq 30$  u minuti, tjelesna temperatura  $< 36^\circ\text{C}$ , poremećaj svijesti, zasićenost arterijske krvi kisikom  $< 90\%$ , procjenjuje se vjerojatnost smrtnog ishoda pojedinog bolesnika u sljedećih 30 dana. Zbroj je rezultat koji bolesnika rasvrstava u razred vrlo visokog (razred V), visokog (razred IV), srednjeg (razred III), niskog (razred II) ili vrlo niskog rizika (razred I) od umiranja, unutar 30 dana. PESI je dio prognostičkog alata kojim se kliničari služe u procjeni rizika od rane smrtnosti, pri čemu se, uz sustav bodovanja PESI ili sPESI, procjenjuje stanje desnog srca, razina troponina I i NT-proBNP (od *engl. N-Terminal Prohormone of Brain Natriuretic Peptide*) te postojanje simptoma urušaja ili hipotenzije (124,132-134).

Kako se sistolički tlak u plućnoj arteriji povećava, raste opterećenje desne klijetke, što može dovesti do njezinog zatajenja. S napredovanjem zatajenja desne klijetke može doći do poremećaja njenog punjenja i akutnog tlačnog opterećenja (135). Akutno tlačno opterećenje desne klijetke dovodi do neurohumoralne aktivacije i izlučivanja NT-proBNP, koji je biljeg disfunkcije miocita, odnosno desne klijetke. Slično vrijednostima troponina, vrijednost NT-proBNP u dijagnostici plućne embolije je ograničena zbog niske specifičnosti (oko 62%) i osjetljivosti (60%) (136). Međutim, postoji jasna povezanost povišenih vrijednosti NT-proBNP s tijekom bolesti, ranom smrtnošću i drugim komplikacijama plućne embolije. Studijom na 2213 ispitanika zaključilo se da svako deseterostuko povećanje vrijednosti NT-proBNP iznad gornje granice normalnih vrijednosti povećava rizik od recidiva ili smrti za 2,4 puta (137). Meta-analizom 23 studije (1127 ispitanika s PE) zaključeno je da su povišene koncentracije NT-proBNP značajno povezane s mortalitetom (138). Drugom se meta-analizom, koja je obuhvatila 13 studija (1132 ispitanika), zaključilo da je smrtnost bolesnika s povišenim vrijednostima NT-proBNP u prvih 30 dana također značajno povišena. Normalne vrijednosti NT-proBNP ukazuju na blaži tijek bolesti (139).

Akutno povišenje tlaka u plućnoj cirkulaciji, preopterećenje desne klijetke, njezino rastezanje i kompresija desne koronarne arterije dovode do ishemije i oštećenja miocita te posljedičnog izlučivanja troponina (140). Osim u akutnom koronarnom sindromu, povišene vrijednosti

troponina prisutne su i u drugim kardiovaskularnim bolestima: zatajivanju srca, miokarditisu, cerebrovaskularnom inzultu i plućnoj emboliji (141-145). Povišene vrijednosti troponina nalaze se u 30-50% bolesnika s plućnom embolijom (145) i prognostičke su u odnosu na mortalitet unutar 30 dana (146). Meta-analiza koja je uključila 20 studija (1985 ispitanika) pokazala je povezanost povišene vrijednost troponina i rizika od rane smrti u oboljelih od PE (147).

### **1. 5. 5. Dijagnostika**

Ne postoji dijagnostički test koji bi s apsolutnom sigurnošću mogao potvrditi ili isključiti plućnu emboliju. Dijagnostika se temelji na velikom broju metoda koje se međusobno nadopunjuju. U dijagnostici se koriste laboratorijski parametri, elektrokardiografski prikaz te slikovne pretrage (148). Višeslojna kompjuterizirana tomografija krvnih žila (angiografija MSCT, od *engl. Multislice Computed Tomography*) smatra se zlatnim standardom u dijagnostici plućne embolije. Predstavlja minimalno invazivnu metodu koja se temelji na intravenskoj aplikaciji kontrasta joda, čiji protok kroz krvne žile omogućuje vizualiziranje plućne cirkulacije do subsegmentalne razine. Pozitivan nalaz vidi se kao defekt punjenja i izostanak prikaza anatomije žila distalno od ugruška. Osim toga, lokalizira defekt, čime pomaže u određivanju težine patologije u smislu opsežnosti embolije. Moguća je simultana identifikacija potencijalnog infarkta pluća, pleuralnog izljeva i drugih patoloških promjena (upala, infiltracija stanicama tumora). Nedostaci angiografije su, uz alergiju na jod, glomerularnu filtraciju  $< 30 \text{ mL/min/1,72m}^2$ , te štetnost zračenja, naročito u djece, trudnica i dojilja (149).

Elektrokardiografski znaci naprežanja desne klijetke: inverzija T-vala u odvodima V1 do V4, QR-uzorak u prvom prekordijalnom odvodu, klasični trijas S1Q3T3 (duboki S- u prvom standardnom odvodu uz Q-zubac i negativan T-val u trećem standardnom odvodu), novonastali potpuni ili nepotpuni blok desne grane mogu usmjeriti dijagnostičku obradu u smjeru PE (150,151).

Najvažnije laboratorijske pretrage kod sumnje na PE su određivanje acidobaznog statusa i D-dimera, dok je za procjenu težine kliničke slike PE važno određivanje NT-proBNP i troponina I (124).

Karakterističan acidobazni status otkriva hipoksemiju, hipokapniju i respiracijsku alkalozu. U slučaju razvoja urušaja nastaju hiperkapnija i metabolička acidoza (152).

D-dimeri su raspadni produkti fibrina koji nastaju nakon što plazmin razgradi fibrinski ugrušak. Oni odražavaju sveukupnu aktivaciju sustava zgrušavanja krvi i fibrinolize, što ih čini biljgom

za početnu dijagnostiku pri sumnji na PE. Laboratorijski testovi D-dimera imaju visoku osjetljivost (94-96%), ali nisku specifičnost (42-52%) u dokazivanju PE. Negativna prediktivna vrijednost D-dimera za razine manje od 0,5 mg/L iznosi 99,1%; plućna embolija može se sa sigurnošću isključiti. Vrijednost D-dimera iznad 0,5 mg/L smatra se povišenom. Interpretacija povišenog nalaza D-dimera uzima se s oprezom, budući da mogu biti povišeni u brojnim patološkim stanjima kao što su trauma, operacije, krvarenja, u zloćudnoj bolesti, upali, kroničnom zatajenju bubrega, nakon nedavne operacije, u opeklima, u trudnoći, a pouzdanost povišene vrijednosti D-dimera smanjuje se i sa životnom dobi (153). Kombinacijom kliničke procjene i koncentracije D-dimera niže od 0,5 mg/L u plazmi plućna embolija se može sigurno isključiti (154-158).

Unatoč manjoj specifičnosti simptoma, znakova, te laboratorijskih i slikovnih pretraga, kombinacije ovih analiza, bilo od strane kliničara ili u različitim predikcijskim modelima, omogućuju probir bolesnika i odabir dijagnostičko-terapijskih smjernica (159).

## **1. 5. 6. Liječenje akutne plućne embolije**

### **1. 5. 6. 1. Liječenje plućne embolije vrlo niskog, niskog i srednjeg rizika**

Temelj liječenja akutne PE su antikoagulantni lijekovi koji se primjenjuje u tri faze: inicijalno (pet dana), produljeno (kroz šest mjeseci) i dugoročno liječenje (124). Smjernice Europskog kardiološkog društva preporučuju uvođenje antikoagulantnog liječenja u bolesnika sa srednje i visoko vjerojatnom PE, tijekom dijagnostičke obrade. Preporučeni oblik liječenja za većinu bolesnika s PE koja nije visokog rizika su heparini niske molekularne mase i selektivni inhibitor čimbenika X (fondaparinuks). Liječenje bolesnika s PE vrlo niskog rizika, koji nemaju komorbiditete, može se provoditi u ambulantnim uvjetima, čak i kod kuće, primjenom izravnih oralnih antikoagulantnih lijekova (DOAC, od *engl. Direct Oral Anticoagulants*). Primjena trombolitičkog liječenja se ne preporučuje u bolesnika s PE koja nije visokog rizika, ali može se razmotriti u bolesnika s PE srednjeg rizika. U bolesnika s teškom bubrežnom bolešću i u bolesnika s visokim rizikom od krvarenja preporučuje se primjena nefrakcioniranog heparina kao početno liječenje. Antagonisti vitamina K, npr. varfarin, terapijski učinak postižu nakon višednevne primjene. Umjesto antagonista vitamina K mogu se primijeniti i izravni oralni antikoagulansi, koji se daju u dozama prilagođenim bubrežnoj funkciji bolesnika. Izravni oralni antikoagulantni lijekovi su učinkoviti, smanjuju rizik od ponavljajućih PE i imaju manji rizik od krvarenja u usporedbi s antagonistima vitamina K (124).

### **1. 5. 6. 2. Liječenje plućne embolije visokog i vrlo visokog rizika**

U bolesnika s embolijom visokog i vrlo visokog rizika najvažnija je početna stabilizacija, koja se uspostavlja respiratornom i hemodinamskom potporom u jedinicama intenzivnog liječenja. U svih bolesnika s hipoksemijom obavezna je primjena kisika, a u slučaju teške hipoksemije ili nastanka respiratorne insuficijencije potrebna je intubacija i pripajanje bolesnika na mehaničku ventilaciju. Hemodinamska potpora nadoknadom volumena intravenozno obavezna je u stanjima teške hipotenzije i šoka. Preporučuje se primjena 500-1000 mL kristaloidnih otopina. Ukoliko nadoknada volumena nije dovoljna za stabilizaciju, primjenjuju se vazopresorni i inotropni lijekovi, a u svakodnevnoj primjeni su noradrenalin, dopamin i dobutamin (160).

Smjernice Europskog kardiološkog društva preporučuju intravensku primjenu rekombinantnog humanog tkivnog aktivatora plazminogena (alteplaza) ili nefrakcioniranog heparina (124). Kontraindikacije za njihovu intravensku primjenu mogu biti apsolutne i relativne. Apsolutne kontraindikacije su hemoragijski moždani udar, ishemijski moždani udar u zadnjih šest mjeseci, ozljeda ili tumorski proces u središnjem živčanom sustavu, teža trauma, operacija ili ozljeda glave unazad tri tjedna, krvarenje u probavnom sustavu unazad mjesec dana i aktivno krvarenje, neovisno o anatomskoj lokaciji. Relativne kontraindikacije su prolazna ishemijska epizoda u zadnjih šest mjeseci, peroralno antikoagulantno liječenje, trudnoća ili manje od tjedan dana od poroda, ubodna mjesta bez mogućnosti zaustavljanja krvarenja, loše regulirana arterijska hipertenzija (sistolčki tlak > 180 mm Hg), uznapredovala bolest jetre, infektivni endokarditis i vrijed želuca ili dvanaesnika (124).

Utjecaj intravenskog liječenja na rano i kasno preživljenje još nije u potpunosti razjašnjen. Međutim, novija meta-analiza na 72230 ispitanika pokazala je značajno smanjenje smrtnosti u bolesnika s PE koji su primili rekombinantni humani tkivni aktivator plazminogena ili nefrakcionirani heparin (161). U studiji provedenoj na 784 ispitanika s PE zaključeno je da je brza identifikacija bolesnika s PE visokog rizika ključna za preživljenje, budući da ti bolesnici zahtijevaju neodgodivu primjenu reperfuzijskog liječenja (162).

U bolesnika s apsolutnim kontraindikacijama, kao i u onih kod kojih terapija nije dovela do hemodinamskog oporavka, preporučuje se, kao sljedeća linija liječenja, embolektomija kirurškim zahvatom ili kateterom (124).

Dugotrajna antikoagulantna terapija i profilaksa recidiva traje najmanje šest mjeseci, a u bolesnika s nejasnim uzrokom PE i malim rizikom od krvarenja, 12 mjeseci. U bolesnika u

kojih su čimbenici rizika trajno prisutni, uzimanje antikoagulantnih lijekova traje doživotno (124,163).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je: Pojavnost i ishod plućne embolije povezani su s genotipovima *ABO* i polimorfizmima (*rs1801133*, *rs1801131*) koji utječu na aktivnost metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR).

Ciljevi rada su: a) otkrivanje značaja genotipova *MTHFR* povezanih s polimorfizmima *C677T* (*rs1801133*) i *A1298C* (*rs1801131*) i specifičnog genotipa *ABO* s pojavnnošću i ishodom plućne embolije; b) otkrivanje povezanosti standardnih laboratorijskih parametara, troponina I i NT-proBNP s ishodom plućne embolije; c) otkrivanje povezanosti svih ranije navedenih parametara s ishodom plućne embolije, kroz multivarijatnu analizu primjenom strojnog učenja.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3. 1. Ispitanici**

U istraživanje su bila uključena 74 ispitanika s akutnom plućnom embolijom, liječena u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu. Uzorci krvi prikupljeni su na dan dijagnosticiranja akutne plućne embolije, uz potpisani informirani pristanak bolesnika i uz primjenu protokola Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine koja je usklađena s etičkim standardom revizije u Tokiju 1983. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KB Dubrava. Ispitanici su praćeni 30 dana, prema preporukama za dijagnozu i liječenje plućne embolije Europskog kardiološkog društva (126).

Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu odobrilo je korištenje podataka genotipizacije 91 zdravih, nesrodnih dobrovoljnih darivatelja krvi iz istog zemljopisnog područja, koji u osobnoj i obiteljskoj anamnezi nisu imali tromboembolijskih epizoda. I ovi su ispitanici, u kontrolnoj populacijskoj skupini, potpisali izjavu informiranog pristanka. Bolesnici i ispitanici kontrolne skupine bili su usporedive dobi i spola. U obje su skupine prikupljeni detaljni anamnestički podaci: dob, spol, stil života ispitanika, druge bolesti, trombotičke bolesti u bolesnika, i u obitelji. Ostali anamnestički podaci odnosili su se na podatke vezane za trudnoću, uzimanje oralne kontracepcije, ponavljane epizode plućne embolije, nadomjesnog hormonskog liječenja i imobilizacije.

### **3. 2. Metode**

#### **3. 2. 1. Uzorkovanje krvi i izdvajanje genomske DNA**

Svim ispitanicima, bolesnicima i kontrolnoj skupini, uzet je uzorak periferne krvi u volumenu od 8,5 mL sa suhim antikoagulansom K2EDTA (dikalij etilendiamintetraoctena kiselina). Genomska DNA izdvojena je iz pune krvi korištenjem komercijalno dostupnog kompleta kemikalija QIAamp DNA Blood Mini QIAcube kit (QiagenGmbH, Hilden, Njemačka) i instrumenta QIAcube.

Instrument QIAcube (QiagenGmbH, Hilden, Njemačka) je robotska radna stanica za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina iz biološkog materijala (puna krv, plazma, kultura stanica i dr.). Izdvajanje se provodi standardnim komercijalnim kompletima kemikalija QIAgen na kolonama (silika-gel membrane), prema protokolima proizvođača. U našem je istraživanju za izdvajanje DNA korišteno 200  $\mu$ L pune krvi. Lizirajućim puferom (AL) stanice pune krvi se liziraju, a pH i ionska jakost lizata sprečavaju vezanje interferirajućih tvari na

membranu (proteini, lipidi, polisaharidi). Proteolizom se, korištenjem proteinaze K, uklanjaju proteini koji bi mogli ometati reakciju PCR. Genomska DNA se iz liziranog uzorka adsorbira na gel membranu kolone QIAamp spin korištenjem apsolutnog etanola. DNA vezana na membranu pročišćava se dvostrukim ispiranjem s puferima (AW1 i AW2) te eluira s membrane s 200 µL pufera za eluciju (AE). Izdvojena genomska DNA je visokog stupnja čistoće. Proces automatizirane izolacije DNA za 12 uzoraka korištenjem instrumenta QIAcube traje 90 minuta. Izvojena DNA korištena je u za genotipizaciju, u reakcijama lančane reakcije polimerazom (PCR, od *engl. Polymerase Chain Reaction*).

### 3. 2. 2. Genotipiziranje gena *MTHFR C677T (rs1801133)* i *A1298C (rs1801131)*

Za genotipiziranje dva izabrana polimorfizma gena *MTHFR* korištena je patentirana tehnologija TaqMan Assays - SNP Genotyping (Thermo Fisher Scientific) koja se temelji na razlikovanju alela temeljem jačine fluorescentnog signala u stvarnom vremenu (qPCR, od *engl. Quantitative Polymerase Chain Reaction*), korištenjem instrumenta AB7500. Za određivanje genotipa povezanog s polimorfizmom *rs1801133* korišten je komplet TaqMan C\_1202883\_20, dok je za određivanje genotipa povezanog s polimorfizmom *rs1801131* korišten komplet TaqMan C\_850486\_20. Uvjeti reakcije umnažanja kojima su određeni genotipovi odvijao se u skladu s nuputkom proizvođača (Tablica 3).

**Tablica 3.** Uvjeti reakcija genotipiziranja TaqMan.

Uvjeti qPCR	Temperatura	Vrijeme
Aktiviranje enzima AmpErase™ Uracil N-Glycosylase	50°C	2 min.
Aktiviranje AmpliTaq Gold polimeraze	95°C	10 min.
<b>40 ciklusa umnažanja</b>		
Denaturacija	95°C	15 sek.
Vezanje početnica i produljenje lanaca	60°C	1 min.

U reakcijama umnažanja u stvarnom vremenu koristi se dvostruko označena fluorescentna proba TaqMan: na 5' kraju je vezana emitirajuća boja (*engl. „Reporter“*), a na 3' kraju se nalazi prigušivač boje (*engl. „Quencher“*). Tijekom umnažanja dolazi do hibridizacije probe za ciljnu slijed DNA po načelu komplementarnosti, te njezine razgradnje koja ovisi o 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti Taq DNA polimeraze. Zbog toga se boje na 5' i 3' krajevima proba odvajaju i poništava se prigušivanje emisije. Signal fluorescencije se normalizira u odnosu na intenzitet emisije referentne boje (pasivna referenca) koja se nalazi u reakcijskoj smjesi. Amplifikacijska krivulja prikazuje promjenu snage signala fluorescencije u odnosu na ciklus umnažanja. Prag amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnažanja u kojima ne dolazi do

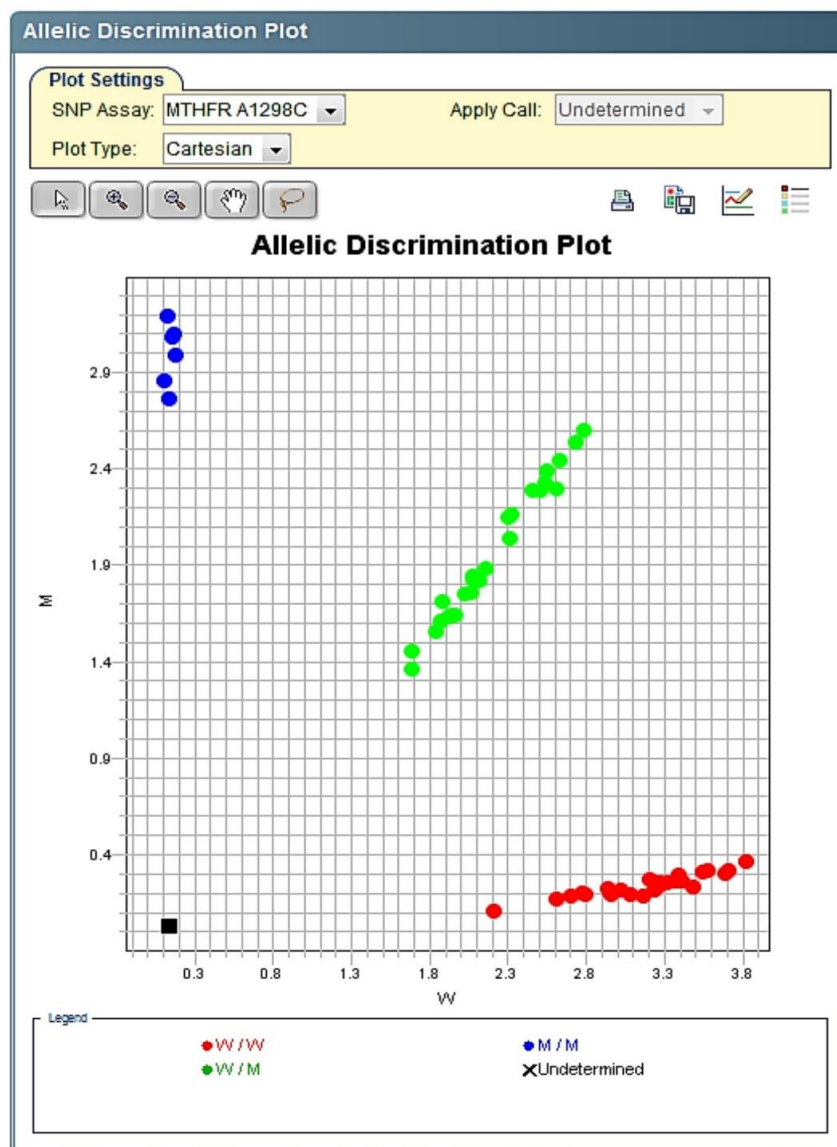
značajne promjene u snazi signala fluorescencije. Detekcija signala iznad praga rezultat je umnažanja ciljnog odsječka. Vrijednost Ct (od *engl. Threshold Cycle*) prikazuje odsječak ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet zadanog praga. Tehnologija umnažanja u stvarnom vremenu je visoko automatizirana: snaga fluorescencije se mjeri kontinuirano, a računalni program podatke prikazuje slikovno i brojevima, numerički.

