

# Povezanost genskoga polimorfizma - 455G/A beta-fibrinogena i pojavnosti tromba u aurikuli lijevog atrija u bolesnika s atrijskom fibrilacijom

---

Angebrandt Belošević, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:414053>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Petra Angebrandt Belošević**

**Povezanost genskoga polimorfizma - 455G/A  
beta-fibrinogena i pojavnosti tromba u  
aurikuli lijevog atrija u bolesnika s  
atrijskom fibrilacijom**

**DISERTACIJA**



Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Petra Angebrandt Belošević**

**Povezanost genskoga polimorfizma - 455G/A  
beta-fibrinogena i pojavnosti tromba u  
aurikuli lijevog atrija u bolesnika s  
atrijskom fibrilacijom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Klinici za bolesti srca i krvnih žila, KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Genetska analiza rađena je u Zavodu za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić, diplomirane biologinje.

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Anton Šmalcelj, dr. med.

**Zahvale:** Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Antonu Šmalcelju na pomoći i strpljenju tijekom izrade disertacije te cijelom timu Zavoda za tipizaciju tkiva, pod vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić, na strpljenju, upornosti i predanom radu na laboratorijskoj analizi naših uzoraka. Posebna hvala kolegi dr. sc. Karlu Golubiću, dr. med., na statističkoj analizi te podršci i pomoći u pisanju ovoga rada.

*Disertaciju posvećujem svojim roditeljima.*

## SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. DEFINICIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE .....	1
1.2. PATOFIZIOLOGIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE .....	3
1.2.1. ELEKTROFIZIOLOŠKA PATOFIZIOLOGIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE .....	3
1.2.2. ATRIJSKA KARDIOMIOPATIJA .....	4
1.2.3. PATOFIZIOLOGIJA TROMBOGENEZE KOD ATRIJSKE FIBRILACIJE .....	6
1.3. SIMPTOMI BOLESTI, DIJAGNOSTIČKA OBRADA I LIJEČENJE .....	7
1.3.1. ANTIKOAGULACIJSKA TERAPIJA .....	7
1.3.2. POBOLJŠANJE SIMPTOMA I KVALITETE ŽIVOTA .....	10
1.3.2a ELEKTROKARDIOVERZIJA .....	11
1.3.2b FARMAKOLOŠKA KONVERZIJA .....	11
1.3.2c KATETERSKA ABLACIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE.....	12
1.3.3. KARDIOVASKULARNI RIZIČNI ČIMBENICI I KOMORBIDITETI: DETEKCIJA I LIJEČENJE	12
1.4. ULOGA EHOKARDIOGRAFIJE U ATRIJSKOJ FIBRILACIJI .....	13
1.5. PREVENCIJA EMBOLIZACIJE PRIJE I NAKON KONVERZIJE U SINUSNI RITAM KOD ATRIJSKE FIBRILACIJE .....	15
1.5.1. KONVERZIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE TRAJANJA >48H .....	15
1.5.2. KONVERZIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE TRAJANJA <48H .....	16
1.6. TROMBOGENEZA.....	16
1.7. FIBRINOGEN: GRAĐA I ULOGA U HEMOSTAZI .....	20
1.7.1. ULOGA I GRAĐA FIBRINOGENA.....	20
1.7.2. POREMEĆAJI FIBRINOGENA .....	21
1.8. GENETIKA FIBRINOGENA I POLIMORFIZMI .....	21
1.8.1. LJUDSKI GENOM.....	21
1.8.2. POLIMORFIZMI .....	23
1.8.3. POLIMORFIZMI FIBRINOGENA .....	24
1.9. PREDIKTORI TROMBOZE LIJEVOG ATRIIA.....	26
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	28
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	29
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	30
4.1. TIP ISTRAŽIVANJA I ISPITANICI .....	30
4.2. ANALIZA KRVI I PRIKUPLJANJE PODATAKA .....	32
4.2.1. GENSKA ANALIZA.....	32
4.2.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA.....	34

4.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	35
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	42
5.1. PRIKAZ SOCIO-DEMOGRAFSKIH, KLINIČKIH, EHOKARDIOGRAFSKIH I BIOKEMIJSKIH KARAKTERISTIKA UKLJUČENIH ISPITANIKA .....	42
5.2. PRIKAZ RASPODJELE -455G/A POLIMORFIZMA KOD ISPITANIKA.....	47
5.3. PRIKAZ SOCIO-DEMOGRAFSKIH, KLINIČKIH, EHOKARDIOGRAFSKIH, BIOKEMIJSKIH I GENETSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA NAKON PROVEDENE METODE UPARIVANJA PREMA VJEROJATNOSTI SKLONOSTI.....	48
6. RASPRAVA .....	52
7. ZAKLJUČAK .....	57
8. SAŽETAK .....	58
9. SUMMARY .....	59
10. LITERATURA.....	60
11. ŽIVOTOPIS .....	74

## **POPIS KRATICA I OZNAKA**

AF	atrijska fibrilacija
OSA	opstruktivna apneja u spavanju
EKG	elektrokardiogram
AHRE	„atrial high-rate episodes“, hrv. epizode atrijske aktivnosti visoke frekvencije
UA	undulacija atriya
KRI	kronična renalna insuficijencija
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
WPW	Wolff Parkinson White
FG	fibrinogen
CRP	C-reaktivni protein
LA	lijevi atrij
CVI	cerebrovaskularni inzult
TIA	tranzitorna ishemijska ataka
SEK	spontani echo kontrast
TTE	transtorakalna ehokardiografija
TEE	transezofagealna ehokardiografija
OAK	oralni antikoagulans
IL-6	interleukin 6
INR	internacionalni normalizirani omjer
NOAK	novi oralni antikoagulans
DOAK	direktni oralni antikoagulans
3D	trodimenzionalno
2D	dvodimenzionalno
CT	kompjutorizirana tomografija
MR	magnetna rezonanca
vWF	von Willebrandov faktor
FGA	geni za alfa lanac fibrinogena
FGB	geni za beta lanac fibrinogena
FGG	geni za gamma lanac fibrinogena
FPA	fibrinopeptid A
FPB	fibrinopeptid B
PV	protrombinsko vrijeme
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
TV	trombinsko vrijeme
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“, hrv. polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata
VNTR	„variable number of tandem repeats“, hrv.varijabilni broj tandemskih ponavljanja
SSR i STR	„simple sequence repeats“ i „simple tandem repeat, i.e. microsatellites“, hrv. mikrosateliti ili ponavljanje jednostavne sekvence
SNP	„single nucleotide polymorphysm“, hrv. jednonukleotidni



	polimorfizam
PCR	„polymerase chain reaction, hrv. lančana reakcija polimeraze
OD	„odds ratio“, hrv. omjer izgleda
CI	„confidence interval“, hrv. interval pouzdanosti
ROC	„receiver operating characteristic“, hrv. krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti
AUC	„area under the curve“ hrv. površina ispod krivulja
LVEF	ejekcijska frakcija lijevog ventrikula

## 1.UVOD I SVRHA RADA

Atrijska fibrilacija (AF) najčešća je postojana (trajanja  $\geq 30$  s) aritmija s prevalencijom koja zahvaća 2-4% odrasle opće populacije. Pretpostavlja se da će se u sljedećih nekoliko desetljeća, zbog produljenja životne dobi i bolje detekcije prevalencija fibrilacije atrijske, više nego udvostručiti. Atrijska fibrilacija češća je u muškaraca nego u žena, rijetka je prije pedesete godine života, a nakon šezdesete godine učestalost joj naglo raste. Povezana je sa značajnim morbiditetom i mortalitetom. (1) Aritmija je koja predstavlja veliko opterećenje kako za bolesnika, tako i za liječnika, zdravstveni sustav kao i društvo općenito. Životna dob jedan je od najznačajnijih nepromjenjivih rizičnih čimbenika, no tu su i svi ostali kao: arterijska hipertenzija, šećerna bolest, pretilost, koronarna bolest, kronična renalna insuficijencija, opstruktivna apneja u spavanju (OSA), srčano popuštanje i brojni drugi rizični čimbenici.

### 1.1.DEFINICIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE

Atrijska fibrilacija jest supraventrikularna aritmija koja nastaje kao posljedica nekoordinirane atrijske električne aktivnosti što dovodi do neadekvatne atrijske kontrakcije. Elektrokardiografski kriteriji (EKG kriteriji) za atrijsku fibrilaciju jesu: iregularni R-R intervali, nedostatak prepoznavajućeg ponavljajućeg P vala, te iregularna atrijska aktivacija. (1)

Atrijsku fibrilaciju dijelimo na:

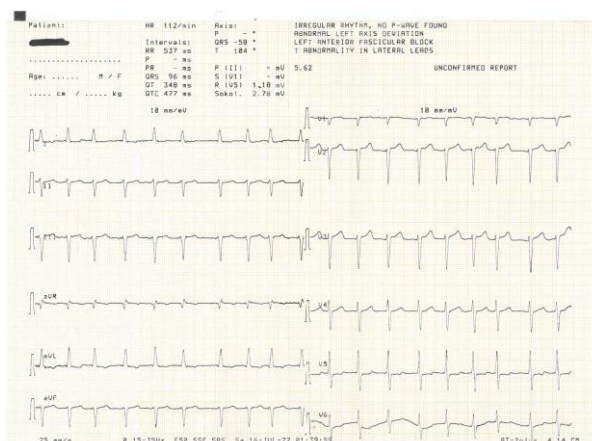
- kliničku atrijsku fibrilaciju
- subkliničku
- tzv. „atrial high-rate episode“ (AHRE).

Klinička atrijska fibrilacija može biti simptomatska ili asimptomatska, no mora biti registrirana EKG-om, gdje zapis mora trajati minimalno 30 sekundi ili mora uključivati 12-kanalni EKG. AHRE su epizode atrijske aktivnosti koje se detektiraju implantabilnim srčanim uređajima s atrijskom elektrodom koje moraju evaluirati educirane osobe te u slučaju potvrde da su navedene epizode AF ili undulacija atrijske (UA), tada govorimo o subkliničkoj atrijskoj fibrilaciji. Dodatno, atrijsku fibrilaciju možemo podijeliti, prema učinku na kliničku sliku bolesnika, na hemodinamski stabilnu, odnosno hemodinamski nestabilnu, koja zahtijeva hitnu medicinsku intervenciju. Uobičajena je klinička podjela i ona prema dužini trajanja aritmije te tako govorimo o:

- prvoj epizodi atrijske fibrilacije
- paroksizmalnoj atrijskoj fibrilaciji
- perzistentnoj atrijskoj fibrilaciji
- dugo perzistirajućoj te trajnoj atrijskoj fibrilaciji.

Prva dijagnoza atrijske fibrilacije smatra se ako do tada navedena aritmija nije nikad registrirana neovisno o simptomima ili težini bolesti.

Paroksizmalna je pak ona koja prestaje spontano ili uz medicinsku intervenciju unutar sedam dana od početka, perzistentna je ona koja traje duže od sedam dana, uključujući i one koje se terminiraju nakon sedam dana, bilo medikamentozno, bilo elektrokardioverzijom. Aritmije koje traju duže od dvanaest mjeseci i kod kojih i dalje postoji strategija kontrole ritma smatraju se tzv. dugoperzistirajućim atrijskim fibrilacijama. U trenutku kada aritmija traje toliko dugo da su je i bolesnik i liječnik akceptirali kao vodeći ritam te odustaju od strategije liječenja održavanja sinusnog ritma, već prihvaćaju fibrilaciju atriya kao osnovni ritam, govorimo o trajnoj atrijskoj fibrilaciji. Ritam fibrilacije atriya u EKG-u prikazuje Slika 1.



Slika 1. Atrijska fibrilacija u EKG-zapisu

Nove smjernice europskoga kardiološkoga društva za dijagnostiku i liječenje atrijske fibrilacije uvode novi pristup zbrinjavanju bolesnika pod pojmom **4S-AF shemu** (**S**troke risk, **S**ymptom severity, **S**everity of AF burden, **S**ubstrate severity) koji dominantno skreće pozornost na ključne stvari u liječenju bolesnika: prevenciju neželjenih tromboembolijskih događaja adekvatnom antikoagulantnom terapijom, smanjenje intenziteta simptoma koji remete kvalitetu života, smanjenje opterećenja koje stvara aritmija na različitim poljima (opterećenje za bolesnika, opterećenje za zdravstveni sustav, opterećenje za gospodarstvo i financije države itd.), stupnjevanje i liječenje komorbiditeta koji u konačnici modificiraju tijek i prognozu bolesti. (1) Rizične čimbenike za atrijsku fibrilaciju dijelimo na:

1. demografske (dob, spol, rasa, socioekonomski status)
2. životne navike (pušenje, konzumacija alkohola, tjelesna aktivnost, konzumacija kofeina, kompetitivni i profesionalni sportovi)
3. zdravstveni čimbenici (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, dislipidemija, kronična renalna insuficijencija (KRI), kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB), OSA itd.)
4. kardiovaskularni komorbiditeti (koronarna bolest, srčano zatajivanje, kongenitalne bolesti, valvularne bolesti)

5. subklinička ateroskleroza (aterosklerotski plakovi koronarnih arterija, karotidni plak itd.)
6. poremećaji srčanoga ritma (bolest sinusnoga čvora, Wolff-Parkinson-White sindrom (WPW), PR prolongacija)
7. genetski čimbenici (kratki QT, obiteljska anamneza pozitivna na AF, genski lokusi osjetljivi na AF)
8. upala (fibrinogen (FG), C-reaktivni protein (CRP))
9. poremećaj rada štitnjače
10. autoimune bolesti te ostali čimbenici kao što je sepsa, zagađenje zraka te psihološki čimbenici, kako kod žena, tako i kod muškaraca.(1)

Genetički čimbenici mogu se svrstati u dvije velike skupine: rijetke genetske varijante s jakim učincima i jasnim fenotipom (mutacije pojedinačnih gena) i česte genetske varijante sa slabijim učincima i slabije izraženim fenotipom (polimorfizmi pojedinačnih nukleotida).(2)

## 1.2.PATOFIZIOLOGIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE

### 1.2.1. ELEKTROFIZIOLOŠKA PATOFIZIOLOGIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE

U patofiziologiji atrijske fibrilacije bitnim su se pokazali brojni i različiti čimbenici. Oni uključuju različite oblike ionskog remodeliranja, strukturnog remodeliranja, anatomskih karakteristika trodimenzionalne strukture lijevoga atrija, hemodinamski čimbenici i električke aktivnosti u području plućnih vena, promjene u funkciji i distribuciji proteina koneksina te skalu različitih signalnih puteva. Premda se cijelo stoljeće raspravlja o raznim elektrofiziološkim poremećajima koji potiču i održavaju aritmiju, još je mnogo nepoznanica. Atrijska fibrilacija kompleksna je aritmija koja se naziva i kompletnom aritmijom, ne samo zbog karakteristične apsolutne aritmije ventrikula, već i zbog činjenice što uključuje sve ključne mehanizme nastanka aritmije: povećanu automatičnost, kruženje vala depolarizacije, rane i odgođene naknadne depolarizacije (2,5). U posljednjih desetak godina svjedočimo velikom broju istraživanja i novih spoznaja o mehanizmu nastanka atrijske fibrilacije koji su uvelike promijenili način liječenja, primarno liječenje ablacijskim metodama, a također modificirali i medikamentozno liječenje, primarno antiaritmicima.