U ovom istraživanju korišten je test diskriminacije alela (AD, od *engl. Allele Discrimination*), odnosno test završne točke nakon umnažanja qPCR. U ovoj se analizi koriste dvije fluorescentne probe TaqMan koje omeđuju ciljni slijed u kojem se nalazi polimorfizam. Svaka proba TaqMan sastoji se od obilježavajuće boje VIC (od *engl. Victoria*) na 5' kraju probe za alel 1 i obilježavajuće boje FAM (5(6)-karboksifluorescein) na 5' kraju probe za alel 2. Značajno povećanje intenziteta signala FAM ili VIC upućuje na veći udio veznih mjesta za pojedinu probu, što ukazuje na homozigote. Nepostojanje komplementarnosti u samo jednom nukleotidu između probe i ciljnog slijeda smanjuje učinkovitost hibridizacije i broj molekula obilježavajuće boje koja se odvaja od probe. Ovo upućuje na heterozigotnost (Tablica 5).

**Tablica 5.** Snaga fluorescencije u odnosu na genotip.

<b>Značajan porast</b>	<b>Upućuje na</b>
Fluorescencija samo boje VIC	Homozigot za alel 1
Fluorescencija samo boje FAM	Homozigot za alel 2
Fluorescencija obje boje	Heterozigot

Signal fluorescencije za svaki uzorak grafički se prikazuje na način da se točno odrede tri moguća genotipa (homozigot tipa 1, heterozigot 1/2, homozigot tipa 2). Na osi x prikazani su uzorci umnoženog alela 1 (označeni crvenom bojom), a na osi y uzorci s alelom 2 (označeni plavom bojom). Uzorci heterozigota (kombinacija 1/2) smješteni su na sredini grafa (označeni zelenom bojom). Uzorak negativne kontrole (amplifikacija bez ciljnog slijeda) prikazan je kao crni kvadratić na dnu lijeve strane grafa (Slika 6).



**Slika 6.** Diskriminacija alela za *rs1801131* ispisana računalnim programom instrumenta ABI Prism 7500.

### 3. 2. 3. Genotipizacija ABO metodom PCR-SSP

Za genotipiziranje ABO korištena je metoda PCR-SSP (164), koja je modificirana u laboratoriju Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu. PCR je enzimatska lančana reakcija umnažanja ciljnog slijeda DNA uporabom enzima DNA polimeraza *in vitro*, u ciklusima denaturacije, vezanja početnih oligonukleotida (početnica) (Tablica 6) i produljenja lanaca, zbog čega se ciljni slijed DNA umnaža u velikom broju kopija.

**Tablica 6.** Početnice korištene za umnažanje alela *ABO*.

Alel	Početnice	Slijed početnica	Redni broj reakcije i veličina odsječka
<b>O<sup>1</sup></b>	01-r	5'-aTaTat ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA AGT-3'	
	01-a	5'-tTa aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG TA-3'	1/134
	01-b	5'-Ta aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG TG-3'	2/133
<b>O<sup>2</sup></b>	02-r	5'-aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	02-a	5'-tC GAC CCC CCG AAG AAg CT- 3'	3/194
	02-b	5'-CC GAC CCC CCG AAG AAg CC- 3'	4/193
<b>B</b>	B-r	5'- aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	B-a	5'-atC GAC CCC CCG AAG AgC G- 3'	5/195
	B-b	5'-CC GAC CCC CCG AAG AgC C- 3'	6/194
<b>A<sup>2</sup></b>	A2-r	5'-ggG TGT GAT TTG AGG TGG GGA C- 3'	
	A2-a	5'.gAG GCG GTC CGG AAg CG- 3'	7/169
	A2-b	5'- gAG GCG GTC CGG AAC aCG- 3'	8/170
<b>PK1</b>	HGH-a	5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'	PK/434
<b>PK2</b>	HGH-b	5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'	

Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje slijeda nukleotida rubnih dijelova odsječka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju početnice, te postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu predloška za lanac u nastajanju. Metoda PCR-SSP zasniva se na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje (*engl. mismatch*) u jednoj bazi na 3' kraju DNA početnice što za posljedicu ima neprodujivanje lanca. Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju početnice komplementaran slijedu na kraju alela, doći će do umnažanja slijeda. Kada 3' nukleotid početnice nije komplementaran predlošku, neće doći do umnažanja slijeda, ili će se umnožiti u vrlo malom broju kopija.

Svim ispitanicima određeni su glavni aleli *ABO*:  $i^{O1}$ ,  $i^{O2}$ ,  $I^{A1}$ ,  $I^{A2}$  i  $I^B$  lančanom reakcijom polimeraze, uz uporabu osam parova oligonukleotidnih početnica specifičnih za određene sljedove DNA pojedinih alela *ABO*, u osam paralelnih reakcija PCR (Tablica 6).

Reakcija PCR-SSP odvijala se pod sljedećim uvjetima: denaturacija DNA na 96°C 2 min; 5 ciklusa: 96°C 25 sek, 70°C 50 sek i 72°C 45 sek, 25 ciklusa: 96°C 25 sek, 65°C 50 sek i 72°C 45 sek; 10 ciklusa: 96°C 25 sek, 61°C 50 sek i 72°C 45 sek. U svakoj reakciji SSP istodobno je napravljena amplifikacija odsječka gena za hormon rasta čovjeka (*engl. Human Growth Hormone* - HGH) koji je korišten kao pozitivna kontrola (PK). Nakon umnažanja, detekcija umnoženih odsječaka PCR-SSP napravljena je elektroforezom u 1,5% gelu agaroze, uz prisustvo etidij bromida (AL-Labortechnik, Austrija), pri naponu od 60-100 V na instrumentu ORIGINS, ElchromScientific (ORIGIN, Švicarska). Očekivana veličina umnoženog odsječka PCR uspoređena je s vrpcama standarda DNA koji je putovao pod istim uvjetima. U radu je

korišten molekularni biljeg od 100 pb. Nakon završene elektroforeze, gel je izložen UV-svjetlu transiluminatora valne duljine 254 nm, pri čemu su se specifični umnoženi ulomci DNA vidjeli kao narančaste vrpce, koje su dokumentirane digitalnom kamerom. Dobivene kombinacije alel-specifične reakcije PCR (prisutnost ili odsutnost umnožene DNA-vrpce za pojedini alel *ABO*) očitane su iz Tablice 7. Aleli *ABO* i pripadajući genotipovi imenovani su u skladu s prihvaćenom nomenklaturom (48).

**Tablica 7.** Tablica za očitavanje genotipova *ABO*.

<b>BROJ REAKCIJE</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>GENOTIP/FENOTIP</b>	
Veličina odsječka (pb)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O <sup>1</sup>	non O <sup>1</sup>	O <sup>2</sup>	non O <sup>2</sup>	B	non B	A <sup>2</sup>	non A <sup>2</sup>		
<b>Nazočnost signala</b>									<b>Genotip</b>	<b>Fenotip</b>
Položaj 1-pozitivan (O <sup>1</sup> )	+	-	-	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> O <sup>1</sup>	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> O <sup>2</sup>	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O <sup>1</sup> B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	A
Položaj 3-pozitivan (O <sup>2</sup> )	-	+	+	-	-	+	-	+	O <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	O
	-	+	+	-	+	+	-	+	O <sup>2</sup> B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O <sup>2</sup> A <sup>1</sup>	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	A
Položaj 5-pozitivan (B)	-	+	-	-	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	A <sup>1</sup> B	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A <sup>2</sup> B	AB
Položaji 2/4/6 pozitivni (non O <sup>1</sup> /O <sup>2</sup> /B)	-	+	-	+	-	+	-	+	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	A

### 3. 2. 4. Troponin I

Troponin I (cTnI, *engl. Cardiac Troponin I*) određen je iz plazme uzete u epruvetu s antikoagulansom, litij heparinom, kemiluminiscentnom metodom i korištenjem analizatora Beckman-CoulterDxI 600 (Access hsTnI Beckman-Coulter, Miami, SAD). Metoda određivanja Access hsTnI je dvodijelni imunokemijski test (tzv. sendvič). Monoklonska anti-cTnI protutijela vezana na alkalnu fosfatazu dodaju se u reakcijsku posudicu (*engl. reaction vessel*) s puferom i uzorkom. Nakon kratke inkubacije dodaju se paramagnetske čestice obložene monoklonskim protutijelima anti-cTnI. Paramagnetske čestice magnetiziraju u prisustvu magnetskog polja i pojačavaju vezanje molekula. Troponin I veže se na protutijela anti-cTnI na

krutoj fazi, dok konjugat anti cTnI-protutijela i alkalne fosfataze reagira s različitim antigenskim mjestima na molekulama troponina I. Nakon inkubacije u reakcijskoj posudici, nevezani materijali se ispiru, a vezani ostaju na krutoj fazi u magnetskom polju. Nakon toga dodaje se kemiluminiscentni supstrat što dovodi do stvaranja svjetla koje se mjeri luminometrom. Stvaranje svjetla izravno je proporcionalno koncentraciji troponina I u uzorku. Količina analita u uzorku određuje se na temelju pohranjene kalibracijske krivulje sastavljene od nekoliko točaka. Za mjerni postupak se kalibracija provodi u sedam točaka (približnih vrijednosti: 0, 30, 144, 567, 2293, 9280 i 27000 ng/L). Metoda je standardizirana prema internom standardu proizvođača, dobivenom korištenjem pročišćenog materijala. Linearne vrijednosti mjerenja ovom metodom su u rasponu 2,3-27000 ng/L, mjerno područje od 1,7-27027 ng/L, granica otkrivanja je 1,7 ng/L, a analitička osjetljivost 2,3 ng/L.

### **3. 2. 5. N-terminalni odsječak moždanog natrijuretskog pro-peptida (NT-proBNP)**

N-terminalni odsječak moždanog natrijuretskog pro-peptida u serumu određen je kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom CMIA (CMIA, od *engl. Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*), korištenjem instrumenta Abbott Architect i1000SR (Abbott Laboratories, Abbott Park, SAD). Test se odvija u dva koraka. Uzorak se najprije miješa s paramagnetskim mikročesticama koje su obavijene biotinom obilježenim protutijelima anti-NT-proBNP. NT-proBNP iz uzorka bolesnika veže se na ovako obilježene mikročestice, te se nakon ispiranja dodaju monoklonska protutijela miša, anti-NT-proBNP, konjugirana s akridinom. U ovu se reakcijsku smjesu, nakon ispiranja, dodaju otopine Pre-Trigger i Trigger. Intenzitet kemiluminiscentne reakcije koja potom nastaje mjeri se u relativnim jedinicama svjetla (RLU, od *engl. Relative Light Units*), a NT-proBNP iz uzorka bolesnika izravno je proporcionalan broju jedinica RLU. Kalibratori NT-proBNP za Architect sljedivi su prema internom referentnom standardu proizvođača kemikalija, sukladno dokumentu CLSI EP28-A3c. Kalibracija se provodi u šest točaka. Raspon kalibracije je od 0 do 41000 pg/mL, odnosno, kalibratori sadrže navedene koncentracije rekombinantnog NT-proBNP; 0 pg/mL, 120 pg/mL, 220 pg/mL, 345 pg/mL, 4100 pg/mL, 41000 pg/mL. Mjerno područje je od 8,2 do 35000 pg/mL, granica otkrivanja je 4,2 pg/mL, a analitička osjetljivost 8,2 pg/mL.

### **3. 3. Analiza podataka**

Baza podataka temeljena na podacima dobivenim praćenjem bolesnika postavljena je u sustavu SQLite, koji se koristi za upravljanje relacijskim bazama podataka



(<https://www.sqlite.org/index.html>). Podaci dobiveni prebrojavanjem opisani su kao brojevi i postotci, a podaci dobiveni mjerenjem opisani su kao minimum, prvi kvartil (Q1), medijan, treći kvartil (Q3), maksimum, aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). U grafičkom prikazu korištena je metoda *box-and-whisker* koja se koristi za usporedbu različitih skupina u odnosu na izmjerene parametre. Njezina prednost je što može istodobno prikazati pojedinačne originalne podatke (kao točke), u kombinaciji s opisom strukture podataka. *Box-and-whisker* za opis strukture koristi sljedeće podatke: minimum, prvi kvartil, medijan, treći kvartil i maksimum.

Podaci dobiveni prebrojavanjem analizirani su testom hi-kvadrat (*engl. Chi-square Test*), a razlike između skupina, u odnosu na podatke dobivene mjerenjem, s Mann-Whitney U-testom. Ovaj test spada u skupinu neparametrijskih testova, to jest, može se koristiti za analizu podataka koji ne slijede idealiziranu normalnu distribuciju, što je vrlo česta situacija u primijenjenim istraživanjima. Svi primjenjeni testovi bili su dvosmjerni, a P-vrijednosti su smatrane statistički značajnima ukoliko su bile manje ili jednake 0,05.

Multivarijatna analiza podataka obavljena je uporabom dvije skupine programa strojnoga učenja. Prvu skupinu predstavlja program rpart koji ispitanike razvrstava u podskupine prema iznosu omjera rizika (*engl. Hazard Ratio, HR*). HR se najjednostavnije može shvatiti kao relativni rizik umiranja, to jest, kolika je vjerojatnost da će ispitanik koji je preživio od početka studije umrijeti u narednom vremenskom periodu. Program rpart koristi omjer hazarda dvije skupine za izražavanje rezultata i njime se prikazuje omjer hazarda između definirane podskupine i svih ispitanika u studiji. Omjer hazarda za sve ispitanike jest 1, a svi ostali hazardi su izraženi u odnosu na taj broj. Konačni rezultat programa rpart je stablo preživljenja (*engl. Survival Tree*), u kojem je polazna skupina ispitanika razvrstana u podskupine. Podskupine su unutar sebe maksimalno homogene, a između sebe se maksimalno razlikuju. Smatra se da je stablo preživljenja ispravno oblikovano ako jasno razdvaja ispitanike u tri podskupine: niskorizične, srednjerizične i visokorizične.

Najveća prednost algoritma rpart je što se rezultat može prikazati kao stablo preživljenja, što omogućuje vizualnu analizu međuodnosa čimbenika rizika. Tri su osnovne prednosti ovoga pristupa:

1. Vizualna analiza je manje apstraktna u odnosu na čisto brojčane podatke;
2. Varijable su jasno posložene u odnosu na važnosti; što je varijabla bliže vrhu stabla to je njezino značenje veće;

3. Stablo preživljenja omogućuje identifikaciju nelinearnog odnosa varijabli, kao i njihovu moguću interakciju.

Stablo preživljenja ima tri komponente:

1. **Čvorovi** koji predstavljaju varijable na osnovu kojih se donosi odluka, pa se zato nazivaju i čvorovi odluke. Čvor na vrhu stabla predstavlja polazni čvor i on je početna točka analize.
2. Od čvorova odluke vode lijeva i desna **grana** koje ispitanike iz čvora razvrstavaju u podskupine, po određenom kriteriju. Na ovaj se način stvaraju dvije podskupine ispitanika, koji su razvrstani u čvorove odluke koji se maksimalno razlikuju u odnosu na omjer rizika, a unutar sebe su maksimalno moguće homogene.
3. Rastavljanje čvora u podskupine nastavlja se, sve dok se uspijeva dodatno povećati razlika između podskupina. Ukoliko to nije moguće, analiza u određenom čvoru završava i on se smatra završnim čvorom ili **listom**.

Stablom preživljenja se rezultat u završnim čvorovima ili listovima izražava kao omjer rizika - relativni rizik od umiranja izražen brojem. Pri tome je potrebno naglasiti da se HR za identificirane rizične podskupine izražava u odnosu na sve ispitanike u studiji koji imaju HR 1.

Prilikom interpretacije stabla preživljenja posebnu pažnju treba obratiti na dvije činjenice:

1. Stablo preživljenja predstavlja uvid u informacijski sadržaj varijabli. Uz oprezno tumačenje može ponuditi vrijedan uvid u međudnos parametara oboljenja.
2. Brojčane vrijednosti navedene u granama stabla ne smatraju se „normalnim“ ili „patološki promijenjenim“ vrijednostima varijable čvora odluke od kojega grane vode. Stablo treba sagledati kao cjelinu prilikom razvrstavanja ispitanika.

U drugoj skupini programa korištenih u multivarijantnoj analizi bili su JRIP, PART i J48. To su metode strojnoga učenja koje se koriste za rješavanje klasifikacijskoga problema, to jest zadataka u kojima treba naći razliku između dvije ili više skupina na osnovu jedne ili više varijabli. JRIP i PART izražavaju rezultat kao skup pravila, na temelju kojih se ispitanike razvrstava u podskupine na osnovu varijabli korištenih u pravilima, pri čemu JRIP daje prednost manjoj skupini, što je vrlo korisno u primjerima kada se podskupine značajno razlikuju s obzirom na veličinu. Nasuprot tome, PART daje prednost većoj skupini. Zbog toga je korisno koristiti oba klasifikacijska programa, pri čemu rezultati analiza ne moraju dati istovjetan rezultat. Klasifikator J48 je srodan programu PART, a izražava rezultat na vizualan način kao

stablo odluke koje opisuje algoritam kojim se postiže rješenje klasifikacijskoga problema. Svi navedeni programi dio su standardne metodologije strojnoga učenja i često se koriste u istraživačkome radu.

Rezultat klasifikatora JRIP, PART i J48 se obično izražava kao točnost, to jest postotak ispravno razvrstanih jedinki/ispitanika. Koristan dodatak je kappa-statistika, koja ukazuje na korisnost dobivenoga rješenja, a predstavlja oblik koeficijenta korelacije. Vrijednost kappa-statistike se može kretati u rasponu od -1 do 1, pri čemu vrijednost 1 predstavlja savršenu podudarnost između stvarnoga stanja i postupka kojim se obavlja klasifikacija (165-167).

## 4. REZULTATI

### 4. 1. Demografski podaci

U istraživanje su bila uključena 74 ispitanika, 37 (50%) žena i 37 (50%) muškaraca, s akutnom plućnom embolijom, u rasponu od 38 do 75 godina. Prosječna životna dob žena bila je 58,2 godine, a muškaraca 59,7 godina. Najmlađa bolesnica imala je 39, a najstarija 75 godina. Najmlađi bolesnik imao je 38, a najstariji 75 godina. Razlika u dobi između žena i muškaraca uključenih u studiju nije bila statistički značajna (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,581$ ) (Tablica 8).

Od 74 ispitanika s akutnom plućnom embolijom preživjelo je 67 ispitanika, a sedam ih je umrlo, i to dvije žene i pet muškaraca. Razlika u dobi između preživjelih i umrlih ispitanika statistički je značajna (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,021$ ); umrli ispitanici su prosječno 9,6 godina stariji od preživjelih ispitanika (Tablica 8).

**Tablica 8.** Raspodjela ispitanika s PE u odnosu na spol, dob i ishod bolesti.

Dob (godine)	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1	Q3	SD	P vrijednost*
Svi ispitanici	74	59,0	60,5	38,0	75,0	53,0	68,0	10,74	
Žene	37	58,2	60,0	39,0	75,0	47,0	67,0	11,26	0,581
Muškarci	37	59,7	62,0	38,0	75,0	54,0	68,0	10,30	
Živi	67	58,0	59,0	38,0	75,0	48,0	67,0	10,79	0,021
Umrli	7	67,6	70,0	59,0	74,0	64,0	72,0	5,35	

\* Mann-Whitney U-test

Nije bilo razlike u smrtnosti između muškaraca i žena ( $\chi^2 = 1,420$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,233$ ). Ovdje treba uzeti u obzir da je broj umrlih ispitanika bio malen. Treba uočiti da je relativni rizik umiranja muškaraca 2,5 puta veći u odnosu na žene, ali se zbog veličine uzorka ne može donijeti definitivni zaključak o spolu kao čimbeniku rizika za smrtni ishod (Tablica 9).