Smatra se da aritmiju stvara spora i neravnomjerna provodljivost miokarda lijevog atrija. Osnovni mehanizam nastanka čine inicijalni ektopični impulsi, tzv. okidači i valovi kruženja („reentry“). Okidači aritmije potiču kruženje. Pod okidačem se smatra vrlo brz slijed depolarizacija iz žarišta u ušćima plućnih vena koji stvara i održava nepravilno kruženje mnogostrukih valova depolarizacije atrijskim miokardom (tzv. „microreentry“). Za održavanje mehanizma „microreentry“ ključno je elektrofiziološko remodeliranje atrijskog miokarda uz stvaranje sekundarnih mehanizama koji održavaju fibrilaciju (engl. „drivers“ i „rotors“). Također kada se spominju tzv. „rotori“, zna se da su oni bitni ne samo za nastanak, već i za progresiju aritmije. Tako neki radovi opisuju da razlika između paroksizmalne i kronične atrijske fibrilacije ovisi o aktivnosti stabilnosti „rotora“ te da „rotori“ koji su stabilni i brzi dovode do stabilnije i dugotrajnije aritmije koja se teško terminira, za razliku od paroksizmalne.(3)

Promjene strukture, veličine i funkcije atrijskog tkiva zbog genetskih čimbenika, bolesti, starenja, hemodinamskog opterećenja, poremećaja autonomnog živčanog sustava, čine osnovu za elektrofiziološko remodeliranje atrijskog miokarda koje potiče automatičnost ektopijskih depolarizacija i mehanizme kruženja. Smatra se da su brojni neurotransmiteri i neurohormonalni transdukcijski signalni sustavi odgovorni za atrijsko remodeliranje i na taj način održavaju aritmiju.(4) Navedeno nazivamo atrijskom fibrilacijom izazvano remodeliranje i ono je u početku reverzibilno, no što aritmija traje duže, ono postaje ireverzibilno. Nadalje, različite abnormalnosti akcijskog potencijala stanica miokarda opisane su kod različitih oblika atrijske fibrilacije, kako u eksperimentalnim, tako i kliničkim modelima.(5) Područje istraživanja su i proteini koneksini, spojni proteini odgovorni za intracelularnu komunikaciju te su brojni eksperimenti dokazali brojne promjene u navedenim proteinima, kako u njihovoj funkciji, tako i u njihovoj distribuciji kod atrijske fibrilacije.(6) Ključ razumijevanja mehanizma nastanka atrijske fibrilacije bila je publikacija Haissaguerre i suradnika te njihove opservacije plućnih vena kao inicijatora njezina nastanka.(7) Bakker i suradnici opisali su izvanstanične i unutarstanične potencijale detektirane u regiji oko plućnih vena, kao i anizotropne karakteristike miokardnog tkiva oko plućnih vena, koje je povezano s atrijskom aritmogenezom.(8) Opisane su i brojne promjene duljine trajanja refraktornog perioda, disperzije refrakternosti, kao i kašnjenja u provođenju impulsa kod atrijske fibrilacije te dokazi o promjenama na samim ionskim kanalima, prvenstveno na kalcijским kanalima, koji se mogu povezati s molekularnim promjenama i molekularnim remodelingom kod AF-a. (9,10) Osim već spomenute fibroze atrijskog tkiva, puno se razmatra i učinak oksidativnoga stresa na stvaranje fibrilatornog potencijala u tkivu atrijske, a najnovije spoznaje upućuju na to da taloženje masnih stanica unutar tkiva atrijske dovodi do promjene električnog potencijala stanica te time stvara uvjete za fibrilatornu provodljivost. Što dulje atrijska fibrilacija traje, to se zbog elektrofiziološkog remodeliranja atrijskog miokarda teže vraća u sinusni ritam. Postoji nekoliko eksperimentalnih studija koje su pokušale dokazati moguću prevenciju atrijskog remodelinga različitim intervencijama, kao npr. inhibitorima angiotenzin konvertirajućeg enzima ili blokatorima kalcijских kanala, no još uvijek bez potpuno pozitivnih rezultata u tom području.(11,12) Brojne studije primarno se fokusiraju na protuupalne lijekove, antioksidanse, lijekove koji ciljaju na sustav renin-angiotenzin-aldosteron te omega-3 nezasićene masne kiseline. No, iako su retrospektivne i opservacijske analize o toj temi davale obećavajuće rezultate, niti jedna randomizirana studija do sada nije pokazala efikasnost tih lijekova na primarnu ili sekundarnu prevenciju atrijske fibrilacije. (13)

### 1.2.2. ATRIJSKA KARDIOMIOPATIJA

Atrijska kardiomiopatija ključ je razumijevanja progresije i održavanja aritmije te njezina tromboembolijskoga potencijala. To je svaka strukturna, arhitektonska, kontraktilna ili elektrofiziološka promjena koja ima relevantnu kliničku manifestaciju.

Mnoge bolesti, kao npr. hipertenzija, pretilost, srčano zatajivanje, šećerna bolest ili stanja kao npr. endokrinološke bolesti i starenje, mogu dovesti do razvoja atrijske kardiomiopatije.(13)

Kada je riječ o patofiziologiji i histologiji atrijske kardiomiopatije, postoji njezina deskriptivna podjela koja nam pomaže razumjeti zbivanja u tkivu atrija kod pojedinih stanja i bolesti, no isto tako zna se da različiti dijelovi atrija mogu imati različite histološke promjene, kao i da se histološke promjene unutar samog atrija i kod određene bolesti s vremenom mijenjaju.

Postoje četiri histološka tipa atrijske kardiomiopatije:

1. primarno kardiomiocitna
2. primarno fibroblastna
3. miješana kardiomiopatija
4. nekolagenska kardiomiopatija.