**Tablica 9.** Raspodjela preživjelih i umrlih ispitanika prema spolu.

Spol	Živi	Umrli	Ukupno	$\chi^2 1,420$ $df = 1$ $P = 0,233$
Ženski	35 (52,24%)	2 (28,57%)	37	
Muški	32 (47,76%)	5 (71,43%)	37	
Ukupno	67	7	74	

Analizirani su antropometrijski podaci ispitanika (visina, tjelesna masa, indeks tjelesne mase). Prosječna visina ispitanika iznosila je 173,3 cm (raspon 155 cm-192 cm). Prosječna tjelesna masa bila je 88 kg (raspon 54 kg-150 kg). Prosječni indeks tjelesne mase (ITM) bio je 29,8 kg/m<sup>2</sup> (18,7-46,3 kg/m<sup>2</sup>). Usporedbom antropometrijskih parametara preživjelih i umrlih ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na visinu (P-vrijednost = 0,853), masu (P-vrijednost = 0,230) i indeks tjelesne mase (ITM) (P-vrijednost = 0,561) (Tablica 10).

**Tablica 10.** Antropometrijski parametri ispitanika.

Varijabla	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1	Q3	SD	P-vrijednost
Visina (cm)	74	173,3	170,0	155,0	192,0	168,0	180,0	8,13	0,853
Tjelesna masa (kg)	74	89,8	88,0	54,0	150,0	78,0	100,0	18,61	0,230
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	74	29,8	29,0	18,7	46,3	27,1	31,9	5,28	0,561

#### **4. 2. Klinički podaci: Preživljenje bolesnika u odnosu na komorbiditete**

Objedinjeni klinički podaci i njihov značaj za ishod bolesti (smrt-preživljenje) prikazani su u Tablici 11. Od 74 ispitanika s PE uključenih u istraživanje, 28 (37,8%) je imalo zloćudnu bolest, četvero je preminulo. Iako je zloćudna bolest čimbenik rizika za pojavnost plućne embolije, nije se pokazala statistički značajnom u odnosu na preživljenje ( $\chi^2 = 1,22$ , df = 1, P = 0,264). Arterijsku hipertenziju imala su 44 ispitanika s PE (59,5%), od kojih je šest preminulo. Arterijska hipertenzija nije pokazana kao statistički značajna u odnosu na preživljenje ( $\chi^2 = 2,21$ , df = 1, P-vrijednost = 0,131). Šećernu bolest imalo je 15 ispitanika s PE (20,3%); dvoje je preminulo. Razlika u ishodu u odnosu na šećernu bolest nije pokazana kao statistički značajna ( $\chi^2 = 0,32$ , df = 1, P-vrijednost = 0,566). Sedam ispitanika s PE (9,50%) imalo je fibrilaciju atrijsku, koja je rizični čimbenik za pojavnost plućne embolije. Međutim, razlika u ishodu (smrt-preživljenje) u odnosu na fibrilaciju atrijsku nije statistički značajna ( $\chi^2 = 3,29$ , df = 1, P-vrijednost = 0,071). Od sedam ispitanika s PE koji su u anamnezi imali fibrilaciju atrijsku, dvoje je umrlo. Šest ispitanika s PE imalo je kroničnu bolest bubrega (8,10%), dvoje je preminulo. Razlika u ishodu u odnosu na kroničnu bolest bubrega je statistički značajna ( $\chi^2 = 4,30$ , df = 1, P = 0,043). Sedam ispitanika s PE imalo je kronično zatajenje srca (9,5%), jedan ispitanik je preminuo. Iako je kronično zatajenje srca čimbenik rizika umiranja od plućne embolije, razlika u ishodu nije statistički značajna ( $\chi^2 = 0,21$ , df = 1, P = 0,654). Kroničnu bolest pluća imalo je 12 ispitanika s PE (16,20%), preminuo je jedan ispitanik. Iako je kronična bolest pluća čimbenik rizika umiranja od PE, razlika u ishodu nije statistički značajna ( $\chi^2 = 0,02$ , df = 1, P = 0,882).

Nepokretno je bilo sedam ispitanika s PE (9,50%), dvoje je preminulo. Iako je nepokretnost čimbenik rizika za pojavnost plućne embolije nije se pokazala statistički značajnom u odnosu na preživljenje ( $\chi^2 = 3,29$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,072$ ), u ovoj skupini bolesnika.

**Tablica 11.** Preživljenje ispitanika s PE u odnosu na komorbiditete.

	PREŽIVLJENJE U ODNOSU NA KOMORBIDITETE			
	Ishod	Da	Ne	
<b>Zloćudna bolest</b>	Živi	24 (85,71%)	43 (93,48%)	$\chi^2$ 1,22 $df = 1$ $P = 0,264$
	Umrli	4 (14,29%)	3 (6,52%)	
	Ukupno	28 (37,8%)	46 (62,2%)	
<b>Arterijska hipertenzija</b>	Živi	38 (86,36%)	29 (96,67%)	$\chi^2$ 2,21 $df = 1$ $P = 0,131$
	Umrli	6 (13,64%)	1 (3,33%)	
	Ukupno	44 (59,50%)	30 (40,5%)	
<b>Šećerna bolest</b>	Živi	13 (86,67%)	54 (91,53%)	$\chi^2$ 0,32 $df = 1$ $P = 0,566$
	Umrli	2 (13,33%)	5 (8,47%)	
	Ukupno	15 (20,3%)	59 (79,70%)	
<b>Fibrilacija atrijska</b>	Živi	5 (71,43%)	62 (92,54%)	$\chi^2$ 3,29 $df = 1$ $P = 0,071$
	Umrli	2 (28,57%)	5 (7,46%)	
	Ukupno	7 (9,50%)	67 (90,50%)	
<b>Kronična bolest bubrega</b>	Živi	4 (66,67%)	63 (92,65%)	$\chi^2$ 4,30 $df = 1$ <b>P = 0,043</b>
	Umrli	2 (33,33%)	5 (7,35%)	
	Ukupno	6 (8,10%)	68 (91,90%)	
<b>Kronično zatajenje srca</b>	Živi	6 (85,71%)	61 (91,04%)	$\chi^2$ 0,21 $df = 1$ $P = 0,654$
	Umrli	1 (14,29%)	6 (8,96%)	
	Ukupno	7 (9,5%)	67 (90,5%)	
<b>Kronična bolest pluća</b>	Živi	11 (91,67%)	56 (90,32%)	$\chi^2$ 0,02 $df = 1$ $P = 0,882$
	Umrli	1 (8,33%)	6 (9,68%)	
	Ukupno	12 (16,20%)	62 (83,80%)	
<b>Nepokretnost</b>	Živi	5 (71,43%)	62 (92,54%)	$\chi^2$ 3,29 $df = 1$ $P = 0,072$
	Umrli	2 (28,57%)	5 (7,46%)	
	Ukupno	7 (9,50%)	67 (90,50%)	

### 4. 3. Preživljenje bolesnika u odnosu na parametar PESI

Indeks težine plućne embolije (PESI) je alat kojim se procjenjuje rizik od smrti unutar 30 dana. Na temelju visine izračunatog rizika, bolesnici se razvrstavaju u jedan od pet razreda (Tablica 12). U razredu I (vrlo niski rizik) bilo je 20 (27,0%) ispitanika i svi su preživjeli. U razredu II (niski rizik) bilo je 18 (24,3%) ispitanika i svi su preživjeli. U razredu III (srednji rizik) bilo je 19 (25,7%) ispitanika s PE. Umrli su četiri (21,05%) ispitanika. U razredu IV (visok rizik) bilo je 11 (14,9%) ispitanika, jedan je preminuo (9,09%). U razredu V (vrlo visok rizik) bilo je šest (8,1%) ispitanika od kojih je dvoje umrlo (33,33%). Razlika u preživljenju u odnosu na razrede PESI statistički je značajna ( $\chi^2 = 10,94$ ,  $df = 4$ ,  $P$ -vrijednost = 0,027) (Tablica 12).

**Tablica 12.** Ishod bolesti u odnosu na PESI.

<b>PESI razred</b>	<b>Ishod</b>	<b>N</b>	$\chi^2$ 10,94 df = 4 <b>P = 0,027</b>
<b>I</b>	Živi	20 (100,00%)	
	Umrli	0 (0,00)	
	Ukupno	20 (27,0%)	
<b>II</b>	Živi	18 (100,00%)	
	Umrli	0 (0,00%)	
	Ukupno	18 (24,30%)	
<b>III</b>	Živi	15 (78,95%)	
	Umrli	4 (21,05%)	
	Ukupno	19 (25,70%)	
<b>IV</b>	Živi	10 (90,91%)	
	Umrli	1 (9,09%)	
	Ukupno	11 (14,9%)	
<b>V</b>	Živi	4 (66,67%)	
	Umrli	2 (33,33%)	
	Ukupno	6 (8,1%)	

#### 4. 4. Laboratorijski nalazi

Rezultati deskriptivne statistike dobiveni na temelju laboratorijskih nalaza ispitanika u odnosu na preživljenje prikazani su u Tablici 13. Statistički značajna razlika u ishodu bolesti u odnosu na parametre krvne slike utvrđena je za leukocite ( $10^9/L$ ) (P-vrijednost = 0,013) i za prosječni obujam trombocita u krvi (MPV) (f/L) (P-vrijednost = 0,016) (Tablica 13 i Slika 7).

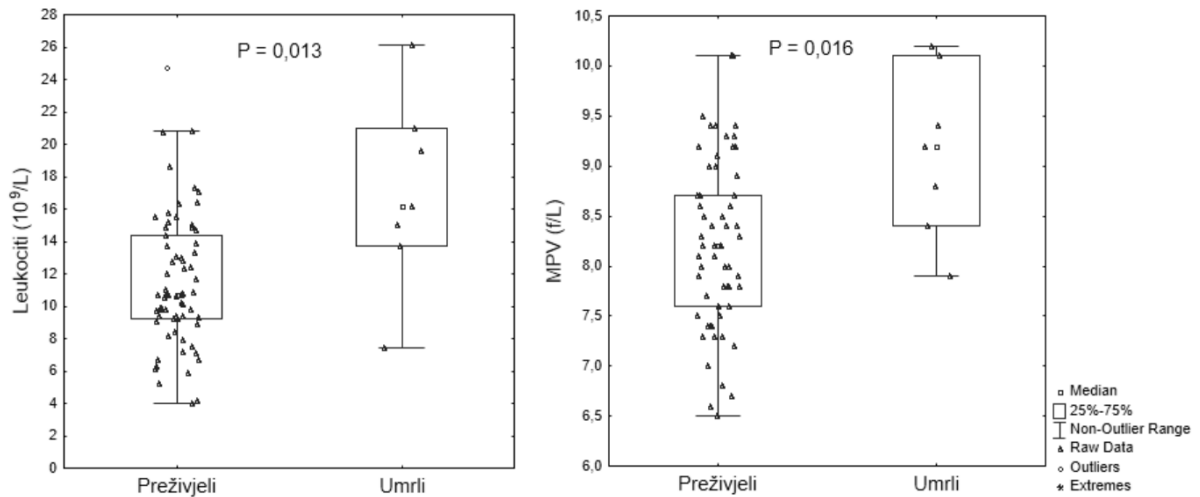
Statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti pokazana je i za parametre funkcije bubrega: ureju (P = <0,001), kreatinin (P = 0,009) i eGFR (P = 0,023) (Tablica 13, Slike 8 i 9). Statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti utvrđena je za glukozu u krvi (GUK) (P = 0,006) (Slika 9). Statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti pokazana je za parametre funkcije jetre: aspartat-aminotransferazu (AST) (P = 0,006) i gama-glutamilttransferazu (GGT) (P = 0,037) (Slika 10). Nije utvrđena statistička značajnost za alanin-aminotransferazu (ALT), alkalnu-fosfatazu (ALP), bilirubin, kolesterol, lipoprotein visoke gustoće (HDL), lipoprotein niske gustoće (LDL) i trigliceride. Statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti pokazana je za parametre koagulacijskog sustava: D-dimere (P = 0,043) i PV (P = 0,038) (Slika 11), a nije pokazana za APTV i fibrinogen. Za parametre funkcije srca, troponin I i NT-proBNP, nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti (Tablica 13).

**Tablica 13.** Značajnost razlika vrijednosti laboratorijskih nalaza ispitanika s PE, u odnosu na ishod bolesti.

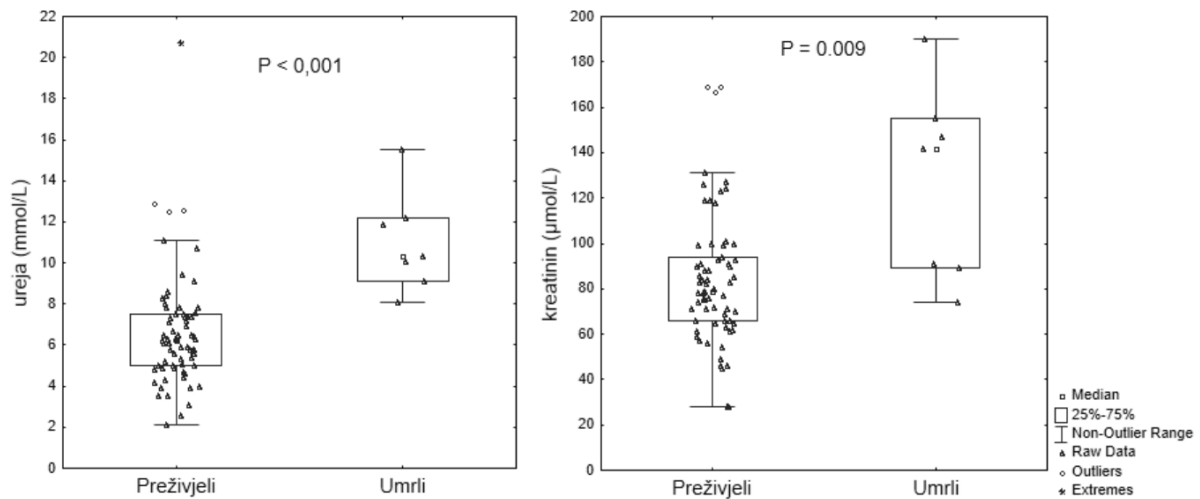
Varijabla	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1	Q3	SD	P vrijednost*
Ureja (mmol/L)	74	7	6,4	2,1	20,7	5	8	3,06	<b>&lt; 0,001</b>
Leukociti ( $10^9/L$ )	74	12	10,8	4	26,1	9,2	14,9	4,52	<b>0,013</b>
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	74	4,6	4,6	2,4	6	4,3	4,9	0,6	0,375
Hemoglobin (g/L)	74	134,3	137	73	170	122	148	17,27	0,189
RDW (%)	68	14,6	13,7	11,8	21,9	13,1	15,2	2,21	0,113
Trombociti ( $10^9/L$ )	74	257,2	233,5	124	726	198	287	93,1	0,346
MPV (fL)	68	8,3	8,3	6,5	10,2	7,7	9	0,89	<b>0,016</b>
CRP (mg/L)	74	70,5	30,6	1,3	385,9	9,8	97,8	87,2	0,733
Kreatinin ( $\mu\text{mol}/L$ )	74	88,1	82,5	28	190	66	99	32,76	<b>0,009</b>
Glukoza (mmol/L)	72	8,5	7,3	4	22,4	6,1	9,3	3,69	<b>0,006</b>
HbA1c (%)	11	6,4	6,1	5,4	7,6	5,8	7,2	0,75	1,000
AST (U/L)	70	52,4	25	13	1368	18	41	161,66	<b>0,006</b>
ALT (U/L)	70	46	24	7	730	17	44	93,16	0,332
GGT (U/L)	60	92,5	36	9	1662	24	64,5	228,18	<b>0,037</b>
ALP (U/L)	59	117,4	78	33	1205	66	103	167,57	0,196
Kalij (mmol/L)	74	4,2	4,2	3,2	5,6	3,9	4,4	0,46	0,904
Natrij (mmol/L)	73	138,7	138	128	160	136	141	4,12	0,217
Bilirubin ( $\mu\text{mol}/L$ )	40	16,9	14	4,8	104,3	8,7	19	16,03	0,241
Kolesterol (mmol/L)	33	4,6	4,7	2,2	6,7	4	5,4	1,12	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	22	10,5	2,8	0,5	173	1,7	3,3	36,32	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	22	2,1	1,1	0,4	25	0,8	1,2	5,12	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	33	1,6	1,6	0,5	3,7	1	1,8	0,72	1,000
D-dimeri (mg/L)	73	3,4	4,3	0,7	5,4	2,1	4,4	1,3	<b>0,043</b>
PV (% aktivnosti)	74	92,8	94	37	134	86	104	18,36	<b>0,038</b>
APTV (s)	36	26,4	26	19	45	23,5	28	5,25	0,488
Fibrinogen (g/L)	31	4,4	4,1	2,3	7,9	3,5	5	1,37	1,000
Troponin I (ng/L)	73	125,4	30,4	0	2029,3	6,4	98,5	292,05	0,171
NT-proBNP (pg/mL)	74	2461,7	717	42,6	35000	156,3	1770,1	5611,58	0,970
SaO <sub>2</sub> (%)	74	93	94,2	67,3	99	91,3	97	5,56	0,114
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	68	79,1	80,8	26	143,1	61,3	95,8	25,56	<b>0,023</b>

\* Mann-Whitney U-test za izračun razlika u odnosu na ishod bolesti.

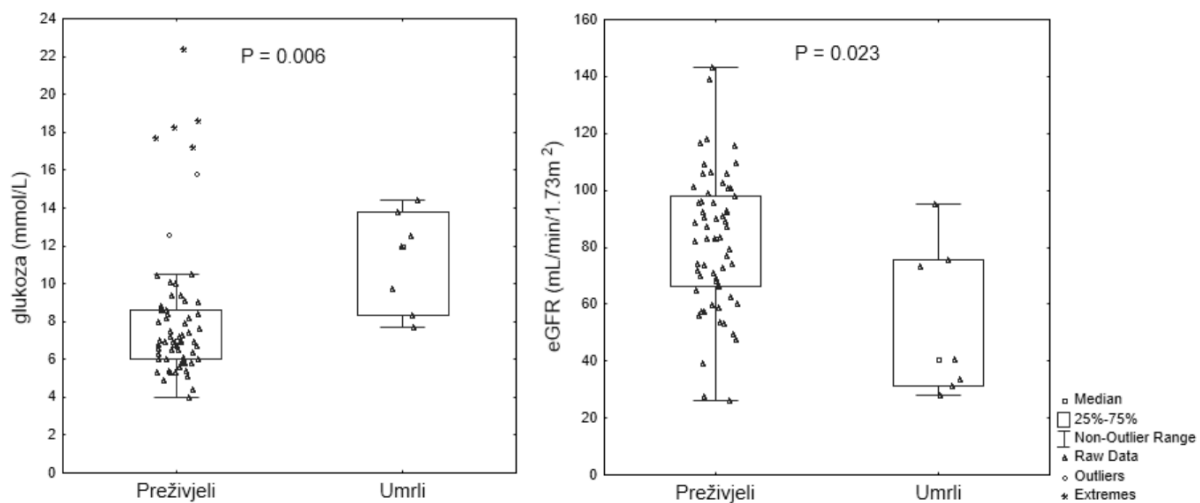




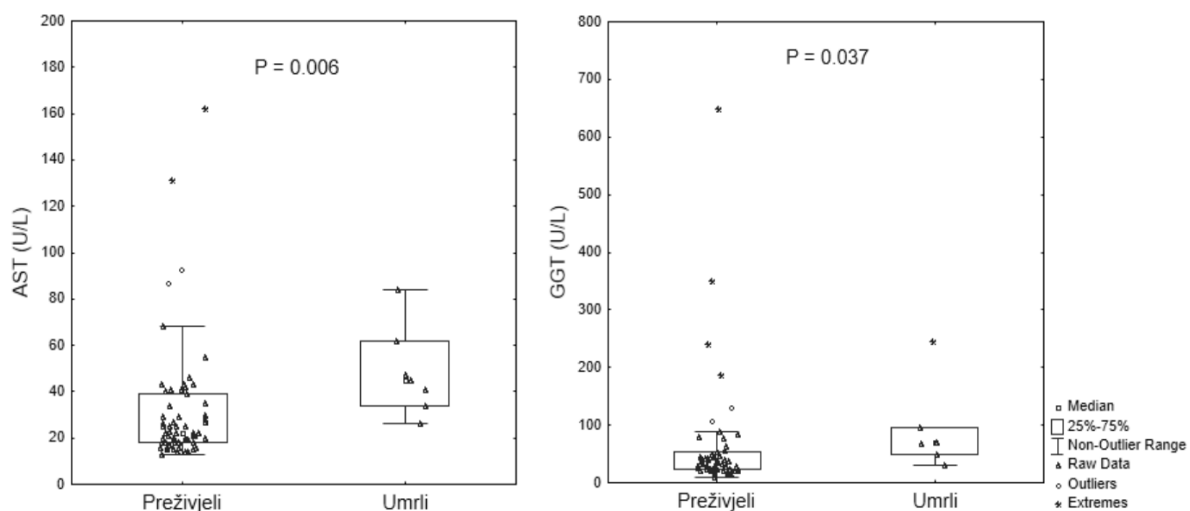
**Slika 7.** Značajnost razlika u vrijednosti leukocita i MPV u odnosu na ishod bolesti.