Primarno kardiomiocitna kardiomiopatija stanje je gdje su promjene dominantno na razini stanice te se taj histološki tip aritmije najčešće viđa kod tzv. izolirane atrijske fibrilacije, kod nasljedne aritmije te kod atrijske fibrilacije u bolesnika sa šećernom bolesti. Primarno fibroblastna kardiomiopatija pokazuje prvenstveno histološke promjene u vidu taloženje fibrina i vezivnoga tkiva te se vidi kod starijih bolesnika i kod pušača duhanskih proizvoda. Miješana kardiomiopatija stanje je gdje su promijenjene stanice, ali je prisutno i taloženje vezivnog tkiva i fibrina (promjene koje vidimo kod aritmije kod valvularnih bolesti i srčanoga zatajivanja) te u konačnici nekolagenska kardiomiopatija stanje je gdje se vide promjene u izvanstaničnom matriksu koje nisu vezane za taloženje fibrina, već primarno masnih stanica, upalnih stanica, amiloida (to se vidi kod npr. amiloidoze, bolesti nakupljanja, raznih upalnih bolesti itd.).(13)

Izolirana atrijska fibrilacija smatra se onom kod koje nema drugih jasnih bolesti ili stanja koje se mogu povezati s navedenom aritmijom. No termin je zapravo povijesni, poprilično zbunjujući i trebalo bi ga izbjegavati jer porastom znanja o samoj patofiziologiji aritmije, gotovo kod svakog pacijenta u konačnici se nađe uzrok aritmije. Nešto je češća kod muškaraca te ima izrazito nizak tromboembolijski rizik. Osim izolirane atrijske fibrilacije, atrijska kardiomiopatija nalazi se i u drugim bolestima kao npr. izoliranoj amiloidozi atrija, bolesti povezanih s mutacijama gena za atrijske natriuretske peptide te kod raznih nasljednih mišićnih distrofija koje se u velikoj većini manifestiraju i na kardiovaskularnom sustavu, primarno srčanom mišiću. Druga patološka stanja s razvojem atrijske kardiomiopatije jesu: srčano zatajivanje, OSA, valvularne bolesti (aortna stenoza, mitralna stenoza i mitralna regurgitacija), pretilost, šećerna bolest, miokarditis, arterijska hipertenzija te lijekovima inducirana kardiomiopatija (inotropni lijekovi, kemoterapeutici itd.). (13) Različiti čimbenici dovode do kompleksnih promjena na razini tkiva atrija, kao što je npr. stresom izazvana fibroza, hipokontraktilnost, masne naslage, upala, vaskularno remodeliranje, ishemija tkiva, nestabilnost kalcija te disfunkcija ionskih kanala.

Sve navedeno dovodi do pojačane ektopične aktivnosti atrijske kao i poremećaja provođenja što dovodi do razvoja i održavanja aritmije te dodatno potiču razvoj hiperkoagulabilnog stanja, ne samo unutar tkiva atrijske, već i globalno na razini cijelog organizma. Hipokontraktilitet dovodi do lokalnoga smanjenja atrijske endotelijalne funkcije, što dovodi do povećanja ekspresije inhibitora aktivatora plazminogena, dok ishemijom inducirana upala dovodi do pojačane ekspresije adhezivnih molekula na endotelu te se time povećava ekspresija tkivnog faktora u krvotoku. Sve navedeno dovodi do sklonosti razvoju ugrušaka. Sama atrijska fibrilacija dodatno pogoršava sve navedene mehanizme što objašnjava njezinu progresivnost.(1)

Tranzicija paroksizmalne atrijske fibrilacije u perzistentnu ili subkliničku u kliničku praćena je razvojem atrijske remodeliranja i pogoršanja atrijske kardiomiopatije. Godišnja stopa progresije paroksizmalne u perzistentnu ili permanentnu atrijsku fibrilaciju iznosi od <1% do 15%, u nekim studijama koje imaju praćenje više od deset godina čak doseže 36%. Rizikni čimbenici za progresiju jesu dob, arterijska hipertenzija, KOPB, koronarna bolest, šećerna bolest, veličina lijevog atrijske (LA), ranije preboljeli cerebrovaskularni infarkt (CVI) itd. Također još uvijek nije sasvim jasno dovodi li progresija atrijske fibrilacije do neželjenih kardiovaskularnih događaja, hospitalizacija, lošije prognoze i smrti ili je ona samo marker neprepoznate progresivne bolesti.(1) No isto tako poznato je da je glavni prediktor progresije bolesti i tromboembolijskoga rizika zapravo veličina lijevog atrijske te bolesnici kod kojih dolazi do povećanja volumena i veličine atrijske imaju češće srčano zatajivanje, moždani udar i srčani udar u odnosu na one kod kojih se veličine i volumen atrijske ne mijenjaju.(14)

### 1.2.3. PATOFIZIOLOGIJA TROMBOGENEZE KOD ATRIJSKE FIBRILACIJE

Kada je riječ o patofiziologiji trombogeneze, dobro je poznata Virchowljeva trijada nastanka tromba: abnormalnost krvne žile, abnormalnost krvnog protoka i abnormalnost krvnih stanica. U atrijskoj fibrilaciji strukturne su promjene samoga atrijske protrombotske i dokazane su u brojnim imunohistokemijskim i histološkim studijama. Abnormalnost toka krvi vidi se transezofagelanom ultrazvukom srca kao spontani eho kontrast (SEK) unutar samoga atrijske te spore brzine protoka krvi na razini aurikule.

Abnormalnosti krvnih stanica i matriksa vide se kao poremećaji trombocita, koagulacijske kaskade, poremećaj inflamatornih stanica, poremećaj fibrinolize itd. Također, tromb unutar atrijske po sastavu se značajno razlikuje od tromba u arterijama, potonji je dominantno trombocitima obogaćen tzv. „bijeli“ tromb, dok je onaj u atrijsku dominantno eritrocitima i fibrinom bogati tromb, tzv. „crveni“ tromb. Uvećanje lijevog atrijske dovodi do povećanog stresa istezanja kao posljedica povećanog intraatrijskoga tlaka. Postoji jasna klinička povezanost između uvećanja lijevog atrijske i pojavnosti aritmije i moždanog udara, povećanog rizika od smrti kod infarkta miokarda, povećanog rizika od hospitalizacije kod srčanog zatajivanja te velikih kardiovaskularnih događaja i smrti kod bolesnika sa šećernom bolesti. Lijevi atrij također je marker težine i kroniciteta dijastoličke disfunkcije miokarda.(14–16)

### 1.3. SIMPTOMI BOLESTI, DIJAGNOSTIČKA OBRADA I LIJEČENJE

Svim bolesnicima potrebno je napraviti kompletan pregled i anamnezu, 12-kanalni EKG, kompletnu krvnu sliku, analizu bubrežne funkcije, hormonski status štitnjače te elektrolitski status. Također, svi bolesnici trebaju učiniti transtorakalni ehokardiografski pregled (TTE). Kod određenih bolesnika bit će nužne i druge pretrage, kao npr. koronarografija kod onih koji su suspektni za koronarnu bolest, kod onih kod kojih je potrebna kontrola srčane frekvencije i ritma trebat će i 24-satno mjerenje EKG-a, dok pak oni bolesnici kojima se planira elektrokardioverzija u sinusni ritam, kako bi se isključilo tromboembolizacija u atrijskoj lijevoj aatriji, trebat će i transezofagealni ultrazvuk srca (TEE).

Većina bolesnika zapravo neće imati simptome aritmije te će ona biti slučajno otkrivena, dok će pak, ako aritmija uzrokuje razvoj srčanoga popuštanja, bolesnici primarno imati simptome zaduhe, oticanja ekstremiteta, bolova u prsima, a samu aritmiju neće osjetiti. Najlošija, no nažalost i relativno česta situacija jest da se bolesnicima s akutnim cerebrovaskularnim događajem prvi put otkriva aritmija u EKG zapisu. Dakako, postoje i oni bolesnici kojima fibrilacija atrijske komore značajno remeti kvalitetu života i ograničava svakodnevne aktivnosti. Stoga je nužno odrediti kod svakoga bolesnika stupanj jačine simptoma kako bi se mogao izabrati pravi modalitet liječenja.