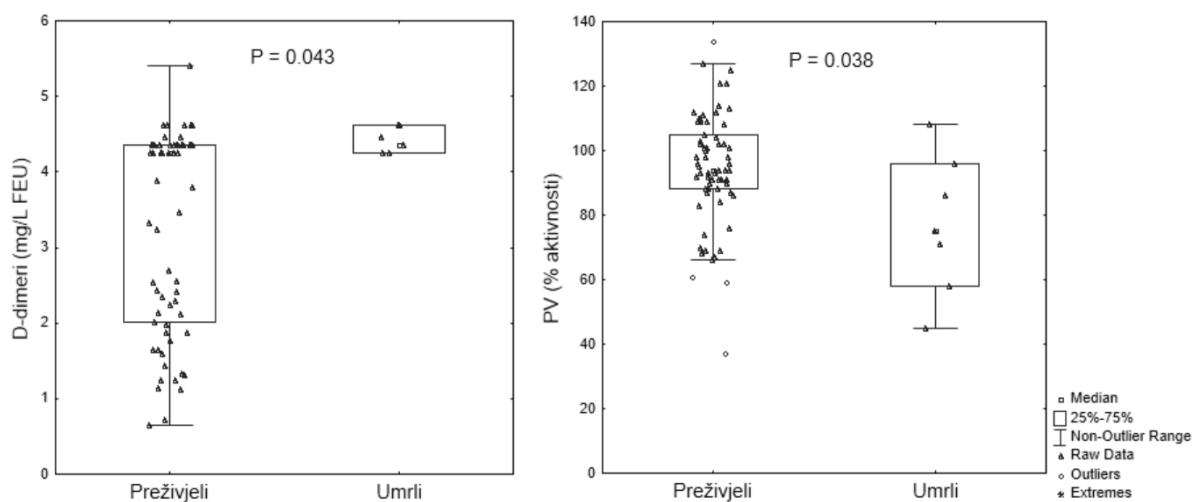
**Slika 8.** Značajnost razlika u vrijednosti ureje i kreatinina u odnosu na ishod bolesti.



**Slika 9.** Značajnost razlika u vrijednosti glukoze i eGFR u odnosu na ishod bolesti.



**Slika 10.** Značajnost razlika u vrijednosti AST i GGT u odnosu na ishod bolesti.

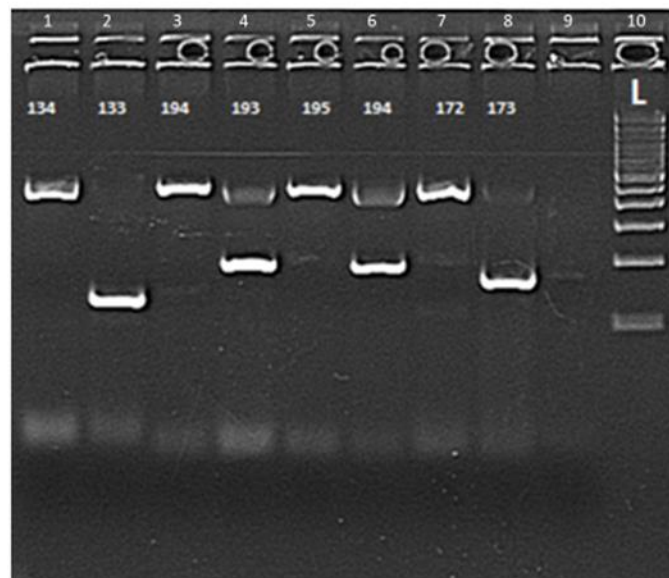


**Slika 11.** Značajnost razlika vrijednosti D-dimera i PV u odnosu na ishod bolesti.

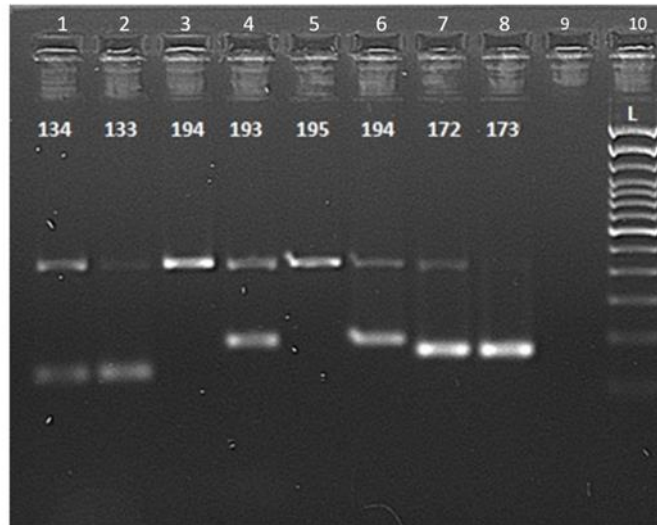
## 4. 5. Sustav ABO i polimorfizam gena *MTHFR* u odnosu na obolijevanje od PE i ishod bolesti

### 4. 5. 1. Genotip *ABO*

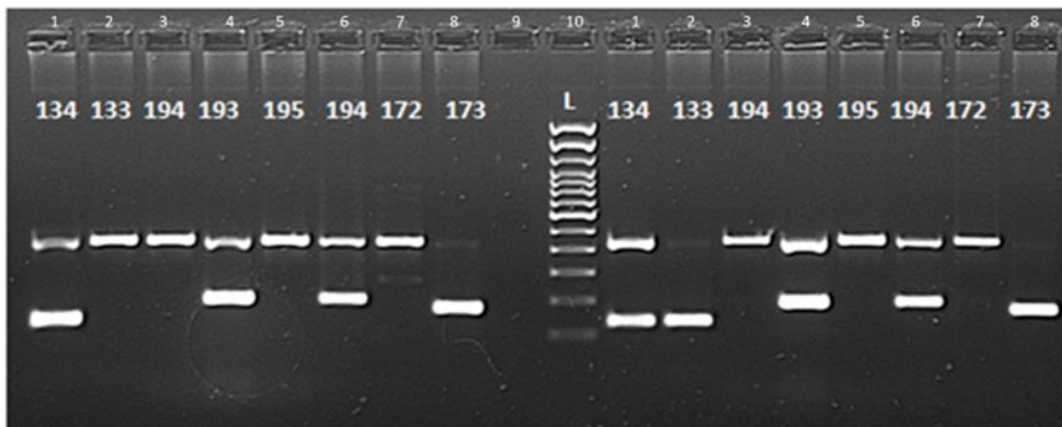
Na temelju analiza napravljenih metodom PCR-SSP (Slike 12-14) određeni su genotipovi *ABO* koji su prikazani u tablici 14. U odnosu na genotip *ABO*, raspodjela kontrolnih ispitanika i oboljelih od PE nije statistički značajno različita, ( $\chi^2 = 7,90$  df = 10, a P-vrijednost = 0,649) (Tablica 14). Razlika u ishodu (smrt-preživljenje) u skupini oboljelih od PE, u odnosu na genotip *ABO*, nije statistički značajna ( $\chi^2 = 4,76$ , df = 9, P-vrijednost = 0,858) (Tablica 15).



**Slika 12.** Genotipizacija krvne grupe A ( $I^A I^A$ ): Metoda PCR-SSP, 1,5% gel agaroze. Linije: 2-133 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Linije 1, 3, 5 i 7: pozitivna interna kontrola-434 pb. Linija 10-molekularni biljeg 100 pb.



**Slika 13.** Genotipizacija krvne grupe A ( $i^{O1}I^{A2}$ ): Metoda PCR-SSP, 1,5% gel agaroze. Linije: 1-134 pb, 2-133 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 7-172 pb, 8-173 pb. Linije 3 i 5: pozitivna interna kontrola-434 pb. Linija 10-molekularni biljeg 100 pb.



**Slika 14.** Genotipizacija krvne grupe O ( $i^{O1}i^{O1}$ ) i A ( $i^{O1}I^{A1}$ ):

Lijevo: Krvna grupa O, genotip  $i^{O1}i^{O1}$ . Metoda PCR-SSP, 1,5% gel agaroze. Linije: 1-134 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Linije: 2, 3, 5, 7: pozitivna interna kontrola-434 pb. Linija 10-molekularni biljeg 100 pb.

Desno: Krvna grupa A, genotip  $i^{O1}I^{A1}$ . Metoda PCR-SSP, 1,5% gel agaroze. Linije: 1-134 pb, 2-133 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Linije 3, 5 i 7: pozitivna interna kontrola-434 pb.

**Tablica 14.** Razdioba genotipova *ABO* između zdravih i bolesnih ispitanika.

Genotip <i>ABO</i>	Zdravi	Bolesni	Ukupno	
<i>i<sup>O1</sup>I<sup>A</sup></i>	23 (25,27%)	16 (21,62%)	39	$\chi^2$ 7,90 df = 10 P = 0,649
<i>I<sup>A</sup>I<sup>B</sup></i>	6 (6,59%)	9 (12,16%)	15	
<i>i<sup>O1</sup>I<sup>B</sup></i>	20 (21,98%)	13 (17,57%)	33	
<i>i<sup>O1</sup>i<sup>O2</sup></i>	5 (5,49%)	4 (5,41%)	9	
<i>i<sup>O1</sup>i<sup>O1</sup></i>	26 (28,57%)	20 (27,03%)	46	
<i>I<sup>A</sup>I<sup>A</sup></i>	5 (5,49%)	5 (6,76%)	10	
<i>I<sup>B</sup>I<sup>B</sup></i>	1 (1,10%)	2 (2,70%)	3	
<i>i<sup>O1</sup>I<sup>A2</sup></i>	3 (3,30%)	1 (1,35%)	4	
<i>i<sup>O2</sup>I<sup>A1</sup></i>	1 (1,10%)	1 (1,35%)	2	
<i>I<sup>A2</sup>I<sup>B</sup></i>	1 (1,10%)	0 (0,00%)	1	
<i>I<sup>A1</sup>I<sup>A2</sup></i>	0 (0,00%)	3 (4,05%)	3	
<b>Ukupno</b>	91	74	165	

**Tablica 15.** Preživljenje bolesnika u odnosu na genotip *ABO*.

Genotip <i>ABO</i>	Živi	Umrli	Ukupno	
<i>I<sup>B</sup>I<sup>B</sup></i>	2 (2,99%)	0 (0,00%)	2	$\chi^2$ 4,76 df = 9 P = 0,858
<i>i<sup>O1</sup>i<sup>O1</sup></i>	17 (25,37%)	3 (42,86%)	20	
<i>i<sup>O1</sup>i<sup>O2</sup></i>	3 (4,48%)	1 (14,29%)	4	
<i>i<sup>O1</sup>I<sup>B</sup></i>	11 (16,42%)	2 (28,57%)	13	
<i>I<sup>A1</sup>I<sup>A1</sup></i>	5 (7,46%)	0 (0,00%)	5	
<i>I<sup>A1</sup>I<sup>B</sup></i>	9 (13,43%)	0 (0,00%)	9	
<i>I<sup>O1</sup>I<sup>A1</sup></i>	15 (22,39%)	1 (14,29%)	16	
<i>I<sup>A1</sup>I<sup>A2</sup></i>	3 (4,48%)	0 (0,00%)	3	
<i>I<sup>O2</sup>I<sup>A1</sup></i>	1 (1,49%)	0 (0,00%)	1	
<i>I<sup>O1</sup>I<sup>A2</sup></i>	1 (1,49%)	0 (0,00%)	1	
<b>Ukupno</b>	67	7	74	

#### 4. 5. 2. Fenotip sustava *ABO*

Raspodjela kontrolnih ispitanika i oboljelih od PE nije statistički značajno različita, u odnosu na fenotip *ABO* ( $\chi^2 = 1,02$ , df = 3, a P-vrijednost = 0,796) (Tablica 16). Razlika u ishodu (smrt-preživljenje) u skupini oboljelih od PE, u odnosu na fenotip *ABO*, nije statistički značajna ( $\chi^2 = 3,615$ , df = 3, P-vrijednost = 0,306) (Tablica 17).

**Tablica 16.** Razdioba svih ispitanika u odnosu na fenotip ABO.

ABO fenotip	Zdravi	Bolesni	Ukupno	$\chi^2$ 1,02 df = 3 P = 0,796
A	32 (35,16%)	26 (35,14%)	58	
AB	7 (7,69%)	9 (12,16%)	16	
B	21 (23,08%)	15 (20,27%)	36	
O	31 (34,07%)	24 (32,43%)	55	
<b>Ukupno</b>	91	74	165	

**Tablica 17.** Preživljenje u odnosu na fenotip ABO.

ABO fenotip	Živi	Umrli	Ukupno	$\chi^2$ 3,615 df = 3 P = 0,306
A	25 (37,31%)	1 (14,29%)	26	
B	13 (19,40%)	2 (28,57%)	15	
AB	9 (13,43%)	0 (0,00%)	9	
O	20 (29,85%)	4 (57,14%)	24	
<b>Ukupno</b>	67	7	74	

#### 4. 5. 3. Polimorfizam *rs1801133* i *rs1801131*

Raspodjela kontrolnih ispitanika i oboljelih od PE statistički nije značajno različita, u odnosu na genotipove *rs1801133* ( $\chi^2 = 0,54$ , df = 2, a P-vrijednost = 0,760) (Tablica 18). Raspodjela kontrolnih ispitanika i oboljelih od PE u odnosu na genotipove *rs1801131* nije statistički značajna ( $\chi^2 = 1,33$ , df = 2, a P-vrijednost = 0,514) (Tablica 19).

**Tablica 18.** Razdioba zdravih i bolesnih ispitanika u odnosu na polimorfizam *rs1801133*.

<i>rs1801133</i>	Zdravi	Bolesni	Ukupno	$\chi^2$ 0,54 df = 2 P = 0,760
CC	40 (43,96%)	34 (45,95%)	74	
CT	39 (43,96%)	28 (37,84%)	67	
TT	12 (13,19%)	12 (16,22%)	24	
<b>Ukupno</b>	91	74	165	

**Tablica 19.** Razdioba zdravih i bolesnih ispitanika u odnosu na polimorfizam *rs1801131*.

<i>rs1801131</i>	Zdravi	Bolesni	Ukupno	$\chi^2$ 1,33 df = 2 P = 0,514
CC	10 (10,99%)	6 (8,11%)	16	
AA	40 (43,96%)	39 (52,70%)	79	
AC	41 (45,05%)	29 (39,19%)	70	
<b>Ukupno</b>	91	74	165	

Razlika u ishodu (smrt-preživljenje) u skupini oboljelih od PE, u odnosu na genotipove *rs1801133*, nije statistički značajna ( $\chi^2 = 0,08$ , df = 2, P-vrijednost iznosi 0,958) (Tablica 20),

a nije statistički značajna niti u odnosu na genotipove *rs1801131* ( $\chi^2 = 1,85$ ,  $df = 2$ , P-vrijednost je 0,396) (Tablica 21).

**Tablica 20.** Razdioba ispitanika s PE u odnosu na polimorfizam *rs1801133*, prema preživljenju.

<i>rs1801133</i>	Živi	Umrli	Ukupno	$\chi^2$ 0,08 df = 2 P = 0,958
<b>CC</b>	31 (46,27%)	3 (42,86%)	34	
<b>CT</b>	25 (37,31%)	3 (42,86%)	28	
<b>TT</b>	11 (16,42%)	1 (14,29%)	12	
<b>Ukupno</b>	67	7	74	

**Tablica 21.** Razdioba ispitanika s PE u odnosu na polimorfizam *rs1801131*, prema preživljenju.

<i>rs1801131</i>	Živi	Umrli	Ukupno	$\chi^2$ 1,85 df = 2 P = 0,396
<b>AA</b>	37 (55,22%)	2 (28,57%)	39	
<b>AC</b>	25 (37,31%)	4 (57,14%)	29	
<b>CC</b>	5 (7,46%)	1 (14,29%)	6	
<b>Ukupno</b>	67	7	74	

Iz rezultata kombinacije polimorfizama *rs1801133* i *rs1801131* vidljivo je da su kombinacije genotipova *rs1801133CC/rs1801131AC* i *rs1801133CT/rs1801131AC* najučestalije u skupini ispitanika s PE (48,28%), dok kombinacije *rs1801133CT/rs1801131CC* i *rs1801133TT/rs1801131CC* nije imao niti jedan ispitanik s PE (Tablica 22). Kombinacije alela s najvećim rizikom za pojavnost PE, *rs1801131CC/rs1801133CT* i *rs1801131CC/rs1801133TT* imaju ekstremnu distribuciju, tj. 0 (siva polja u tablici 22). Naime, ispitanici koji pripadaju ovim kombinacijama bi trebali biti podjednako raspoređeni po redovima i stupcima, ali ovdje to nije tako. Razlika u raspodjeli oboljelih od PE u odnosu na kombinaciju genotipova vezanih uz polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131* statistički je značajna ( $\chi^2 = 15,196$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0,004$ ) (Tablica 22).

**Tablica 22.** Razdioba ispitanika s PE u odnosu na kombinacije genotipova vezanih uz polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131*.

	<i>rs1801133 CC</i>	<i>rs1801133CT</i>	<i>rs1801133 TT</i>	<b>Ukupno</b>	$\chi^2$ 15,196 df = 4 <b>P = 0,004</b>
<i>rs1801131 AA</i>	14 (35,90%) [0 / 14]*	14 (35,90%) [3 / 11]*	11 (28,11%) [0 / 11]*	39 [3 / 36]*	
<i>rs1801131 AC</i>	14 (48,28%) [2 / 12]*	14 (48,28%) [0 / 14]*	1 (3,45%) [1 / 0]*	29 [3 / 26]*	
<i>rs1801131 CC</i>	6 (100,00%) [1 / 5]*	0 (0,00%) [0 / 0]*	0 (0,00%) [0 / 0]*	6 [1 / 5]*	
<b>Ukupno</b>	34 [3 / 31] *	28 [3 / 25]*	12 [1 / 11]*	74 [7 / 67]*	

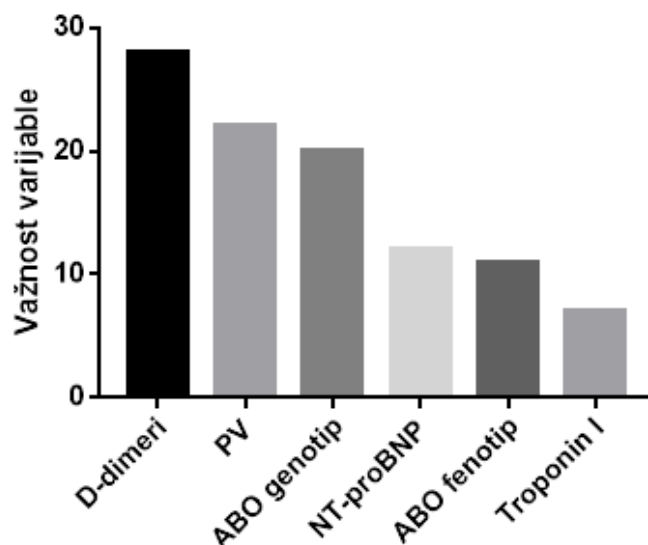
\* omjer umrli / preživjeli

#### **4. 6. Multivarijatna analiza rizičnih čimbenika uporabom programa rpart**

Uporabom algoritma rpart, implementiranog u programskom jeziku R (verzija 3.4.3), analiziran je utjecaj genotipa *ABO* i biokemijskih parametara na smrtnost bolesnika tijekom 30 dana. Ovaj okvir vremena je najčešće korišteno razdoblje za analizu rizika povezanog s akutnim kardiovaskularnim oboljenjima (124).

Slika 15 prikazuje hijerarhiju varijabli po važnosti: 1. D-dimeri; 2. protrombinsko vrijeme (PV); 3. genotip *ABO*; 4. NT-proBNP; 5. fenotip *ABO*; 6. troponin I. Prve tri varijable imaju najveću informacijsku važnost. To se vidi po tome što ih algoritam rpart koristi za izgradnju stabla preživljenja (Slika 16), dok ostale varijable isključuje.