U navedenom pomaže EHRA tablica gdje se jačina simptoma bolesnika svrstava u jednu od četiriju kategorija:

1. asimptomatski bolesnici
2. blagi simptomi- simptomi koji ne remete svakodnevne aktivnosti bolesnika
3. teški simptomi koji remete svakodnevne aktivnosti bolesnika
4. izraziti simptomi koji ograničavaju bolesnika u njegovim svakodnevnim aktivnostima.

Pri liječenju bolesnika s atrijskom fibrilacijom vodi se principom trijade u kojoj ključnu riječ ima antikoagulacijska terapija s ciljem prevencije tromboembolijskih neželjenih događaja, zatim poboljšanje simptoma i kvalitete života te smanjivanje i modifikacija kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta.

#### 1.3.1. ANTIKOAGULACIJSKA TERAPIJA

Atrijska fibrilacija povećava rizik za moždani udar pet puta, no rizik nije homogen, već ovisi o raznim rizičnim čimbenicima. Najrelevantniji rizični čimbenici dio su kliničkog alata za procjenu tromboembolijskoga rizika tzv. bodovni sustav **CHA2DS2-VASc** (**C**ongestive heart failure, **H**ypertension, **A**ge  $\geq 75$  year, **D**iabetes mellitus, **S**troke, **V**ascular disease, **A**ge 65-74, **S**ex category (female)), gdje srčano zatajivanje, arterijska hipertenzija, dob starija od 65 godina, preboljeli moždani udar, vaskularna bolest, šećerna bolest te ženski spol predstavljaju klinički najrelevantnije rizične čimbenike za razvoj neželjenih tromboembolijskih događaja kod bolesnika koji imaju atrijsku fibrilaciju.(1)



Navedeni alat služi pri odlučivanju o tome koji bolesnici imaju značajan rizik te zahtijevaju oralnu antikoagulantnu terapiju (OAK) s ciljem prevencije moždanoga udara. Niskim rizikom smatra se bodovni rezultat 0 kod muškaraca i 1 kod žena te ta skupina bolesnika ne zahtijeva OAK jer je njihov godišnji rizik od moždanog udara izrazito nizak. Svi ostali bolesnici koji imaju zbroj bodova  $\geq 2$  smatraju se visokim rizikom te imaju apsolutnu indikaciju za OAK. Muškarci s bodovnim rezultatom 1 u nešto su većem riziku te opservacijske studije i subanalize velikih studija sa OAK-ima govore da benefit od prevencije tromboembolijskih događaja nadmašuje eventualni rizik od krvarenja. Stoga je kod njih antikoagulantna terapija preporučena, no nije apsolutno indicirana, prema aktualnim smjernicama.(17,18) Inicijalno se primjenjivao bodovni sustav CHADS2, no danas je aktualan sustav CHA2DS2-VASc koji u značajnoj mjeri može prepoznati bolesnike s malim rizikom koji ne zahtijevaju antikoagulantnu terapiju. (19) Karakteristike navedene bodovne tablice donosi Tablica 1.

Tablica 1. Komparacija dva bodovna sustava CHADS2 i CHA2DS2VASc

CHADS2	bodovi	CHA2DS2VASc	bodovi
kronično srčano zatajivanje	1	kronično srčano zatajivanje	1
hipertenzija	1	hipertenzija	1
dob > 75	1	dob > 75	2
šećerna bolest	1	šećerna bolest	1
CVI/TIA	2	CVI/TIA	2
		vaskularna bolest	1
		dob 65-74	1
		spol (ženski)	1

Kad je riječ o ženskom spolu, zna se da, ako nema drugih rizičnih čimbenika osim spola, žene imaju mali rizik od moždanoga udara, no postoji li samo jedan dodatni rizični čimbenik uz spol, žene imaju značajnije veći rizik od muškaraca s istim rizičnim čimbenikom, stoga je u toj situaciji antikoagulantna terapija apsolutno indicirana. Koliko god bodovne tablice bile korisne u kliničkome radu, mora postojati svjesnost o njihovoj limitiranosti i promjenjivosti te kod svakog kliničkog posjeta treba revidirati stupanj rizika za svakoga bolesnika. Dokazano je da se kod tih bolesnika od trenutka dijagnosticiranja atrijske fibrilacije do u prosjeku četiri-pet mjeseci pojavljuje do 90% komorbiditeta, a time se zasigurno i mijenja njihov rizik za moždani udar.(20)

Postoje i brojni drugi klinički rizični čimbenici koji su povezani s povećanim rizikom od tromboembolije kao npr.: KRI, OSA, hipertrofijska kardiomiopatija, amiloidoza, dislipidemija, pušenje, metabolički sindrom, maligne bolesti(21,22) kao i neki ehokardiografski pokazatelji kao što su: dilatacija lijevog atrija, reducirana ejekcijska frakcija miokarda, spontani eho kontrast ili tromb u lijevom atriju, niske doplerske brzine u aurikuli LA, kompleksni aortni plak.(23)

Uz sve navedeno postoje i biomarkeri koji se mogu povezati s povećanim tromboembolijskim rizikom kao što su: troponin T i I, natriuretski peptidi, proteinurija, CRP, interleukin 6 (IL-6), D-dimer itd. (24)

Jednako kako se procjenjuje rizik od tromboembolije, pri uvođenju OAK-a potrebna je procjena i rizika od krvarenja. Postoje brojni promjenjivi i nepromjenjivi rizični čimbenici za krvarenje. Među nepromjenjivima to su svakako: dob, ranija velika krvarenja, teško oštećenje jetrene funkcije i bubrežne funkcije koje zahtijeva hemodijalizu, maligna bolest, raniji moždani udar, šećerna bolest, demencija. Djelomično promjenjivi su: veliki rizik od padova, anemija, trombocitopenija, blago i umjereno bubrežno oštećenje, dok su promjenjivi: hipertenzija, konkomitantna terapija s nesteroidnim antireumaticima, opasni sportovi itd. I pri procjeni rizika od krvarenja postoje korisne bodovne tablice kao npr. bodovna tablica HAS-BLED, prema kojoj se pacijenti svrstavaju u one s malim rizikom od krvarenja, umjerenim ili velikim rizikom. (1) Detalji bodovne tablice za procjenu rizika od krvarenja donosi Tablica 2.

Tablica 2. Bodovna tablica HAS-BLED

slovo	klinička karakteristika	bodovi
H	Hipertenzija	1
A	Abnormalna bubrežna ili jetrena funkcija	1 ili 2
S	„Stroke“ (CVI/TIA)	1
B	„Bleeding“ krvarenje	1
L	Labilan INR	1
E	„Elderly“ (dob>65)	1
D	„Drugs“ lijekovi ili alkohol	1 ili 2
maksimalni rezultat		9

Međutim, kod odluke o uvođenju antikoagulantne terapije rizik od krvarenja nije apsolutna kontraindikacija, već se nastoji rizik modificirati, brojnim modificirajućim rizičnim čimbenicima te na taj način rizik od krvarenja učiniti prihvatljivim. Apsolutne kontraindikacije za OAK ima svega nekoliko: teška trombocitopenija (trombociti < 50/ $\mu$ L), teška anemija koja zahtijeva nadomjesnu terapiju eritrocitnim pripravcima i/ili dovodi do hemodinamske nestabilnosti bolesnika te nedavno veliko krvarenje kao npr. intrakranijsko krvarenje. (1) Oralna antikoagulantna terapija sastoji se od nekoliko komponenti: antagonisti vitamina K, lijekovi koji nisu antagonisti vitamina K – novi oralni antikoagulansi (NOAK), odnosno direktni oralni antikoagulansi (DOAK), oralni antritrombocitni lijekovi te kirurško liječenje (okluderi aurikule lijevoga atrija). Antagonisti vitamina K, varfarin kao najznačajniji predstavnik skupine, smanjuju rizik za moždani udar za 64%, smrtnost za 26% te su još uvijek jedni od najpropisivanijih lijekova diljem svijeta. (25) Varfarin je još uvijek jedini antikoagulans kod reumatske teške mitralne stenoze te u slučajevima implantiranih umjetnih srčanih valvula. Ono što čini njegove nedostatke jesu prilagodba doze ovisno o internacionalnom normaliziranom omjeru (INR) te činjenica da je lijek efikasan i siguran samo unutar terapijske širine.