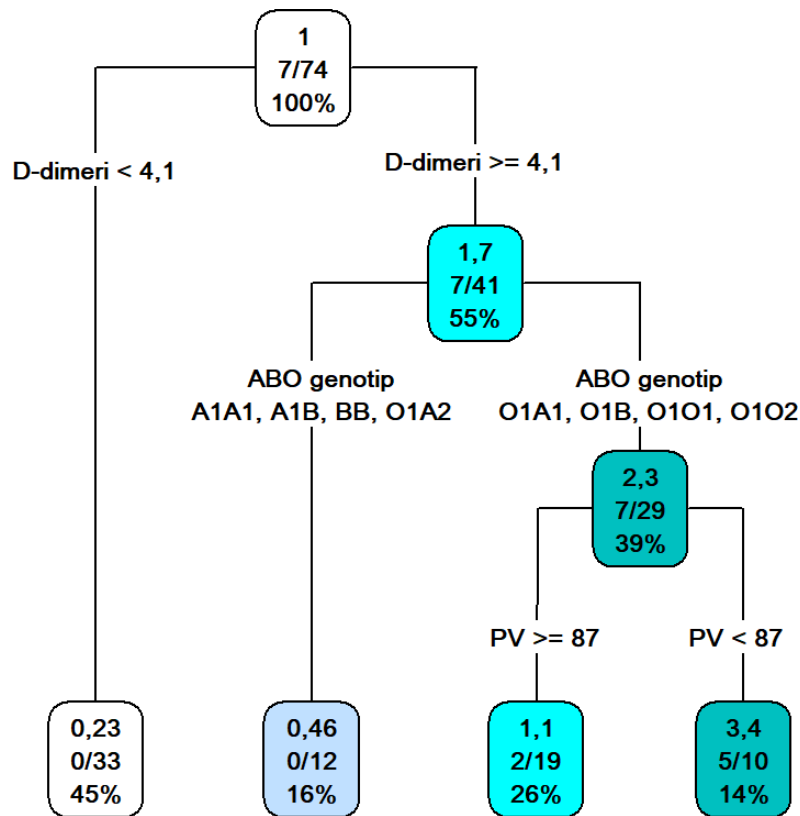


**Slika 15.** Važnost varijabli u odnosu na njihov utjecaj na omjer rizika (HR).

Stablo preživljenja, prikazano na slici 16, treba tumačiti na sljedeći način:

1. Polazni čvor ima 74 ispitanika, od kojih je sedam umrlo tijekom 30 dana. Njihov HR je 1.
2. Od polaznog čvora vode dvije grane koje za razvrstavanje 74 bolesnika koriste D-dimere. Lijeva grana koristi vrijednosti D-dimera manje od 4,1 mg/L. Od 33 ispitanika (45%) u završnom listu do kojeg vodi ova grana nitko ne umire i ovi ispitanici imaju izuzetno nizak HR, samo 0,23. Desna grana, koja koristi vrijednost D-dimera veću ili jednaku 4,1 mg/L, vodi do čvora koji obuhvaća 41 ispitanika (55%), od kojih je sedam umrlo. HR ispitanika objedinjenih u ovome čvoru iznosi 1,7.
3. Od drugog čvora odluke vode dvije grane, izvedene na temelju genotipa *ABO*. Na temelju ove dvije grane, skupina od 41 ispitanika je dodatno razvrstana u dvije podskupine.  
Lijeva grana temelji se na genotipovima  $I^{A1}I^{A1}$ ,  $I^{A1}I^B$ ,  $I^B I^B$ ,  $i^{O1}I^{A2}$  i vodi do završnoga lista koji obuhvaća 12 (16%) ispitanika, od kojih niti jedan nije umro. Njihov HR je 0,46 što znači da su to ispitanici s niskim rizikom umiranja.  
Desna grana temelji se na genotipovima  $i^{O1}I^{A1}$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$  i vodi do trećega čvora odluke u kojem je obuhvaćeno 29 ispitanika (39%), od kojih je sedam umrlo. Njihov HR je 2,3 što znači da ovi bolesnici imaju visok rizik od umiranja.
4. Od trećega čvora odluke vode dvije grane koje koriste vrijednost protrombinskog vremena (PV). Lijeva grana zasniva se na  $PV \geq 87\%$ , te vodi do završnoga lista koji

obuhvaća 19 bolesnika (26%), od kojih je dvoje umrlo. Njihov HR je 1,1 što ukazuje da su to ispitanici sa srednjim rizikom umiranja. Desna grana, s  $PV < 87\%$ , vodi do završnoga lista koji obuhvaća 10 ispitanika (14%) od kojih je pet umrlo. Njihov HR je 3,4, što znači da ovi bolesnici predstavljaju izrazito rizičnu skupinu za smrtni ishod.



**Slika 16.** Stablo preživljenja izrađeno uporabom algoritma rpart prikazuje podskupine s maksimalnom razlikom u omjeru rizika (HR).

Dobiveni rezultati jasno ukazuju da se programom rpart može, na osnovu biokemijskih parametara i genotipa *ABO*, ispitanike razvrstati u tri prognostičke podskupine s obzirom na preživljenje od PE. Ovakva snaga razvrstavanja odlika je uspješnog prognostičkog sustava. Po položaju u stablu preživljenja vidi se da najveći informacijski sadržaj ima koncentracija D-dimera, potom genotip *ABO*, te PV.

#### 4. 7. Analiza općih čimbenika mortaliteta uporabom klasifikatora JRIP i PART

Napravljena je i dodatna analiza čimbenika mortaliteta tijekom 30 dana, uporabom klasifikacijskih programa JRIP i PART. Oni se razlikuju od prethodno uporabljenoga programa rpart po tome što ne analiziraju HR, koji prati dinamiku umiranja u vremenu, već samo razvrstavaju ispitanike u preživjele i umrle. Program JRIP je specifičan po tome što poseban

naglasak stavlja na ispravno razvrstavanje ispitanika manje skupine. To je pogodno za našu studiju, u kojoj je broj umrlih bio malen (sedam umrlih), pa je bitno utvrditi koji su čimbenici povezani s ovom podskupinom. Program PART je srodan programu JRIP, ali ne daje prednost manjoj podskupini. Rezultati PART mogu se, osim kao pravila, izraziti i u obliku stabla odluke, što omogućuje interpretaciju rezultata slikom. Ovu verziju algoritma PART nazivamo J48.

Klasifikator JRIP stvara samo dva pravila za razvrstavanje ispitanika u preživjele i umrle:

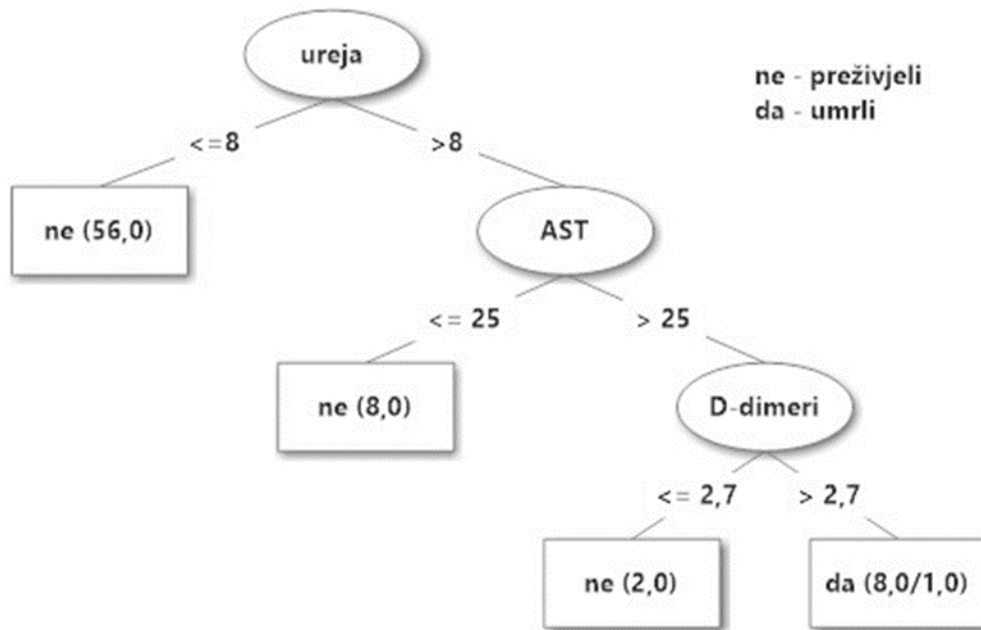
1. Ako je ureja  $\geq 8,1$  mmol/L i AST  $\geq 26$  U/L onda ispitanik umire. Ovo pravilo izdvaja 10 ispitanika od kojih je sedam doista umrlo.
2. Ispitanici koji nisu obuhvaćeni prvim pravilom sigurno preživljavaju. Ovo pravilo obuhvaća 64 preživjela ispitanika.

Točnost klasifikatora JRIP je 95,9% s kappa-statistikom od 0,80.

Klasifikator PART je identificirao četiri pravila, čija je hijerarhija sljedeća:

1. Ako je ureja  $\leq 8$  mmol/L, nema umiranja. Ovo pravilo obuhvaća 56 ispitanika i svi su pravilno razvrstani.
2. Ako je AST manji ili jednak 25 U/L, nema umiranja. Ovo pravilo obuhvaća osam ispitanika i svi su pravilno razvrstani.
3. Ako je koncentracija D-dimera  $> 2,7$  mg/L ispitanici umiru. Ovo pravilo obuhvaća osam ispitanika, od kojih sedam doista umire, a jedan je neispravno razvrstan u skupinu umrlih.
4. Ako je koncentracija D-dimera  $\leq 2,7$  mg/L nema umiranja. Ovo pravilo obuhvaća dva pravilno razvrstana ispitanika.

Točnost klasifikatora PART je 98,6% i samo je jedan ispitanik pogrešno razvrstan, to jest jedan preživjeli ispitanik je razvrstan u skupinu umrlih. Kappa-statistika klasifikatora PART je 0,93. Pravila klasifikatora PART mogu se prikazati kao stablo odluke koje je prikazano na slici 17.



**Slika 17.** Identifikacija čimbenika povezanih s mortalitetom tijekom 30 dana uporabom klasifikatora PART.

#### 4. 7. 1. Utjecaj polimorfizama gena *MTHFR* na mortalitet tijekom 30 dana

Klasifikacijskim programom PART može se pokazati povezanost polimorfizma gena za *MTHFR* s ishodom bolesti. PART identificira četiri pravila koja imaju sljedeći redoslijed:

1. Ako je  $eGFR > 40,6 \text{ mL/min/1,73m}^2$  i  $rs1801131 = AA$  nema umiranja. Od 36 bolesnika obuhvaćenih ovim pravilom nitko nije umro, što znači da su pravilno razvrstani.
2. Ako je  $rs1801131 = AC$  i  $rs1801133 = CT$  nema umiranja. Od 14 ispitanika obuhvaćenih ovim pravilom, 13 nije umrlo. Jedan je ispitanik umro.
3. Ako je  $rs1801133 = CC$  i  $NT\text{-proBNP} > 111,4 \text{ pg/mL}$  nema umiranja. Od 18 ispitanika obuhvaćenih ovim pravilom, 17 nije umrlo. Jedan je ispitanik umro.
4. Ispitanici koji nisu obuhvaćeni ovim pravilima umiru (6,0 / 1,0). Od šest ispitanika obuhvaćenih ovim pravilom pet je doista umrlo, a jedan je preživio.

Točnost navedenih pravila je 95,9%. Samo su tri bolesnika pogrešno razvrstana. Dva umrla bolesnika su razvrstana u skupinu preživjelih, što znači da PART uspješno predviđa umiranje za pet od sedam umrlih. Jedan preživjeli bolesnik je razvrstan u skupinu umrlih, što znači da program uspješno predviđa za 64 od 65 preživjelih.

## 5. RASPRAVA

Plućna embolija je akutni kardiovaskularni događaj s visokom ranom stopom smrtnosti koja se, unatoč napretku u dijagnostici i liječenju tijekom posljednjih 30 godina, nije značajno promijenila. Plućna embolija je posljedica interakcija brojnih čimbenika rizika. Trenutno poznati nasljedni rizični čimbenici odnose se na ne-OO genotipove *ABO*, polimorfizme gena za protrombin G20210A (čimbenik II) i gena za čimbenik V (60-62). Stečeni čimbenici rizika uključuju dob, debljinu, pušenje, alkohol, oralne kontraceptive, nadomjesno hormonsko liječenje, osobnu anamnezu venskih tromboembolija, zloćudnu bolest, nepokretnost, zatajenje srca ili dišnog sustava (88,168).

Rezultati studija o utjecaju nasljednih čimbenika rizika za pojavnost PE, kao što su na primjer polimorfizmi gena za MTHFR, proturječni su (169-172). Ray i suradnici proveli su meta-analizu 31 objavljene studije (4901 ispitanik s VTE i 7886 kontrola) u razdoblju od 1990. do 2001. godine, kojima se istraživala povezanost polimorfizma *rs1801133* s rizikom pojavnosti venskih tromboembolija (173). Zaključili su da je učestalost homozigota *rs1801133 TT* bila nešto viša u ispitanika s VTE (14,3%) u odnosu na kontrolne ispitanike (11,7%). Meta-analizom koja je obuhvatila 24 studije (2339 ispitanika s VTE) provedene u kineskoj populaciji zaključeno je da specifični genotipovi vezani uz polimorfizam *rs1801133* povećavaju rizik od venskih tromboembolijskih incidenata (*T vs C*: OR = 1,48, 95% CI= 1,32-1,67; *CT vs CC*: OR = 1,33, 95% CI = 1,11-1,60; *TT vs CC*: OR = 2,11, 95% CI = 1,79-2,48; *TT+CT vs CC*: OR = 1,53, 95% CI = 1,28-1,84; *TT vs CT + CC*: OR = 1,83, 95% CI = 1,59-2,11) (174).

U ovom području medicine su, osim navedenih, provedene mnogobrojne meta-analize uporabom različitih kriterija: (a) 99 studija o povezanosti polimorfizama *rs1801133* i *rs1801131* s pojavnosću venskih tromboembolija (duboka venska tromboza i PE); (b) 97 studija na 30650 ispitanika u kojima je istražena povezanost polimorfizma *rs1801133* s rizikom od nastanka VTE; (c) 19 studija na 5658 ispitanika kojima je istražena povezanost polimorfizma *rs1801131* s rizikom nastanka VTE; (d) 11 studija o povezanosti polimorfizama *rs1801133* i *rs1801131* s pojavnosću PE. Zaključeno je da genotip *CC* vezan uz polimorfizam *rs1801131* može povećati rizik od pojave PE u pojedinim etničkim skupinama, dok je genotip *TT* vezan uz polimorfizam *rs1801133* predložen kao čimbenik rizika za razvoj duboke venske tromboze i PE u bijelaca, te u stanovnika istočne i zapadne Azije (175).

Naše istraživanje provedeno je na skupini od 74 ispitanika s PE, pri čemu je kao kontrola korištena skupina od 91 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi, bez koagulacijskih poremećaja.

Svrha kontrolne skupine je bila identifikacija čimbenika rizika definiranih u hipotezi i ciljevima istraživanja, za pojavu bolesti. U skupini od 74 ispitanika s PE analizirani su čimbenici rizika umiranja tijekom 30 dana, što je standardni vremenski okvir. Kao klasični primjeri bodovnih sustava za predviđanje mortaliteta mogu se navesti EuroSCORE i PESI (176,177). Ovaj dio istraživanja ima prirodu prospektivne studije.

Osnovni problem u analizi čimbenika rizika umiranja, u našem istraživanju, je mali broj umrlih ispitanika (sedam preminulih ispitanika, odnosno 9,46%). Zbog toga se klasične statističke metode ne mogu upotrijebiti; nemaju dovoljnu snagu za razlikovanje podskupina. Zbog toga je naglasak u analizi podataka stavljen na analizu preživljenja metodama strojnog učenja kojima se, za razliku od klasične statistike, mogu identificirati varijable bitne za opis jako male podskupine (svega dva ispitanika) (165-167). Ovaj se pristup zasniva na algoritamskoj teoriji informacija, prema kojoj je najbolja mjera informacijskoga sadržaja nekog skupa podataka najmanji algoritam koji taj skup opisuje dovoljno dobro, po određenome kriteriju. Ovaj pristup nema ranije navedeno ograničenje, to jest, omogućuje donošenje zaključka o čimbenicima rizika na uzorku koji je znatno manji od veličine uzorka koji se obrađuje metodama klasične statistike, koje se rutinski koriste u analizi genskih polimorfizama.

Svi analizirani podaci podijeljeni su u četiri podskupine, zbog lakše organizacije i interpretacije: demografski podaci, klinički podaci, laboratorijski podaci te analizirani biljezi: polimorfizmi *rs1801133* i *rs1801131*, genotipovi i fenotipovi *ABO*.

## **5. 1. Plućna embolija i genotipovi *rs1801131* i *rs1801133***

Svim ispitanicima u skupini s PE i u kontrolnoj skupini određeni su genotipovi s obzirom na polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131*, kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u njihovoj zastupljenosti. Uporabom testa hi-kvadrat nije dokazana statistički značajna razlika. Može se zaključiti da je prevalencija genotipova vezanih uz polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131* gotovo jednaka u skupini bolesnih i zdravih ispitanika ( $P = 0,760$  i  $P = 0,514$ ; Tablice 18 i 19). Statistička razlika u odnosu na preživljenje i genotipove vezane uz polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131* također nije značajna, kada se svaki polimorfizam analizira zasebno ( $P = 0,958$  i  $P = 0,396$ ; Tablice 20 i 21). Zbog toga se ovi polimorfizmi, zasebno, ne mogu povezati s ishodom PE. Međutim kada se analizira kombinacija genotipova vezanih uz ove polimorfizme u odnosu na pojavnost PE, postaje razvidno da kombinacije polimorfizama *rs1801133CT/rs1801131CC* i *rs1801133TT/rs1801131CC*, koje nose najveći rizik za pojavu

PE (40), nije imao niti jedan ispitanik s PE (Tablica 22). Multivarijatna analiza nije izdvojila polimorfizme *rs1801133* i *rs1801131* kao varijable sa značajnim informacijskim sadržajem.

## 5. 2. Plućna embolija i sustav ABO

Učestalost pet osnovnih alela u hrvatskoj populaciji je slijedeća:  $i^{O1}$  - 0,62,  $i^{O2}$  - 0,025,  $I^{A1}$  - 0,21,  $I^{A2}$  - 0,035 i  $I^B$  - 0,11. Ukoliko rezultate usporedimo s drugim europskim narodima tada, prema učestalosti alela  $I^B$ , pripadamo istoku Europe (178).

Analiza rizika na temelju genskih analiza je popularan pristup stvaranja mogućih modela predviđanja pojavnosti bolesti. Ipak, postoji konsenzus o tome koji polimorfizmi trebaju biti istraženi kako bi se pravilno procijenila povezanost lokusa *ABO* s rizikom od nastanka PE (179).

Morelli i suradnici su u studiji na 474 ispitanika s VTE zaključili da nositelji alela  $I^{A1}$  i  $I^B$  imaju dva puta povećan rizik (OR 2,0; 95% granice pouzdanosti 1,4-2,8) od duboke venske tromboze (180). Dodatno su pokazali da ne-O polimorfizmi snažno utječu na pojavnost tromboze u nositelja polimorfizma za čimbenik zgrušavanja V (180). Meta-analizom 21 studije o povezanosti genotipova *ABO* i venskih tromboembolija, zaključeno je da kombinacije alela  $I^{A1}I^{A1}$ ,  $I^{A1}I^B$  i  $I^B I^B$  imaju najveći rizik za pojavnost VTE (60).

Tirado i suradnici proučavali su utjecaj krvnih grupa ABO i čimbenika VIII (FVIII) na nastanak venskih tromboembolija u 250 ispitanika (181). Zaključili su da su ne-O krvne grupe i visoka vrijednost FVIII, u kombinaciji s alelom  $I^{A1}$ , nezavisni čimbenici rizika za pojavnost VTE (181).

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali statistički značajnu razliku u razdiobi genotipova *ABO* između ispitanika s PE i zdravih ispitanika; prevalencija je gotovo jednaka u skupini bolesnih i zdravih ispitanika (Tablica 14,  $P = 0,649$ ). Nije dokazana niti statistički značajna razlika učestalosti genotipova *ABO* između preživjelih i umrlih ispitanika s PE (Tablica 15,  $P = 0,858$ ).

## 5. 3. Značaj D-dimera, genotipa ABO i PV u odnosu na metodu analize

Dobiveni rezultati upućuju da se univarijatnom analizom čimbenika rizika ne može dobiti nedvosmislen uvid u njihovu eventualnu povezanost sa smrtnim ishodom. Zbog toga je poseban naglasak u našem istraživanju stavljen na multivarijatnu analizu, uporabom metoda strojnoga

učenja. Ovakva analiza temelji se na interakciji varijabli i njihovom nelinearnom odnosu. Zbog toga je pogodna za identifikaciju i kvantifikaciju čimbenika rizika.

U analizi su korištena dva pristupa. Prvi pristup temeljio se na analizi preživljenja uporabom programa rpart, kojim se polazna skupina ispitanika s PE rastavlja u podskupine s maksimalnom razlikom u odnosu na rizik, a što se zasniva na kvantifikaciji omjera rizika (HR). Drugi pristup temeljio se na jednostavnoj klasifikaciji ispitanika s PE, u umrle i preživjele tijekom praćenja kroz 30 dana, uporabom klasifikacijskih programa PART, JRIP i J48.

Program rpart je jedan od najkvalitetnijih programa za analizu čimbenika rizika i prognostičkih parametara u složenim biomedicinskim studijama. Najveća prednost mu je jednostavna interpretacija rezultata. Ovim su programom izdvojene tri varijable - čimbenici rizika povezani s umiranjem u oboljelih od akutne plućne embolije: D-dimeri, genotip *ABO* i protrombinsko vrijeme (PV). Međutim NT-proBNP, fenotip *ABO* i troponin I također posjeduju određeni informacijski sadržaj (Slika 15).

Informacijski sadržaj kombinacije D-dimera, genotipa *ABO* i PV je toliko visok, da su sami dostatni za opis relativnoga rizika od umiranja. Rezultati su prikazani na slici 16, kao stablo preživljenja. Izdvajanje varijabli primjenom ovog programa daje nam jasan uvid u njihovu važnost. Opreznim tumačenjem, ovakvo izdvajanje može imati praktični medicinski značaj zbog toga što na smislen način opisuje relativan rizik od umiranja. Položaj varijable u stablu preživljenja objašnjava njezin informacijski sadržaj - što je varijabla bliža vrhu stabla, to je njezin informacijski sadržaj za objašnjenje omjera rizika veći.

Na samom vrhu stabla preživljenja nalaze se D-dimeri (Slika 16), koji odražavaju aktivaciju sustava zgrušavanja krvi i fibrinolize, a nastaju nakon što plazmin razgradi fibrinski ugrušak (182). Dugogodišnja klinička praksa pokazala je da normalne vrijednosti D-dimera mogu, s velikom sigurnošću, isključiti postojanje PE. Na temelju tih iskustava napravljene su smjernice i postupnici dijagnostičke obrade bolesnika sa sumnjom na PE, koje se primjenjuju u svakodnevnom radu s bolesnicima. U dosadašnjim studijama, koncentracija D-dimera izdvojena je kao prognostički čimbenik umiranja u oboljelih od PE (124,183,184). U našem istraživanju, u skupini ispitanika s PE koji su imali D-dimere manje od 4,1 mg/L, niti jedan ispitanik nije preminuo (Slika 16). I univarijatnom analizom je pokazana statistički značajna razlika u ishodu bolesti u odnosu na koncentraciju D-dimera ( $P = 0,043$ ) (Tablica 13 i Slika 11).



Genotip *ABO* je druga varijabla izdvojena u stablu preživljenja (Slika 16). U ispitanika s vrijednošću D-dimera jednakom ili većom od 4,1 mg/L, genotip *ABO* predstavlja sljedeći čimbenik relativnog rizika umiranja. Unutar te podskupine, niti jedan ispitanik koji je bio nositelj jednog od genotipa:  $I^A I^A$ ,  $I^A I^B$ ,  $I^B I^B$  i  $i^{O1} I^A2$  nije preminuo, a sedam ispitanika koji su preminuli imali su jedan od sljedećih genotipova:  $i^{O1} I^A1$ ,  $i^{O1} I^B$ ,  $i^{O1} i^{O1}$  i  $i^{O1} i^{O2}$  (Slika 16). Univarijatnom analizom nije pokazana statistički značajna razlika u ishodu bolesti u odnosu na genotip *ABO* ( $P = 0,858$ ) (Tablica 15).

Ovisno o vrijednosti protrombinskog vremena, kao treće izdvojene varijable, ispitanici se mogu razvrstati u podskupine srednjeg ili izrazito visokog rizika od umiranja. U dva umrla ispitanika je vrijednost PV bila jednaka ili veća od 87% (srednji rizik ili HR 1,1), a preostalih pet umrlih ispitanika imalo je vrijednost PV manju od 87% (visok rizik ili HR 3,4). Univarijatnom analizom je također utvrđena statistički značajna razlika u ishodu bolesti u odnosu na PV ( $P = 0,038$ ) (Tablica 13, Slika 11).

Dosadašnjim je studijama, kojima je istražena prediktivna vrijednost laboratorijskih parametara, utvrđeno da PV ima utjecaj na mortalitet u različitim bolestima (185-187). Rezultati studije na 244 ispitanika s akutnom PE, koji od ranije nisu uzimali antikoagulantne lijekove, pokazali su da je PV značajan čimbenik rizika umiranja (HR: 1,103, 95% CI: 1,014-1,199,  $P = 0,022$ ) (188).

#### **5. 4. Značaj vrijednosti troponina**

Određivanje koncentracije troponina je, zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti, zlatni standard u dijagnostici infarkta miokarda. Povišene vrijednosti troponina nalaze se u 30% do 50% bolesnika s plućnom embolijom. Troponin izravno ukazuje na nekrozu stanica mišića srca koja je, u PE, posljedica ishemijske desne klijetke zbog smanjenja dijastoličke i sistoličke komponente koronarne opskrbe, uslijed akutnog tlačnog opterećenja. Smatra se da povišenje razine troponina u oboljelih od PE odražava težinu kliničke slike i prvenstveno se koristi za podjelu bolesnika u podskupine s određenim rizikom umiranja (145).

U našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika između preživjelih i umrlih ispitanika s PE u odnosu na koncentraciju troponina I (Tablica 13,  $P = 0,171$ ). Multivarijatna analiza izdvaja troponin I kao varijablu odluke, iako u njoj ne nalazi dovoljno visok informacijski sadržaj. Rezultati našeg istraživanja najvjerojatnije su posljedica malog uzorka, odnosno malog broja umrlih ispitanika s PE (sedam ispitanika).

Postoje brojna istraživanjima kojima se pokušava odrediti prognostička vrijednosti troponina u predviđanju ishoda bolesti. Prospektivnom studijom na 106 ispitanika s PE, pokazano je da je povišenje razine troponina povezano s povećanim mortalitetom (189). Velikom meta-analizom, kojom se ispitala razina troponina u 1985 bolesnika s PE, utvrđeno je da je svako povećanje koncentracije troponina povezano s do peterostrukim povećanjem rizika od umiranja (147). Meta-analizom koja je uključila 10482 ispitanika s PE, utvrđena je povezanost povećane koncentracija troponina s povećanim rizikom od rane smrti (OR = 4,33) (190). Rezultati istraživanja koje je proveo Janata na 737 bolesnika s PE pokazali su povezanost troponina s četverostruko većim rizikom od umiranja tijekom hospitalizacije i trostruko većim rizikom umiranja u jednogodišnjem praćenju (191). Prema dosadašnjim analizama, još uvijek nije moguće jasno utvrditi vrijednost troponina I koja bi pouzdano upućivala na povećani rizik umiranja u oboljelih od PE.

U bolesnika s akutnom plućnom embolijom, u kojih postoji disfunkcija desne klijetke, povišene vrijednosti troponina su najpouzdaniji pokazatelj loše prognoze. U studiji iz 2004. godine utvrđeno je da je 33% preminulih ispitanika s PE imalo povišene vrijednosti troponina (192).

S druge strane, meta-analiza koju je proveo Jimenez, na svim studijama koje su od 1980. do 2008. godine istraživale prognostičku vrijednost troponina u PE, nije dokazala povezanost povišenih vrijednosti troponina i lošijeg ishoda bolesti (193).

## **5. 5. Značaj NT-proBNP**

U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika između preživjelih i umrlih ispitanika s PE, u odnosu na koncentraciju NT-proBNP (Tablica 13, P = 0,970). Multivarijatna analiza izdvaja vrijednost NT-proBNP kao jednu od varijabli odluke, međutim u njoj ne nalazi dovoljno visok informacijski sadržaj (Slika 15).

Iako se uloga natrijuretskih peptida u bolesnika s akutnom PE istraživala, brojna pitanja ostala su otvorena zbog nekonzistentne metodologije u istraživanjima, relativno malih skupina ispitanika, vremena u kojima se određivala koncentracija natrijuretskih peptida i poteškoća u definiranju pozitivnog, odnosno negativnog nalaza. Većina autora se slaže da povišene vrijednosti natrijuretskih peptida mogu biti čimbenik rizika nepovoljnog ishoda u PE (136,139). Prema rezultatima meta-analize Coutance i suradnika koja je uključivala 12 studija (868 ispitanika) povišene vrijednosti su bile udružene s povišenim rizikom od umiranja i nastankom drugih komplikacija bolesti (194). Analiza u 113 ispitanika s PE je pokazala da je povećanje razine NT-proBNP povezano s deveterostrukim - u hemodinamski nestabilnih bolesnika,

odnosno šesterostrukim povećanjem rizika od smrti u hemodinamski stabilnih bolesnika s PE (195).

## 5. 6. Značaj i vrijednost multivarijatne analize

Prema rezultatima našeg istraživanja, ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji fenotipova ABO između zdravih ispitanika i ispitanika s PE (Tablica 16,  $P = 0,796$ ). Statistički značajna razlika nije nađena niti usporedbom učestalosti fenotipova ABO između preživjelih i umrlih (Tablica 17,  $P = 0,306$ ). Umrli ispitanici s PE imali su genotipove ABO koji su fenotipski O i ne-O, što nas dovodi do promišljanja da rizik od umiranja ovisi i o drugim čimbenicima rizika. Naime, multivarijatna analiza izdvaja fenotip ABO kao varijablu odluke, međutim u njoj ne nalazi dovoljno visok informacijski sadržaj.

Dosadašnja istraživanja prvenstveno su se orijentirala na ulogu fenotipa ABO u odnosu na umiranje od pojedinih bolesti, ali rijetka su istraživanja o utjecaju genotipa ABO na umiranje oboljelih od PE. Povezanost fenotipova ne-O krvnih grupa s kardiovaskularnom smrtnošću može biti posljedica viših koncentracija vWF i čimbenika VIII (196). U osoba s ne-O krvnim grupama otkrivene su 25% do 30% više razine vWF (197). Pokazalo se da su više razine vWF glavna poveznica s povećanim umiranjem od kardiovaskularnih bolesti (198).

Neliječena akutna PE povezana je sa značajnom stopom umiranja (čak 30%), dok je stopa smrtnosti dijagnosticirane i liječene PE do 8%. Do 10% bolesnika s akutnom PE umire iznenada. Dva od tri preminula pacijenta umiru unutar dva sata od početka bolesti (131,132). Indeks težine plućne embolije (PESI) razvijen je za procjenu rizika umiranja u periodu od 30 dana u bolesnika s akutnom PE, a koristi 11 objektivnih kliničkih parametara za procjenu rizika (124,132). PESI je alat kojim se procjenjuje rizik od smrti unutar 30 dana, a njegova najveća korist je u tome što bolesnike, prema kliničkim parametrima raspodjeljuje u pet razreda bez upotrebe dijagnostičkih postupaka (132). Razredi I-II smatraju se razredima niskog rizika od umiranja, razred III smatra se razredom srednjeg rizika od umiranja, dok se razredi IV i V smatraju razredima visokog rizika od umiranja. Istraživanja su pokazala da se smrtnost povećava sa svakim razredom (124,132). U našem istraživanju, potvrđena je razlika u preživljenju prema razredima PESI. Preživjeli su svi bolesnici u razredu I-II, a svi umrli bolesnici su u razredima III, IV i V, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Tablica 12,  $P$ -vrijednost = 0,027).

### **5. 6. 1. Izdvajanje značajnih varijabli klasifikacijskim programima PART, JRIP i J48**

Dodatna analiza čimbenika rizika umiranja tijekom 30 dana napravljena je uporabom klasifikacijskih programa PART, JRIP i J48 (Slika 17). Ove se analize razlikuju od analize rpart po tome što se ne gleda učinak varijabli na relativni rizik umiranja izražen kao omjer rizika (HR), već se bolesnici razvrstavaju u preživjele i umrle. Izdvojeni su slijedeći čimbenici: ureja, AST i D-dimeri. Utvrdili smo da, ukoliko je vrijednost ureje manja ili jednaka 8 mmol/L, niti jedan bolesnik ne umire. Isti zaključak vrijedi i za AST, kada je manji ili jednak 25 U/L. Međutim, ukoliko je ureja veća od 8 mmol/L, AST veći od 25 U/L i D-dimeri veći od 2,7 mg/L svi bolesnici umiru. Kod korištenja dobivenih graničnih vrijednosti za D-dimere, unutar klasifikacijskog algoritma, treba biti oprezan zbog toga što se ne smiju interpretirati odvojeno od ostatka algoritma.

Oštećena funkcija bubrega ili dehidracija i oštećena funkcija jetre značajani su čimbenici rizika umiranja. Do sada je, kroz nekoliko istraživanja, zaključeno da stupanj hidracije bolesnika utječe na preživljenje u različitim bolestima (199-202). Dehidracija smanjuje ukupan volumen plazme, smanjuje minutni volumen srca i može promijeniti reologiju krvi (povećanje lokalnog hematokrita i viskoziteta krvi). Prisutnost dva od tri glavna čimbenika rizika Virchowljeve trijade (promjene u protoku krvi, ozljeda vaskularnog endotela i promjene u koagulabilnosti krvi) povećava rizik od VTE u nekih dehidriranih bolesnika (203). U našem je istraživanju statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti utvrđena za parametre funkcije bubrega: ureju ( $P = < 0,001$ ), kreatinin ( $P = 0,009$ ) i eGFR ( $P = 0,023$ ) (Tablica 13, Slike 8 i 9).

Studijama o utjecaju povišenih vrijednosti enzima jetre na obolijevanje i umiranje u kardiovaskularnim bolestima, zaključeno je da su povišeni enzimi jetre, osobito AST, čimbenici rizika obolijevanja i umiranja u kardiovaskularnim bolestima (204-206). Svaki uzrok disfunkcije desne klijetke može biti povezan s poremećajem funkcije jetre. Primarna patofiziologija uključena u oštećenu funkciju jetre je pasivna kongestija, zbog povećanog tlaka punjenja srca ili niskog minutnog volumena i posljedične poremećene perfuzije jetre. Pasivna kongestija jetre, zbog povećanog središnjeg venskog tlaka, može uzrokovati povišenje enzima jetre. S druge strane, poremećaj perfuzije jetre zbog smanjenog minutnog volumena može biti povezan s akutnom hepatocelularnom nekrozom koja za posljedicu ima porast aminotransferaza u serumu (207,208). U našem istraživanju, statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti utvrđena je za dva parametra funkcije jetre: AST ( $P = 0,006$ ) i GGT ( $P = 0,037$ ) (Tablica 13 i Slika 10).

Na temelju svega dvije varijable, ureje i AST, program JRIP s vrlo visokom točnošću (95,9%) određuje ishod. Međutim, program u umrle svrstava i tri preživjela bolesnika. Drugi klasifikator (PART) je u prepoznavanju umrlih ispitanika neznatno bolji, jer ima dodatnu varijablu „D-dimeri“ i izdvaja samo jednog lažno umrlog bolesnika (Slika 17). To ukazuje da varijabla D-dimera značajno povećava specifičnost klasifikacije. To se vidi po kappa-statistici koja kod klasifikatora JRIP iznosi 0,8 dok je kod klasifikatora PART 0,93.

Rezultati dobiveni PART-klasifikatorom, prikazani stablom odluke (Slika 17), pokazuju da ureja ima najveći informacijski sadržaj, potom AST, pa D-dimeri. Pri tome treba ponovno napomenuti da brojčane vrijednosti navedene u čvorovima odluke nisu „normalne vrijednosti“ za tu varijablu i zbog toga klasifikacijski algoritam treba sagledati u cjelini.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da specifični genotipovi *ABO* ( $i^{O1}I^{A1}$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$ ) (Slika 16) predstavljaju negativni prognostički čimbenik u značajnoj subpopulaciji ispitanika s PE (40% ispitanika u studiji). Međutim, opće stanje ispitanika je glavna odrednica prognoze, što se može zaključiti na osnovu vrijednosti ureje i AST (Slika 17).

Plućna embolija posljedica je složenih patofizioloških procesa u koje su uključeni brojni čimbenici rizika s kumulativnim djelovanjem. Iako su stečeni čimbenici rizika najčešći pokretač razvoja bolesti, nasljedni čimbenici rizika ipak čine predispoziciju koja se ne može zanemariti.

Donošenje daljnjih zaključaka o nasljednim čimbenicima rizika u našoj populaciji zahtijeva provođenje dodatnih studija na većim skupinama ispitanika, u više centara. Na temelju našeg istraživanja, možemo zaključiti da genotipovi *ABO* i polimorfizmi *rs1801133* i *rs1801131* sami po sebi nisu dostatni za objašnjenje pojavnosti i rizika od smrti u PE, te ih treba sagledati u kontekstu drugih čimbenika rizika. Klinička primjena različitih modela procjene rizika umiranja u bolesnika s akutnom plućnom embolijom predmetom je brojnih istraživanja zadnjih nekoliko godina. Pravovremeno dijagnosticiranje PE odmah bi trebala slijediti točna procjena rizika temeljem koje se donosi odluka o modalitetima liječenja. Rezultati našeg istraživanja upućuju na zaključak da je u svih bolesnika potrebno odrediti vrijednosti D-dimera, genotip *ABO* i PV, u svrhu probira najrizičnijih bolesnika. Dodatnu procjenu rizika donosi uvid u funkciju bubrega kroz vrijednost ureje, te jetre kroz vrijednosti AST.

## 5. 7. Ograničenje studije i modela istraživanja

Ograničenje našeg istraživanja vezano je uz relativno malen uzorak ispitanika kojima se nije određivala koncentracija homocisteina, s obzirom na to da hiperhomocisteinemija povećava

rizik od venskih tromboembolijskih incidenata (33,41). Međutim, niti druge studije na većim uzorcima ispitanika koje su analizirale povezanost polimorfizama gena *MTHFR* s rizikom za razvoj VTE nisu, u skladu s našim rezultatima, pokazale statistički značajnu povezanost ovih polimorfizama i rizika pojavnosti PE. Iako su pojedini genotipovi *ABO* u dosadašnjim studijama dovedeni u vezu s rizikom od PE (61), rezultati našeg istraživanja ovu povezanost nisu potvrdili. Naše istraživanje jasno pokazuje da isključivo multivarijatna analiza može identificirati i kvantificirati čimbenike rizika umiranja u PE, te da treba izbjegavati zaključivanje na temelju pojedinačnih varijabli. Ovo je jasno vidljivo na primjeru nepostojanja povezanosti, kada se genotip *ABO* (Tablica 15,  $P = 0,858$ ) analizira univarijatnom analizom, dok je multivarijatni pristup jasno izdvojio njegov visok informacijski sadržaj u odnosu na umiranje oboljelih od PE (Slike 15 i 16).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Prevalencija genotipova povezanih s polimorfizmima *rs11801133* i *rs1801131* nije statistički značajno različita između oboljelih od PE i kontrolne skupine. Skupine umrlih i preživjelih se, u odnosu na genotipove vezane uz ove polimorfizme, ne razlikuju. Genotipovi vezani uz polimorfizme *rs11801133* i *rs1801131* ne utječu na ishod PE. Multivarijatnom analizom je dodatno pokazano da ovi polimorfizmi ne nose visok informacijski sadržaj u predviđanju preživljenja.
2. Genotipovi *ABO* su podjednako zastupljeni u skupini oboljelih od PE, i u kontrolnoj skupini. U univarijatnoj analizi, genotip *ABO* nije značajan čimbenik rizika umiranja. U multivarijatnoj analizi, svi preminuli ispitanici imali su jedan od sljedećih genotipova:  $i^{O1}I^{A1}$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$  i koncentraciju D-dimera  $\geq 4,1$  mg/L.
3. Svi preživjeli ispitanici imali su koncentraciju D-dimera  $< 4,1$  mg/L i genotipove  $I^{A1}I^{A1}$ ,  $I^{A1}I^B$ ,  $I^B I^B$  i  $i^{O1}I^{A2}$ .
4. Ispitanici s protrombinskim vremenom manjim od 87% imaju visok rizik od umiranja u PE.
5. Povišene razine ureje, AST i D-dimera su opći pokazatelji rizika umiranja. NT-proBNP i troponin I nisu statistički značajni čimbenici rizika umiranja, niti u univarijatnoj, niti u multivarijatnoj analizi.
6. Prognostički značaj genotipova *ABO* i polimorfizma *MTHFR*, *rs11801133* i *rs1801131*, treba sagledati u kontekstu cjelovite kliničke slike oboljelih od PE.

## 7. LITERATURA

1. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):242.
2. Wikimedia Commons contributors, "File:MTHFR.jpg," Wikimedia Commons, the freemediarepository, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:MTHFR.jpg&oldid=454028004> (pristupljeno 4. 1. 2022)
3. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10(1):111-113.
4. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*. 2015;58(1):1-10.
5. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10):1733.
6. Muačević Katanec D, Merkler A, Fumić K, Barić I, Merkler M, Reiner Ž. Homocistinurija u odraslih bolesnika - važnost ranog prepoznavanja u dječjoj i adolescentnoj dobi. *Paediatr. Croat*. 2014;58(3):208-214.
7. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. URL <http://AtlasGeneticsOncology.org> (pristupljeno 4. 2. 2021)
8. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217-246.
9. Hu FL, Gu Z, Kozich V, Kraus JP, Ramesh V, Shih VE. Molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocystinuria. *Hum Mol Genet*. 1993;2(11):1857-1860.
10. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:78.
11. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):470-487.
12. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl*; 1986;25:1058-1071.
13. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1098-1124.