U četiri randomizirano kontrolirane studije apiksaban, dabigatran, rivaroksaban i edoksaban, kao predstavnici lijekova koji nisu antagonisti vitamina K, pokazali su se neinferiornijima u odnosu na varfarin u prevenciji moždanog udara i/ili sistemske embolije. (26–29) Metaanaliza triju randomizirano kontroliranih studija pokazala je kako su NOAK-i povezani sa smanjenjem rizika od moždanoga udara i embolije za 19%, 51% smanjenje rizika za intrakranijsko krvarenje te podjednako smanjenje rizika za ishemijski moždani udar u komparaciji s varfarinom.(30) Kada je riječ o antitrombocitnoj terapiji, ona nema mjesta u prevenciji od moždanoga udara i embolizacije, već čak može biti i štetna, kao npr. acetilsalicilna kiselina koja se povezuje s većom smrtnošću, pogotovo među starijom populacijom. Dvojna antitrombocitna terapija (acetilsalicilna kiselina + klopidogrel) štiti jednako kao i varfarin, no ima značajan rizik od krvarenja te također ne predstavlja zlatni standard u prevenciji tromboembolije, kao što to jesu primarno oralni antikoagulansi.(31,32) Zatvaranje aurikule lijevoga atrija uređajima kao što su okluderi ili kirurški za vrijeme kardiokirurške operacije, dodatna je metoda prevencije moždanoga udara i sistemske embolizacije kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom. Za okludere (sustav WATCHMAN) postoji samo jedna randomizirano kontrolirana studija koja je dokazala da okluderi nisu inferiorniji u odnosu na varfarin u prevenciji moždanoga udara, a u dužem kliničkom praćenju mogu imati manju stopu krvarenja. Njihovo je mjesto u kliničkoj praksi kod pacijenata koji imaju apsolutnu kontraindikaciju za OAK te će se njihova efikasnost i sigurnost dokazati budućim istraživanjima u tom području.(31)

### 1.3.2. POBOLJŠANJE SIMPTOMA I KVALITETE ŽIVOTA

U medikamentoznom liječenju atrijske fibrilacije postoje dva principa: ili se bolesnika pokušava vratiti u normalan sinusni ritam, tzv. ritam kontrola strategija, ili se atrijska fibrilacija prihvaća kao osnovni ritam i liječenje se vodi tzv. strategijom kontrole srčane frekvencije.(13,33) Ako se kontrolira srčana frekvencija, aktualne smjernice govore da je ciljna vrijednost broj otkucaja <110/min za vrijeme mirovanja bolesnika. Ciljna frekvencija može se postići korištenjem beta-blokatora, digoksina, diltiazema i verapamila ili njihove kombinacije. U slučajevima kada medikamentozna terapija ne uspijeva postići ciljanu frekvenciju, dodatna metoda liječenja je i ablacija AV-čvora uz implantaciju trajnog elektrostimulatora srca. Pri prvoj epizodi atrijske fibrilacije racionalno je pokušati vratiti bolesnika u sinusni ritam radi smanjenja simptoma i poboljšanja kvalitete života. Također, ritam kontrola strategija indicirana je kod svake atrijske fibrilacije koja je simptomatska i značajno narušava kvalitetu života, neovisno o tome koja je to epizoda aritmije po redu. Metode konverzije u sinusni ritam mogu biti: elektrokardioverzija, farmakološka konverzija i kateterska ili kirurška ablacija. Indikacije za kardioverziju jesu hemodinamska nestabilnost, prva epizoda atrijske fibrilacije, simptomatska perzistentna atrijska fibrilacije, česte epizode AF-a koje ne prestaju spontano, a simptomatske su, potencijalno reverzibilan uzrok aritmije (operativni zahvati, plućna embolija, infektivna zbijanja). Postoje i neki razlozi koji idu u prilogu prihvaćanja atrijske fibrilacije kao osnovnog ritma, uz male izgleda da se zadrži sinusni ritam nakon uspješne konverzije.

To su: atrijska fibrilacija prisutna je trajno više od godinu dana, značajno uvećanje lijevog atrija (volumen lijevog atrija > 40 ml/m<sup>2</sup>), kod bolesnika koji su na adekvatnoj dozi antiaritmjskih lijekova imali rekurencije aritmije, kod drugih bolesti koje podržavaju aritmiju te onemogućavaju održavanje sinusnoga ritma (tireotoksikoza, perikarditis, značajna bolest mitralne valvule).

Kod odluke o konverziji moramo provjeriti trajanje aritmije te antikoagulantne lijekove. Ako bolesnik nije do tada imao u terapiji antikoagulantne lijekove, treba ih uključiti u terapiju što prije nakon otkrivanja aritmije. Nadalje, ključno je odrediti trajanje aritmije; ako atrijska fibrilacija traje <48h, može se pristupiti pokušaju konverzije u sinusni ritam. Međutim, ako AF traje >48h, mora se prije konverzije isključiti postojanje tromba u aurikuli lijevoga atrija ili uvesti trajnu antikoagulantnu terapiju u trajanju najmanje tri tjedna prije konverzije. U slučaju terapije varfarinom mora postojati sigurnost da je bolesnik cijelo vrijeme bio u terapijskoj širini, dok se kod terapije DOAK-ima mora biti siguran da ih je bolesnik redovito i konstantno uzimao u adekvatnoj dozi. U protivnom, unatoč antikoagulantnoj terapiji, može se odlučiti za TEE prije pokušaja konverzije.(1)

### 1.3.2a ELEKTROKARDIOVERZIJA

Kardioverzija istosmjernom strujom često je korištena metoda s visokim stupnjem efikasnosti i niskim stupnjem komplikacija kad je provodi iskusni kliničar. Uspješnost konverzije veća je od 90%, no što atrijska fibrilacija traje duže, to je i uspješnost konverzije manja. Bez antiaritmjskih lijekova stopa povratka aritmije nakon uspješne konverzije je velika, stoga je antiaritmjska terapija indicirana periproceduralno.

Kod hemodinamski nestabilnog bolesnika indicirano je učiniti hitnu sinkronu kardioverziju radi trenutačnoga povratka sinusnoga ritma. (34) Kod stabilnoga pacijenta može se odlučiti za farmakološku konverziju ili u konačnici elektrokardioverziju, koja je brža i efikasnija, no zahtijeva sedaciju bolesnika, za razliku od farmakološke konverzije.