14. Loscalzo J. Oxidative stress in endothelial cell dysfunction and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):359-360.
15. Lijfering WM, NicVeeger JGM, Brouwer JLP, van der Meer J. The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels. *Haematologica.* 2007;92(12):1703-1706.
16. Flood EC, Hajjar KA. The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vasc Pharmacol.* 2011;54(3-6):59-67.
17. Ekim M, Ekim H, Yilmaz YK, Kulah B, Polat MF, Gocmen AY. Study on relationships among deep vein thrombosis, homocysteine & related B group vitamins. *Pak J Med Sci.* 2015;31(2):398-402.
18. Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G. Hyperhomocysteinemia: related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol Genet Metab.* 2014;113(1-2):27-33.
19. Wright A, Martin N, Dodson P. Homocysteine, folates, and the eye. *Eye.* 2008;22:989–993.
20. Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, Quesenberry CP, Liu L, Bresnahan M, Susser ES. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2007;64(1):31-39.
21. Numata S, Kinoshita M, Tajima A, Nishi A, Imoto I, Ohmori T. Evaluation of an association between plasma total homocysteine and schizophrenia by a Mendelian randomization analysis. *BMC Med Genet.* 2015;16:54.
22. Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, Frydecka D, Misiak B. Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders-focus on cognition. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:343.
23. Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids.* 2015;47(7):1319-1339.
24. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):292-299.
25. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Nardo A, Marrone E, Lupoli V, Scaravilli A, Mitidieri E, Tufano A, Di Minno MN. Cyclic supplementation of 5-MTHF is effective for the correction of hyperhomocysteinemia. *Nutr Res.* 2015;35(6):489-495.

26. Stea TH, Mansoor MA, Wandel M, Uglem S, Frolich W. Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread. *Eur J Nutr.* 2008;47(4):201–209.
27. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 1991;48(3):536-545.
28. Rassoul F, Richter V, Hentschel B, Geisel J, Herrmann W, Kuntze T. Plasma homocysteine levels & 677C T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res.* 2008;127(2):154–158.
29. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000001.11?from=11785723&to=11806103&report=genbank&strand=true](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000001.11?from=11785723&to=11806103&report=genbank&strand=true) (pristupljeno 4. 1. 2022)
30. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR> (pristupljeno 4. 1. 2022)
31. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, Grceвич G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism.* 1988;37(7):611-613.
32. Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, Genest J Jr, Rozen R. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(3):569-73.
33. Karmadonova NA, Shilova AN, Kozyreva VS, Subbotovskaya AI, Klevanets JE, Karpenko AA. Association of folate metabolism gene polymorphisms and pulmonary embolism: A case-control study of West-Siberian population. *Thromb Res.* 2015;135(5):788-795.
34. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world. *J Med Genet.* 2003;40(8):619-625.
35. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862-877.
36. Hosseini S, Kalantar E, Hosseini MS, Tabibian S, Shamsizadeh M, Dorgalaleh A. Genetic risk factors in patients with deep venous thrombosis, a retrospective case control study on Iranian population. *Thromb J.* 2015;13:35.

37. Zapacosta B, Romano L, Persichilli S, Cutrone IA, Graziano M, Vitrani A, Castelnuovo A, Giardina B, Musumeci S, Mastroiacovo P. Genotype Prevalence and Allele Frequencies of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and A1298C Polymorphisms in Italian Newborns. *LabMedicine*. 2009;40:732-6.
38. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-1051.
39. Cho K, Amin ZM, An J, Rambaran KA, Johnson TB, Alzghari SK. Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Major Depressive Disorder. *Cureus*. 2017;9(10):e1734.
40. Yang Y, Luo YY, Wu S, Tang YD, Rao XD, Xiong L, Tan M, Deng MZ, Liu H. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2016;15(2):gmr7631.
41. Lupi-Herrera E, Soto-López ME, Lugo-Dimas AJ, Núñez-Martínez ME, Gamboa R, Huesca-Gómez C, Sierra-Galán LM, Guarner-Lans V. Polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR Gene: Homocysteine Levels and Prothrombotic Biomarkers in Coronary and Pulmonary Thromboembolic Disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019;25:1-8.
42. Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood*. 2009;113(21):5298–5303.
43. Paré G, Chasman DI, Parker AN, Zee RR, Mälarstig A, Seedorf U, Collins R, Watkins H, Hamsten A, Miletich JP, Ridker PM. Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13 974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):142–150.
44. Tang W, Teichert M, Chasman DI, Heit JA, Morange PE, Li G, Pankratz N, Leebeek FW, Paré G, de Andrade M, Tzourio C, Psaty BM, Basu S, Ruitter R, Rose L, Armasu SM, Lumley T, Heckbert SR, Uitterlinden AG, Lathrop M, Rice KM, Cushman M, Hofman A, Lambert JC, Glazer NL, Pankow JS, Witteman JC, Amouyel P, Bis JC, Bovill EG, Kong X, Tracy RP, Boerwinkle E, Rotter JI, Trégouët DA, Loth DW, Stricker BHC, Ridker PM, Folsom AR, Smith NL. A genome-wide association study for venous thromboembolism: the

- extended cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology (CHARGE) consortium. *Genet Epidemiol.* 2013;37(5):512–521.
45. Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert JC, Perret C, Cohen W, Oudot-Mellakh T, Antoni G, Alessi MC, Zelenika D, Cambien F, Tiret L, Bertrand M, Dupuy AM, Letenneur L, Lathrop M, Emmerich J, Amouyel P, Trégouët DA, Morange PE. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e25581.
  46. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr* 1901;14:1132–1134.
  47. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med.* 2001;11(4):243-265.
  48. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature.* 1990;345(6272):229-233.
  49. Blann A, Ahmed N. *Blood Sciences – Principles and Pathology.* Wiley Blackwell, Chichester, UK 2014. str. 267.
  50. Storry JR, Olsson ML The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology.* 2009;25(2):48-59.
  51. Daniels G The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 2009;126: 729-742.
  52. Wikimedia Commons contributors, "File:Chromosome 9.svg," Wikimedia Commons, thefreemediarepository,[https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Chromosome\\_9.svg&oldid=465457311](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Chromosome_9.svg&oldid=465457311) (pristupljeno 6. 1. 2022)
  53. Daniels G. *Human blood groups.* 2. izd. Oxford: Blackwell Science Oxford; UK 2002. str. 195-202.
  54. Patnaik SK, Helmborg W, Blumenfeld OO. BGMUT Database of Allelic Variants of Genes Encoding Human Blood Group Antigens. *Transfus Med Hemother.* 2014;41(5):346-351.
  55. Issitt PD, Anstee DJ. *Applied Blood Group Serology.* Durham, N.C: Montgomery Scientific Publications; 1998.
  56. Garratty G, Glynn SA, McEntire R. Retrovirus Epidemiology Donor Study. ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ethnic groups in the United States. *Transfusion.* 2004;44(5):703-706.
  57. Bloodbook.com. Racial and ethnic distribution of ABO blood types. Dostupno na: <http://www.bloodbook.com/world-abo.html> (pristupljeno 8.4.2021)

58. Nayak SK. ABO blood groups in different diseases. *J Indian Med Assoc.* 1971;57(12):449-452.
59. Abegaz SB. Human ABO Blood Groups and Their Associations with Different Diseases. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6629060.
60. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):62-69.
61. Franchini, M, Mannucci PM. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost.* 2014;112(6):1103–1109.
62. Garratty G. Blood groups and disease: a historical perspective. *Transfus Med Rev.* 2000;14(4):291-301.
63. Blackwell CC, Dundas S, James VS, Mackenzie DA, Braun JM, Alkout AM, Todd WT, Elton RA, Weir DM. Blood group and susceptibility to disease caused by *Escherichia coli* O157. *J Infect Dis.* 2002;185(3):393-396.
64. Liu N, Zhang T, Ma L, Zhang H, Wang H, Wei W, Pei H, Li H. The impact of ABO blood group on COVID-19 infection risk and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Blood Rev.* 2021;48:100785.
65. Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood.* 2007;110(7):2250-2258.
66. Aird I, Bentall HH, Roberts JA. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J.* 1953;1(4814):799–801.
67. Liumbruno GM, Franchini M. Hemostasis, cancer, and ABO blood group: the most recent evidence of association. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;38(2):160-166.
68. Gates MA, Xu M, Chen WY, Kraft P, Hankinson SE, Wolpin BM. ABO blood group and breast cancer incidence and survival. *Int J Cancer.* 2012;130(9):2129-2137.
69. Ulger AF, Keklik T, Kumbasar OO, Arbak P, Demirkazık A, Güngör A, Ereku S, Alper D. Prognostic significance of blood group antigen expression of tumor tissue in lung cancer patients. *Tumori.* 2002;88(5):395-399.
70. Xie J, Qureshi AA, Li Y, Han J. ABO blood group and incidence of skin cancer. *PLoS One.* 2010;5(8):e11972.
71. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood.* 2015;125(13):2019-2028.
72. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985;76(3):1102-1106.

73. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1982;95(1):355-360.
74. Federici A. The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica.* 2003;88(6):EREPO2.
75. Konecny FA. Review of cellular and molecular pathways linking thrombosis and innate immune system during sepsis. *J Res Med Sci.* 2010;15(6):348-358.
76. Krznarić-Vohalski G. *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga; 2007. str. 376-382.
77. Schleaf M, Strobel E, Dick A, Frank J, Schramm W, Spannagl M. Relationship between ABO and Secretor genotype with plasma levels of factor VIII and von Willebrand factor in thrombosis patients and control individuals. *Br J Haematol.* 2005;128(1):100-107.
78. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, Weltermann A, Speiser W, Lechner K, Eichinger S. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2000;343(7):457-462.
79. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, Folsom AR. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med.* 2002;113(8):636-642.
80. Pépin M, Kleinjan A, Hajage D, Büller HR, Di Nisio M, Kamphuisen PW, Salomon L, Veyradier A, Stepanian A, Mahé I. ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer. *J Thromb Haemost.* 2016;14(2):306-315.
81. Cohen W, Castelli C, Suchon P, Bouvet S, Aillaud MF, Brunet D, Barthet MC, Alessi MC, Trégouët DA, Morange PE. Risk assessment of venous thrombosis in families with known hereditary thrombophilia: the MARseilles-NImes prediction model. *J Thromb Haemost.* 2014;12(2):138-146.
82. Capuzzo E, Bonfanti C, Frattini F, Montorsi P, Turdo R, Previdi MG, Turrini E, Franchini M. The relationship between ABO blood group and cardiovascular disease: results from the Cardiorisk program. *Ann Transl Med.* 2016;4(10):189.
83. Carpeggiani C, Coceani M, Landi P, Michelassi C, L'abbate A. ABO blood group alleles: A risk factor for coronary artery disease. An angiographic study. *Atherosclerosis.* 2010;211(2):461-466.
84. Clark P, Wu O. ABO blood groups and thrombosis: a causal association, but is there value in screening? *Future Cardiol.* 2011;7(2):191-201.
85. Moser KM, Fedullo PF, LitteJohn JK, Crawford R. Frequent asymptomatic pulmonary embolism in patients with deep venous thrombosis. *JAMA.* 1994;271(3):223-225.

86. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, Hylek EM, Kakkar A, Konstantinides SV, McCumber M, Ozaki Y, Wendelboe A, Weitz JI, ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(11):2363-2371.
87. Wendelboe AM, Raskob GE. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ Res.* 2016;118(9):1340-1347.
88. Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, Jaffer IH, Agnelli G, Baglin T, Mackman N. Venous thrombosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15006.
89. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M, VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):756-764.
90. Basol N, Karakus N, Savas AY, Karakus K, Kaya İ, Karaman S, Yigit S. The evaluation of two genetic polymorphisms of paraoxonase 1 in patients with pulmonary embolism. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(7):e22455.
91. Stein PD, Beemath A, Matta F, Weg JG, Yusen RD, Hales CA, Hull RD, LEEPER KV Jr, Sostman HD, Tapson VF, Buckley JD, Gottschalk A, Goodman LR, Wakefield TW, Woodard PK. Clinical characteristics of patients with acute pulmonary embolism: data from PIOPED II. *Am J Med.* 2007;120(10):871-879.
92. Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med.* 2003;138(2):128-134.
93. Spencer FA, Emery C, Lessard D, Anderson F, Emani S, Aragam J, Becker RC, Goldberg RJ. The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *J Gen Intern Med.* 2006;21(7):722-727.
94. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984;52(2):176-182.
95. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003;16(2):153-168.
96. Macklon NS, Greer IA. The deep venous system in the puerperium: an ultrasound study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104(2):198-200.

97. Heit JA, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton III LJ. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med.* 2005;143(10):697-706.
98. Pomp ER, Lenselink AM, Rosendaal FR, Doggen CJM. Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. *J Thromb Haemost* 2008;6 (4):632-637.
99. Sultan AA, West J, Tata LJ, Fleming KM, Nelson-Piercy C, Grainge MJ. Risk of first venous thromboembolism in and around pregnancy: a population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2012;156(3):366-373.
100. Panting-Kemp A, Geller SE, Nguyen T, Simonson L, Nuwayhid B, Castro L. Maternal deaths in an urban perinatal network, 1992-1998. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(5):1207-1212.
101. Kujovich JL. Hormones and pregnancy: thromboembolic risks for women. *Br J Haematol.* 2004;126(4):443-454.
102. Roach RE, Lijfering WM, Helmerhorst FM, Cannegieter SC, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A. The risk of venous thrombosis in women over 50 years old using oral contraception or postmenopausal hormone therapy. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):124-131.
103. Miller J, Chan BK, Nelson HD. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2002;136(9):680-690.
104. Pérez Gutthann S, García Rodríguez LA, Castellsague J, Duque Oliart A. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: population based case-control study. *BMJ.* 1997;314(7083):796-800.
105. Grodstein F, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH. Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. *Lancet.* 1996;348(9033):983-987.
106. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thromb Haemost.* 2003;90(3):446-455.
107. Sobieraj DM, Lee S, Coleman CI, Tongbram V, Chen W, Colby J, Kluger J, Makanji S, Ashaye AO, White CM. Prolonged versus standard-duration venous thromboprophylaxis in major orthopedic surgery: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2012;156(10):720-727.



108. Horlander KT, Mannino DM, Leeper KV. Pulmonary embolism mortality in the United States, 1979-1998: an analysis using multiple-cause mortality data. *Arch Intern Med.* 2003;163(14):1711-1717.
109. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998;158(6):585-593.
110. Kierkegaard A, Norgren L, Olsson CG, Castenfors J, Persson G, Persson S. Incidence of deep vein thrombosis in bedridden non-surgical patients. *Acta Med Scand.* 1987;222(5):409-414.
111. West J, Perrin K, Aldington S, Weatherall M, Beasley R. A case-control study of seated immobility at work as a risk factor for venous thromboembolism. *J R Soc Med.* 2008;101(5):237-243.
112. Beasley R, Heuser P, Raymond N. SIT (Seated Immobility Thromboembolism) syndrome: a 21st century lifestyle hazard. *N Z Med J.* 2005;118(1212):U1376.
113. Bauer KA. Venous thromboembolism in malignancy. *J Clin Oncol.* 2000;18(17):3065-3067.
114. Elting LS, Escalante CP, Cooksley C, Avritscher EB, Kurtin D, Hamblin L, Khosla SG, Rivera E. Outcomes and cost of deep venous thrombosis among patients with cancer. *Arch Intern Med.* 2004;164(15):1653-1661.
115. Tapson VF. The role of smoking in coagulation and thromboembolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(1):71-77.
116. Enga KF, Braekkan SK, Hansen-Krone IJ, le Cessie S, Rosendaal FR, Hansen JB. Cigarette smoking and the risk of venous thromboembolism: the Tromsø Study. *J Thromb Haemost.* 2012;10(10):2068-2074.
117. Cheng YJ, Liu ZH, Yao FJ, Zeng WT, Zheng DD, Dong YG, Wu SH. Current and Former Smoking and Risk for Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 2013;10(9):e1001515.
118. Sloan M, Sheth N, Lee GC. Is Obesity Associated With Increased Risk of Deep Vein Thrombosis or Pulmonary Embolism After Hip and Knee Arthroplasty? A Large Database Study. *Clin Orthop Relat Res.* 2019;477(3):523-532.
119. Bezgin T, Kaymaz C, Akbal Ö, Yılmaz F, Tokgöz HC, Özdemir N. Thrombophilic Gene Mutations in Relation to Different Manifestations of Venous Thromboembolism: A Single Tertiary Center Study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(1):100-106.

120. Kreidy R. Influence of acquired and genetic risk factors on the prevention, management, and treatment of thromboembolic disease. *Int J Vasc Med.* 2014;2014:859726.
121. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95(5):1517-1532.
122. Anderson FA Jr, Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation.* 2003;107(23 Suppl 1):I9-I16.
123. Baglin T. Management of thrombophilia: who to screen? *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(5-6):401-404.
124. Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, Bueno H, Geersing GJ, Harjola VP, Huisman MV, Humbert M, Jennings CS, Jiménez D, Kucher N, Lang IM, Lankeit M, Lorusso R, Mazzolai L, Meneveau N, Áinle FN, Prandoni P, Pruszczyk P, Righini M, Torbicki A, Van Belle E, Zamorano JL. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Respir J.* 2019;54(3):1901647.
125. Rathbun SW, Raskob GE, Whitsett TL. Sensitivity and specificity of helical computed tomography in the diagnosis of pulmonary embolism: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000;132(3):227-232.
126. Stein PD, Athanassoulis C, Alavi A, Greenspan RH, Hales CA, Saltzman HA, Vreim CE, Terrin ML, Weg JG. Complications and validity of pulmonary angiography in acute pulmonary embolism. *Circulation.* 1992;85(2):462-468.
127. van Langevelde K, Srámek A, Vincken PW, van Rooden JK, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Finding the origin of pulmonary emboli with a total-body magnetic resonance direct thrombus imaging technique. *Haematologica.* 2013;98(2):309-315.
128. Jardin F, Dubourg O, Bourdarias JP. Echocardiographic pattern of acute cor pulmonale. *Chest.* 1997;111(1):209-217.
129. Tarbox AK, Swaroop M. Pulmonary embolism. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2013;3(1):69-72.
130. Kasper W, Geibel A, Tiede N, Hofmann T, Meinertz T, Just H. Die Echokardiographie in der Diagnostik der Lungenembolie [Echocardiography in the diagnosis of lung embolism]. *Herz.* 1989;14(2):82-101.
131. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, Gibbs JS, Huisman MV, Humbert M, Kucher N, Lang I, Lankeit M, Lekakis J, Maack C, Mayer E, Meneveau N, Perrier A, Pruszczyk P, Rasmussen LH, Schindler TH, Svitil P, Vonk Noordegraaf A, Zamorano JL, Zompatori M, Task Force for the Diagnosis and Management

- of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014;35(43):3033-3069.
132. Aujesky D, Obrosky DS, Stone RA, Auble TE, Perrier A, Cornuz J, Roy PM, Fine MJ. Derivation and validation of a prognostic model for pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(8):1041-1046.
133. Kohn CG, Mearns ES, Parker MW, Hernandez AV, Coleman CI. Prognostic accuracy of clinical prediction rules for early post-pulmonary embolism all-cause mortality: a bivariate meta-analysis. *Chest*. 2015;147(4):1043-1062.
134. Jiménez D, Aujesky D, Moores L, Gómez V, Lobo JL, Uresandi F, Otero R, Monreal M, Muriel A, Yusen RD. Simplification of the pulmonary embolism severity index for prognostication in patients with acute symptomatic pulmonary embolism. *Arch Intern Med*. 2010;170(15):1383-1389.
135. Bryce YC, Perez-Johnston R, Bryce EB, Homayoon B, Santos-Martin EG. Pathophysiology of right ventricular failure in acute pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a pictorial essay for the interventional radiologist. *Insights Imaging*. 2019;10(1):18.
136. Söhne M, Ten Wolde M, Boomsma F, Reitsma JB, Douketis JD, Büller HR. Brain natriuretic peptide in hemodynamically stable acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):552-556.
137. Ouellette DW, Patocka C. Pulmonary embolism. *Emerg Med Clin North Am*. 2012;30:329-375.
138. Lega JC, Lacasse Y, Lakhal L, Provencher S. Natriuretic peptides and troponins in pulmonary embolism: a meta-analysis. *Thorax*. 2009;64(10):86.
139. Klok FA, Mos IC, Huisman MV. Brain-type natriuretic peptide levels in the prediction of adverse outcome in patients with pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(4):425-430.
140. Wiedemann HP, Matthay RA. Acute right heart failure. *Crit Care Clin*. 1985;1(3):631-661.
141. Braga JR, Tu JV, Austin PC, Chong A, You JJ, Farkouh ME, Ross HJ, Lee DS. Outcomes and care of patients with acute heart failure syndromes and cardiac troponin elevation. *Circ Heart Fail*. 2013;6(2):193-202.
142. Felker GM, Hasselblad V, Tang WH, Hernandez AF, Armstrong PW, Fonarow GC, Voors AA, Metra M, McMurray JJ, Butler J, Heizer GM, Dickstein K, Massie BM, Atar D,

- Troughton RW, Anker SD, Califf RM, Starling RC, O'Connor CM. Troponin I in acute decompensated heart failure: insights from the ASCEND-HF study. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(11):1257-1264.
143. Scheitz JF, Endres M, Mochmann HC, Audebert HJ, Nolte CH. Frequency, determinants and outcome of elevated troponin in acute ischemic stroke patients. *Int J Cardiol.* 2012;157(2):239-242.
144. Eisenberg MA, Green-Hopkins I, Alexander ME, Chiang VW. Cardiac troponin T as a screening test for myocarditis in children. *Pediatr Emerg Care.* 2012;28(11):1173-1178.
145. Meyer T, Binder L, Hruska N, Luthe H, Buchwald AB. Cardiac troponin I elevation in acute pulmonary embolism is associated with right ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(5):1632-1636.
146. Pasha SM, Klok FA, van der Bijl N, de Roos A, Kroft LJ, Huisman MV. NT-pro-BNP levels in patients with acute pulmonary embolism are correlated to right but not left ventricular volume and function. *Thromb Haemost.* 2012;108(2):367-372.
147. Becattini C, Vedovati MC, Agnelli G. Prognostic value of troponins in acute pulmonary embolism: a meta-analysis. *Circulation.* 2007;116(4):427-433.
148. Stein PD, Terrin ML, Hales CA, Palevsky HI, Saltzman HA, Thompson BT, Weg JG. Clinical, laboratory, roentgenographic, and electrocardiographic findings in patients with acute pulmonary embolism and no pre-existing cardiac or pulmonary disease. *Chest.* 1991;100(3):598-603.
149. Moore AJE, Wachsmann J, Chamrathy MR, Panjikanan L, Tanabe Y, Rajiah P. Imaging of acute pulmonary embolism: an update. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8(3):225-243.
150. Rodger M, Makropoulos D, Turek M, Quevillon J, Raymond F, Rasuli P, Wells PS. Diagnostic value of the electrocardiogram in suspected pulmonary embolism. *Am J Cardiol.* 2000;86(7):807-809.
151. Geibel A, Zehender M, Kasper W, Olschewski M, Klima C, Konstantinides SV. Prognostic value of the ECG on admission in patients with acute major pulmonary embolism. *Eur Respir J.* 2005;25(5):843-848.
152. Stein PD, Goldhaber SZ, Henry JW, Miller AC. Arterial blood gas analysis in the assessment of suspected acute pulmonary embolism. *Chest.* 1996;109(1):78-81.
153. Freyburger G, Trillaud H, Labrousche S, Gauthier P, Javorschi S, Bernard P, Grenier N. D-dimer strategy in thrombosis exclusion - a gold standard study in 100 patients suspected of deep venous thrombosis or pulmonary embolism: 8 DD methods compared. *Thromb Haemost.* 1998;79:32-37.

154. Stein PD, Hull RD, Patel KC, Olson RE, Ghali WA, Brant R, Biel RK, Bharadia V, Kalra NK. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2004;140(8):589-602.
155. Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, Büller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PM. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2):296-304.
156. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, Turpie AG, Bates SM, Lee AY, Crowther MA, Weitz JI, Brill-Edwards P, Wells P, Anderson DR, Kovacs MJ, Linkins LA, Julian JA, Bonilla LR, Gent M, Canadian Pulmonary Embolism Diagnosis Study (CANPEDS) Group. An evaluation of D-dimer in the diagnosis of pulmonary embolism: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006;144(11):812-821.
157. Kearon C, de Wit K, Parpia S, Schulman S, Afilalo M, Hirsch A, Spencer FA, Sharma S, D'Aragon F, Deshaies JF, Le Gal G, Lazo-Langner A, Wu C, Rudd-Scott L, Bates SM, Julian JA, PEGeD Study Investigators. Diagnosis of Pulmonary Embolism with d-Dimer Adjusted to Clinical Probability. *N Engl J Med.* 2019;381(22):2125-2134.
158. Crawford F, Andras A, Welch K, Sheares K, Keeling D, Chappell FM. D-dimer test for excluding the diagnosis of pulmonary embolism. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2016(8):CD010864.
159. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Stiell I, Dreyer JF, Barnes D, Forgie M, Kovacs G, Ward J, Kovacs MJ. Excluding pulmonary embolism at the bedside without diagnostic imaging: management of patients with suspected pulmonary embolism presenting to the emergency department by using a simple clinical model and d-dimer. *Ann Intern Med.* 2001;135(2):98-107.
160. Kucher N, Goldhaber SZ. Management of massive pulmonary embolism. *Circulation.* 2005;112(2):e28-e32.
161. Ebner M, Sentler C, Harjola VP, Bueno H, Lerchbaumer MH, Hasenfuß G, Eckardt KU, Konstantinides SV, Lankeit M. Outcome of patients with different clinical presentations of high-risk pulmonary embolism. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2021;10(7):787-796.
162. Pineda LA, Hathwar VS, Grant BJ. Clinical suspicion of fatal pulmonary embolism. *Chest.* 2001;120(3):791-795.
163. Ortel TL, Neumann I, Ageno W, Beyth R, Clark NP, Cuker A, Hutten BA, Jaff MR, Manja V, Schulman S, Thurston C, Vedantham S, Verhamme P, Witt DM, D Florez I, Izcovich A, Nieuwlaat R, Ross S, J Schünemann H, Wiercioch W, Zhang Y, Zhang Y. American Society of Hematology 2020 guidelines for management of venous thromboembolism:

- treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Blood Adv.* 2020;4(19):4693-4738.
164. Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood.* 1996;88(5):1852-1856.
165. Motulsky H. *Intuitive biostatistics.* Oxford: Oxford University Press; 1995. str. 9-126.
166. Witten IH, Frank E, Hall MA. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques.* Treće izdanje. Amsterdam: Morgan Kaufmann; 2011. str.191-215.
167. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 3-900051-07-0; 2011, <http://www.R-project.org>.
168. British Thoracic Society Standards of Care Committee Pulmonary Embolism Guideline Development Group. British Thoracic Society guidelines for the management of suspected acute pulmonary embolism. *Thorax.* 2003;58(6):470-483.
169. Isotalo PA, Donnelly JG. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. *Mol Diagn.* 2000;5(1):59-66.
170. Morelli VM, Lourenço DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, Noguti MA, Cruz E, Kerbauy J. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13(3):271-275.
171. Nizankowska-Mogilnicka E, Adamek L, Grzanka P, Domagala TB, Sanak M, Krzanowski M, Szczeklik A. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Eur Respir J.* 2003;21(1):25-30.
172. Gao M, Feng N, Zhang M, Ti X, Zuo X. Meta-analysis of the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and venous thromboembolism in the Caucasian and Asian. *Biosci Rep.* 2020;40(7):BSR20200860.
173. Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(2):51-58.
174. Zhang P, Gao X, Zhang Y, Hu Y, Ma H, Wang W, Wang H, Zhang J, Xu H, Lu Z. Association between MTHFR C677T polymorphism and venous thromboembolism risk in the Chinese population: a meta-analysis of 24 case-controlled studies. *Angiology.* 2015;66(5):422-432.

175. Zeng J, Zeng Q. Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2):120-134.
176. Tillmann T, Läll K, Dukes O, Veronesi G, Pikhart H, Peasey A, Kubinova R, Kozela M, Pajak A, Nikitin Y, Malyutina S, Metspalu A, Esko T, Fischer K, Kivimäki M, Bobak M. Development and validation of two SCORE-based cardiovascular risk prediction models for Eastern Europe: a multicohort study. *Eur Heart J.* 2020;41(35):3325-3333.
177. Kohn CG, Mearns ES, Parker MW, Hernandez AV, Coleman CI. Prognostic accuracy of clinical prediction rules for early post-pulmonary embolism all-cause mortality: a bivariate meta-analysis. *Chest.* 2015;147(4):1043-1062.
178. Jukić I, Bingulac-Popović J, Samardžija M, Lampalo M, Hećimović A, Đogić V, Strauss Patko V. Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. *Acta Med Croatica.* 2017;71(4):235-240.
179. Goumidi L, Thibord F, Wiggins KL, Li-Gao R, Brown MR, van Hylckama Vlieg A, Souto JC, Soria JM, Ibrahim-Kosta M, Saut N, Daian D, Olaso R, Amouyel P, Debette S, Boland A, Bailly P, Morrison AC, Mook-Kanamori DO, Deleuze JF, Johnson A, de Vries PS, Sabater-Lleal M, Chiaroni J, Smith NL, Rosendaal FR, Chasman DI, Trégouët DA, Morange PE. Association between ABO haplotypes and the risk of venous thrombosis: impact on disease risk estimation. *Blood.* 2021;137(17):2394-2402.
180. Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost.* 2005;3(1):183-185.
181. Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martínez-Sánchez E, Vallvé C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2005;93(3):468-474.
182. Olson JD. D-dimer: An Overview of Hemostasis and Fibrinolysis, Assays, and Clinical Applications. *Adv Clin Chem.* 2015;69:1-46.
183. Grau E, Tenías JM, Soto MJ, Gutierrez MR, Lecumberri R, Pérez JL, Tiberio G, RIETE Investigators. D-dimer levels correlate with mortality in patients with acute pulmonary embolism: Findings from the RIETE registry. *Crit Care Med.* 2007;35(8):1937-1941.
184. Lobo JL, Zorrilla V, Aizpuru F, Grau E, Jiménez D, Palareti G, Monreal M, RIETE Investigators. D-dimer levels and 15-day outcome in acute pulmonary embolism. Findings from the RIETE Registry. *J Thromb Haemost.* 2009;7(11):1795-1801.

185. Van Beek JG, Mushkudiani NA, Steyerberg EW, Butcher I, McHugh GS, Lu J, Marmarou A, Murray GD, Maas AI. Prognostic value of admission laboratory parameters in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma*. 2007;24(2):315-328.
186. Bronheim RS, Oermann EK, Cho SK, Caridi JM. Coagulation Profile as a Risk Factor for 30-day Morbidity Following Cervical Laminectomy and Fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018;43(4):239-247.
187. Liu C, Zhou X, Ling L, Chen S, Zhou J. Prediction of mortality and organ failure based on coagulation and fibrinolysis markers in patients with acute pancreatitis: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(21):e15648.
188. Kırış T, Yazıcı S, Durmuş G, Çanga Y, Karaca M, Nazlı C, Dogan A. The relation between international normalized ratio and mortality in acute pulmonary embolism: A retrospective study. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(1):e22164.
189. Konstantinides S, Geibel A, Olschewski M, Kasper W, Hruska N, Jäckle S, Binder L. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. *Circulation*. 2002;106(10):1263-1268.
190. El-Menyar A, Sathian B, Al-Thani H. Elevated serum cardiac troponin and mortality in acute pulmonary embolism: Systematic review and meta-analysis. *Respir Med*. 2019;157:26-35.
191. Janata K, Holzer M, Laggner AN, Müllner M. Cardiac troponin T in the severity assessment of patients with pulmonary embolism: cohort study. *BMJ*. 2003;326(7384):312-313.
192. Yalamanchili K, Sukhija R, Aronow WS, Sinha N, Fleisher AG, Lehrman SG. Prevalence of increased cardiac troponin I levels in patients with and without acute pulmonary embolism and relation of increased cardiac troponin I levels with in-hospital mortality in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol*. 2004;93(2):263-264.
193. Jiménez D, Uresandi F, Otero R, Lobo JL, Monreal M, Martí D, Zamora J, Muriel A, Aujesky D, Yusen RD. Troponin-based risk stratification of patients with acute nonmassive pulmonary embolism: systematic review and metaanalysis. *Chest*. 2009;136(4):974-982.
194. Coutance G, Le Page O, Lo T, Hamon M. Prognostic value of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism. *Crit Care*. 2008;12(4):R109.
195. Kostrubiec M, Pruszczyk P, Kaczynska A, Kucher N. Persistent NT-proBNP elevation in acute pulmonary embolism predicts early death. *Clin Chim Acta*. 2007;382(1-2):124-128.
196. Franchini M, Mannucci PM. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost*. 2014;112(6):1103-1109.



197. Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion*. 2006;46(10):1836-1844.
198. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(12):3071-3078.
199. Kim H, Lee K, Choi HA, Samuel S, Park JH, Jo KW. Elevated Blood Urea Nitrogen/Creatinine Ratio Is Associated with Venous Thromboembolism in Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Korean Neurosurg Soc*. 2017;60(6):620-626.
200. Schrock JW, Glasenapp M, Drogell K. Elevated blood urea nitrogen/creatinine ratio is associated with poor outcome in patients with ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012;114(7):881-884.
201. Jenab Y, Haji-Zeinali AM, Alemzadeh-Ansari MJ, Shirani S, Salarifar M, Alidoosti M, Vahidi H, Pourjafari M, Jalali A. Does Baseline BUN Have an Additive Effect on the Prediction of Mortality in Patients with Acute Pulmonary Embolism? *J Tehran Heart Cent*. 2020;15(2):57-63.
202. Kostrubiec M, Łabyk A, Pedowska-Włoszek J, Pacho S, Wojciechowski A, Jankowski K, Ciurzyński M, Pruszczyk P. Assessment of renal dysfunction improves troponin-based short-term prognosis in patients with acute symptomatic pulmonary embolism. *J Thromb Haemost*. 2010;8(4):651-658.
203. Virchow R. *Die Einheitsbestrebungen in der wissenschaftlichen Medicin*. De Gruyter; 1849.
204. Cho EJ, Han K, Lee SP, Shin DW, Yu SJ. Liver enzyme variability and risk of heart disease and mortality: A nationwide population-based study. *Liver Int*. 2020;40(6):1292-1302.
205. Weng SF, Kai J, Guha IN, Qureshi N. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment *Open Heart*. 2015;2:e000272.
206. Choi KM, Han K, Park S, Chung HS, Kim NH, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Park YG, Kim SM. Implication of liver enzymes on incident cardiovascular diseases and mortality: A nationwide population-based cohort study. *Sci Rep*. 2018;8(1):3764.
207. Sherlock S. The liver in heart failure; relation of anatomical, functional, and circulatory changes. *Br Heart J*. 1951;13(3):273-293.
208. Alvarez AM, Mukherjee D. Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure. *Int J Angiol*. 2011;20(3):135-142.

## 8. SAŽETAK

Plućna embolija je, poslije infarkta miokarda i ishemijskog moždanog udara, treća najčešća kardiovaskularna bolest. Identifikacija nasljednih i stečenih čimbenika rizika važna je u prevenciji i liječenju PE. Iako su genotipovi *ABO* i polimorfizmi gena za metilentetrahidrofolat reduktazu u literaturi istaknuti kao mogući čimbenici rizika, konačnih zaključaka o njihovoj ulozi u pojavnosti plućne embolije nema. U ovom istraživanju, koje je postavljeno kao prospektivna studija, praćen je učinak ovih čimbenika na sklonost obolijevanju i relativni rizik umiranja tijekom 30 dana od postavljanja dijagnoze. U univarijantnoj analizi nije pokazano da sklonost obolijevanju ovisi o genotipovima vezanim uz analizirane polimorfizme *MTHFR*, *rs1801133* i *rs1801131*, i genotipovima sustava *ABO*. Uporabom multivarijantne analize dokazano je da su određeni genotipovi *ABO* ( $i^{O1}I^A$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$ ) povezani s visokim porastom relativnog rizika umiranja (omjer hazarda 2,3) ako su D-dimeri  $\geq 4,1$  mg/L. Zbog toga je zaključeno da oni predstavljaju značajan prognostički čimbenik. Njihovom kombinacijom s biokemijskim parametrima: urejom, AST, D-dimerima i protrombinskim vremenom može se izraditi jednostavan, ali učinkovit prognostički sustav. Multivarijantna analiza nije pokazala utjecaj polimorfizama gena za metilentetrahidrofolat reduktazu na relativni rizik umiranja od PE. Vrijednosti troponina I i NT-proBNP nemaju prognostičku vrijednost u odnosu na ishod bolesti.

## 9. SUMMARY

Pulmonary embolism is the third most common cardiovascular disease, after myocardial infarction and ischemic stroke. Identification of hereditary and acquired risk factors is important for the PE prevention and treatment. Although highlighted in the literature as probable risk factors, there is no firm conclusion on the role of *ABO* genotypes and polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene for the occurrence of pulmonary embolism. In this research study, which was designed as a prospective study, their effect on the relative mortality risk during the period of 30 days following the diagnosis establishment was monitored. In univariate analysis, genotypes associated with the *MTHFR*, *rs1801133* and *rs1801131*, and the *ABO* system were not shown as risk factors for the PE occurrence. The multivariate analysis has shown an association between certain *ABO* genotypes ( $i^{O1}I^{A1}$ ,  $i^{O1}I^B$ ,  $i^{O1}i^{O1}$ ,  $i^{O1}i^{O2}$ ) and increased relative mortality risk (Hazard Ratio 2,3), but only if D-dimers were  $\geq 4.1$  mg/L. Therefore, it was concluded that they represent a significant prognostic factor. Their combination with several biochemical parameters: urea, AST, D-dimers and prothrombin time, has a potential for creating a simple, but effective prognostic system. Multivariate analysis showed no effect of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with respect to relative risk of PE associated mortality. Troponin I and NT-proBNP were not shown to have a power for predicting disease outcome.

## 10. ŽIVOTOPIS

Tatjana Kereš, dr. med., spec. interne medicine, kardiologije i intenzivne medicine, rođena je 19. rujna 1974. godine u Zagrebu. Završila je Osnovnu školu Slavko Stančir, potom XVI. (jezičnu) gimnaziju. Upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1993. godine, a diplomirala 1999. godine. Jednogodišnji pripravnički staž završila je u KB Merkur. Nakon položenog državnog ispita radila je u Zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba. Godine 2008. započela je specijalizaciju iz interne medicine, a nakon položenog specijalističkog ispita, u studenom 2012. godine, zaposlila se u Zavodu za hitnu i intenzivnu medicinu Klinike za unutarnje bolesti KB Dubrava. Ispit iz uže specijalizacije iz kardiologije položila je 2017. godine, a ispit iz uže specijalizacije iz intenzivne medicine 2019. godine. Od 2018. godine je vršiteljica dužnosti pročelnice Zavoda za hitnu i intenzivnu medicinu Klinike za unutarnje bolesti KB Dubrava. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, u suradnji s Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku, upisala je u akademskoj godini 2017/2018. Autor je i koautor više postera, te stručnih i znanstvenih publikacija. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim i stručnim skupovima, kao aktivni i pasivni sudionik. Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za internističku hitnu i intenzivnu medicinu i Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu u kojem je član upravnog odbora. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.

### Popis radova

1. Špoljar D, Vučić M, Peršec J, Merc V, **Kereš T**, Radonić R, Poljaković Z, Nesek Adam V, Karanović N, Čaljkušić K, Župan Ž, Grubješić I, Kopic J, Vranković S, Krobot R, Nevajdić B, Golubić M, Grosek Š, Kujundžić Tiljak M, Štajduhar A, Tonković D, Borovečki A. Experiences and attitudes of medical professionals on treatment of end-of-life patients in intensive care units in the Republic of Croatia: a cross-sectional study. *BMC Med Ethics*. 2022;23(1):12
2. Paštrovic F, Lucijanic M, Atic A, Stojic J, Barisic Jaman M, Tjesic Drinkovic I, Zelenika M, Milosevic M, Medic B, Loncar J, Mijic M, Filipec Kanizaj T, Kralj D, Lerotic I, Virovic Jukic L, Ljubicic N, Luetic K, Grgic D, Majerovic M, Ostojic R, Krznaric Z, Luksic I, Piskac Zivkovic N, **Keres T**, Grabovac V, Persec J, Barsic B, Grgurevic I. Prevalence and Prognostic Impact of Deranged Liver Blood Tests in COVID-19:

- Experience from the Regional COVID-19 Center over the Cohort of 3812 Hospitalized Patients. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(18):422
3. **Kereš T**, Jukić I, Svaguša T, Prkačin I, Bingulac-Popović J, Vinković M, Hećimović A, Živković M, Parašilovac N. A1B and BB blood group genotypes are risk factors for pulmonary embolism. *Wien Klin Wochenschr*. 2021;133(21-22):1179-1185.
  4. Peršec J, Šribar A, **Kereš T**. Organizational aspects of intensive care unit resource allocation in a primary respiratory intensive care center specialized for the treatment of SARS-COV-2 patients. *Croat Med J*. 2020;61(3):304-305.
  5. Miletić WM, Almahariq F, Sorić M, Žiga S, Baršić Gračanin T, Grabovac V, **Kereš T**. Clinical decision rules in evaluating head trauma in adult population at the emergency department, Dubrava University Hospital. *Acta Med Croatica* 2020;74(Suppl 1):33-38.
  6. Sorić M, Miletić WM, Delić B, Žiga S, Baršić Gračanin T, **Kereš T**, Grabovac V. A case of air in the wrong place in the gastrointestinal tract. *EUSEM Prague 2019*:27.
  7. Grabovac V, Žiga S, **Kereš T**, Sorić M. Neuroleptic malignant syndrome: a case report and discussion. *Signa vitae*. 2014;9(Suppl. 1):88-90.