### 1.3.2b FARMAKOLOŠKA KONVERZIJA

Antifibrilatornih lijekova je mnogo, a razlike u učinkovitosti u specifičnim indikacijama su znatne. Prema široko prihvaćenom Vaughan-Williamsovu sustavu antiaritmici se dijele na četiri skupine i tri podskupine:

1. skupina - podskupina I.a: kinidin, amajlin, prokainamid (većinom opsoletni lijekovi); podskupina I.b ( lidokain, mekisetin, tokainid); podskupina I.c (propafenon, flekainid) – antiaritmici ove skupine dominantno djeluju na ionske kanale Na<sup>+</sup>.
2. skupina - betablokatori (sotalol, atenolol, bisporolol, metoprolol)
3. skupina - blokatori kalijevih kanala (amiodaron, dronedaron, dofetilid, ibutilid, vernakalant, sotalol)
4. skupina- blokatori kalcijevih kanala (verapamil, diltiazem).

Osim navedenoga za liječenje aritmija koriste se i srčani glikozidi, kao što je digoksin i metildigoksin te adenozin.

Antifibrilatorni učinak za konverziju i održavanje sinusnog ritma imaju samo antiaritmiци I.a, I.c i III. skupine, dok se beta blokatori, nedihidropiridinski blokatori kalcijских kanala nekad uz digoksin koriste za regulaciju frekvencije ventrikula. (35)

Kada se antiaritmiци apliciraju u pravo vrijeme i u pravoj dozi, povećavaju izgledе za konverziju u sinusni ritam za 90%. Koji će se antiaritmik koristiti, prvenstveno ovisi o profilu pacijenta, njegovim komorbiditetima te sigurnosnom profilu antiaritmika. (13) Tako se zna da je propafenon uglavnom lijek izbora kod strukturno zdravoga srca, dok će se kod strukturno oštećenog srca koristiti amiodaron. Osim navedenih lijekova, odnedavno je za upotrebu u Republici Hrvatskoj, za konverziju u sinusni ritam, registriran i flekainid, no trenutačno samo u peroralnoj varijanti, a postoji i vernakalant, no on još uvijek nije registriran za upotrebu u Republici Hrvatskoj.

Neovisno o tomu koja se metoda koristi za konverziju u sinusni ritam, nakon konverzije svi pacijenti trebaju imati kratkotrajnu (četiri tjedna) oralnu antikoagulantnu terapiju (oni koji imaju CHA2DS2-VASc 0 ili 1- samo ukoliko je atrijska fibrilacija trajala >24h), dok oni koji imaju CHA2DS2-VASc  $\geq 1$  ili  $\geq 2$  moraju biti na trajnoj oralnoj antikoagulantnoj terapiji.

### 1.3.2c KATETERSKA ABLACIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE

Kateterska ablacija invazivno je, nekirurško liječenje aritmije koje se koristi u liječenju kako supraventrikularnih tako i ventrikularnih aritmija. Poseban oblik kateterske ablacije izolacija je plućnih vena. Cilj ove metode jest primjenom različitih izvora energije prekinuti širenje električnih impulsa iz navedenog područja na ostatak pretklijetki. U početku glavni način ablacije bila je primjena radiofrekventne energije fokalnim kateterom koji zagrijava tkivo i uzrokuje lokalnu ozljedu. Kasnije su se razvili posebni „kružni“ radiofrekventni kateteri radi brže i jednostavnije izolacije. Također, razvijeni su fokalni krio-kateteri koji se hlade tekućim dušikom i stvaraju lezije hlađenjem tkiva. Kateterska ablacija indicirana je u paroksizmalnoj atrijskoj fibrilaciji te perzistentnoj atrijskoj fibrilaciji s malim rizikom povratka aritmije, s ciljem poboljšanja simptoma i kvalitete života kod bolesnika koji ne toleriraju antiaritmike. Također ablacija je indicirana i kod bolesnika s razvijenim srčanim popuštanjem, pogotovo kada je posrijedi tahikardijom inducirana kardiomiopatija, jer kod njih kateterska ablacija smanjuje ukupnu smrtnost te hospitalizacije zbog akutizacije srčanog popuštanja.(1,36)

### 1.3.3. KARDIOVASKULARNI RIZIČNI ČIMBENICI I KOMORBIDITETI: DETEKCIJA I LIJEČENJE

Kao zadnji dio trijade u liječenju bolesnika s atrijskom fibrilacijom nalaze se brojni komorbiditeti i kardiovaskularni rizični čimbenici. Njihova je detekcija ključna, a potom i njihovo liječenje, kako bi se smanjio morbiditet i mortalitet AF-a.

Nužno je modificirati kardiovaskularne rizične čimbenike kao što su pretilost, tjelesna aktivnost, pušenje, konzumacija kave i alkohola, arterijska hipertenzija, šećerna bolest, koronarna bolest, apneja u spavanju i srčano zatajivanje. Liječenjem navedenih komorbiditeta, a modifikacijom rizika, značajno se pozitivno mijenja tijek i prognoza aritmije.

#### 1.4. ULOGA EHOKARDIOGRAFIJE U ATRIJSKOJ FIBRILACIJI

Uloga ehokardiografije kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom može se podijeliti u nekoliko kategorija:

1. analiza srčanih šupljina i njihove funkcije, analiza perikarda i valvula. Takva analiza može biti korisna za detekciju komorbiditeta uz atrijsku fibrilaciju kao i stupnja povratka aritmije nakon konverzije u sinusni ritam
2. identifikacija bolesnika s povećanim rizikom za razvoj tromboembolijskih komplikacija prije konverzije u sinusni ritam.

Ehokardiografija je dijagnostička metoda izbora za prikaz samog lijevoga atrija, njegove veličine, strukture i funkcije. Najčešća ehokardiografska mjera veličine atrija njegove su uzdužne dimenzije u dugoj parasternalnoj osi u M modu, no zasigurno zbog anatomije samoga atrija i njegove trodimenzionalne (3 D) strukture mjerenje volumena daje precizniju vrijednost. Dvodimenzionalna (2 D) mjerenja volumena lijevog atrija pokazuju nešto niže vrijednosti kada se uspoređuju s mjerenjima učinjenim magnetskom rezonancom (MR) ili kompjutoriziranom tomografijom (CT), dok su 3D mjerenja volumena lijevog atrija znatno superiornija te su zapravo vrlo slična u usporedbi s onim vrijednostima izmjerenim CT-om ili MR-om. Granična vrijednost za uvećanje lijevog atrija jest volumen od 34 ml/m<sup>2</sup>. Iako su doplerski zapisi i parametri najstarija i najčešća korištena metoda za evaluaciju morfologije i funkcije atrija, novije ehokardiografske tehnologije kao npr. tzv. „strain“ i „strain rate“ pokazale su superiornost u otkrivanju atrijske kardiomiopatije i fibroze. Osim ehokardiografije, za detekciju atrijske kardiomiopatije i primarno fibroze, koriste se još i CT te MR uz gadolinij kao kontrastno sredstvo. Potonja metoda zlatni je standard za dijagnostiku fibroze ventrikula, no za fibrozu atrija još uvijek nije toliko česta zbog tehničkih izazova pretrage.

Gotovo svi bolesnici koji se prezentiraju s prvom epizodom atrijske fibrilacije imat će koristi od transtorakalne ehokardiografije s ciljem detekcije veličine lijevog atrija, sistoličke funkcije miokarda te morfologije i funkcije mitralne valvule. Manja skupina bolesnika dodatno će profitirati od transezofagealne ehokardiografije s ciljem isključenja postojanja tromba u aurikuli lijevog atrija prije pokušaja kardioverzije bilo medikamentozne konverzije u sinusni ritam, bilo elektrokardioverzije. Aurikula lijevog atrija opisuje se kao dugačka, uska, zavojita struktura koja ima nazubljeni lumen i usko ušće. Svojom anatomijom idealna je za stvaranje ugrušaka. Brojne studije i metaanalize potvrdile su korist od TEE-a za predikciju tromboembolizma.(37,38)

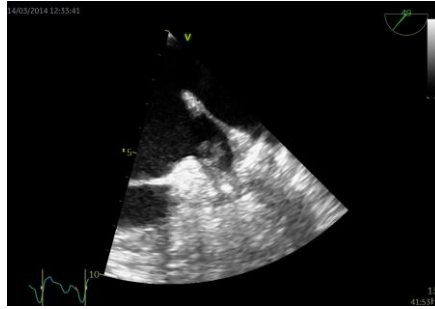
Stopa moždanog udara bila je tri puta veća kod TEE-om dokazanog spontanog eho kontrasta, reduciranih brzina u području aurikule lijevog atrija, postojanja tromba u aurikuli LA, te četiri puta veća kod detekcije kompleksnog plaka aorte.

Kako je TEE invazivna dijagnostička metoda, koristi se samo kod onih bolesnika kod kojih će se, ovisno o rezultatima pretrage, mijenjati strategija liječenja. Tako se dominantno koristi kad se želi bolje prikazati posteriorne strukture srca, ponajviše LA i aurikulu LA. U navedenim strukturama može se evidentirati nekoliko protrombotskih čimbenika kao što je spontani eho kontrast, tromb u aurikuli ili pak spore brzine pražnjenja aurikule.

Spontani eho kontrast karakterizira postojanje dinamičkog, eho odjeka, sličnog dimu, koji se vidi u lijevom atriju i/ili aurikuli za vrijeme TEE-a. Smatra se da nastaje kao posljedica povećane agregacije eritrocita, koja pak nastaje kao rezultat poremećenih sila smicanja zbog promijenjene dinamike atrijskog protoka i nekontrolirane atrijske sistole.(39,40) Agregacija eritrocita uvjetovana je proteinima plazme, primarno fibrinogenom, koji mijenja elektrostatske sile na površini eritrocita i tako pogoduje njihovoj agregaciji.(41) SEK je snažan rizični čimbenik i može biti prvi stadij formiranja tromba i tromboembolijskih komplikacija.(42) Prisutan je kod više od 50% bolesnika s atrijskom fibrilacijom te kod 80% onih s trombom u lijevom atriju ili nedavnim tromboembolijskim događajem.(42) Povezan je s kliničkim rizičnim čimbenicima za tromboembolizam kao što su raniji tromboembolijski događaj, sistolička disfunkcija lijeve klijetke, hipertenzija kao i s CHA2DS2VASc-om.(43)

Mjerenje brzine protoka aurikule lijevoga atrija omogućuje bolju kvantifikaciju staze unutar navedenih struktura. Niske brzine protoka u aurikuli (manje od 20 cm/sekundi) povezane su s postojanjem tromba ili SEK-a. Rizik za moždani udar značajno raste kako brzine padaju (pogotovo ako su manje od 15 cm/sec). (44)

TEE detektira postojanje tromba kod 13% pacijenata s nevalvularnom atrijskom fibrilacijom koja traje više od tri dana.(40) Prevalencija se povećava kod pacijenata s teškom mitralnom stenozom, sistoličkom disfunkcijom lijeve klijetke, uvećanim lijevim atrijem, SEK-om, nedavnim tromboembolijskim događajem i CHA2DS2VASc-om.(45–47) Osjetljivost i specifičnost TEE za detekciju tromba u aurikuli lijevoga atrija iznosi 93-100%, dok mu je pozitivna i negativna prediktivna vrijednost 86 i 100%.(48) Ukoliko se TEE-om detektira postojanje tromba u aurikuli lijevoga atrija, konverzija je u sinusni ritam kontraindicirana. Prikaz tromba u aurikuli lijevog atrija vidi se na Slici 2.



Slika 2. Tromb u aurikuli lijevog atrija

## 1.5.PREVENCIJA EMBOLIZACIJE PRIJE I NAKON KONVERZIJE U SINUSNI RITAM KOD ATRIJSKE FIBRILACIJE

### 1.5.1. KONVERZIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE TRAJANJA >48H

Spontana je ili namjerna konverzija atrijske fibrilacije u sinusni ritam povezana s kratkotrajnim povećanjem bazalnog rizika za klinički tromboembolizam. Svi bolesnici s atrijskom fibrilacijom, bila ona paroksizmalna, perzistentna ili permanentna, imaju povećan rizik od embolizacije u odnosu na bolesnike bez AF-a. Mnogi embolijski događaji događaju se unutar deset dana od konverzije, kako kod terapije varfarinom, tako i kod terapije NOAK-ima. (49) Bolesnici kojima se radi konverzija nakon 48 sati trajanja aritmije predstavljaju posebno rizičnu skupinu bolesnika (u usporedbi s onima kod kojih je aritmija trajala kraće), s embolijskim rizikom do 1-5% u prvom mjesecu antikoagulacijske terapije.(50) Najčešći je uzrok moždanoga udara embolizacija iz tromba koji se nalazi u aurikuli lijevog atrija u prva dva tjedna nakon konverzije. Tromb može nastati neposredno nakon konverzije zbog kontraktilne disfunkcije atrija ili može biti prisutan i prije same konverzije. Pojavnost tromba u aurikuli lijevog atrija kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom i u studijama koje su koristile TEE bila je 12-14% kod bolesnika s aritmijom manjom od 72 h. Vrlo su slični rezultati i kod AF-a trajanja dužeg od dva dana.(51)

Prolazna atrijska kontraktilna disfunkcija nakon konverzije događa se nakon što se vratio sinusni ritam, bilo spontano, bilo elektrokonverzijom ili farmakološkom konverzijom. Smatra se da trajanje kontraktilne disfunkcije primarno ovisi o dužini trajanja aritmije. Postoje međutim i slučajevi kada se unatoč negativnom nalazu TEE-a za tromb embolizacija nakon konverzije dogodila zbog nastanka tromba neposredno nakon elektrokonverzije, no to je u malom postotku slučajeva.(52) U prvom mjesecu nakon konverzije ponovne su epizode aritmije česte, no one su primarno asimptomatske te se pojavljuju u otprilike 17% bolesnika.(53) Postoje situacije kada konverzija u sinusni ritam nastaje spontano. Prema dosadašnjim spoznajama u tim je situacijama rizik za tromboembolizam jednak kao i u slučajevima medikamentozne ili elektrokonverzije, također i kod bolesnika s malim ili minimalnim bodovnim rezultatom CHA2DS2-VASc. Prema jednoj studiji, čak 16% bolesnika koji su bili planirani za konverziju prije zahvata su doživjeli spontanu konverziju. Incidencija moždanog udara bila je jednaka kod obje skupine bolesnika.(54)



Bolesnici kod kojih atrijska fibrilacija traje >48h trebaju uzimati najmanje tri tjedna antikoagulantnu terapiju prije pokušaja konverzije. Rizik od tromboembolije može biti značajno smanjen na svega 1% antikoagulantnom terapijom u trajanju od tri, a prema nekim stručnjacima i četiri tjedna prije planirane konverzije, odnosno mjesec dana nakon konverzije.(50)

Ukoliko se želi skratiti vrijeme do konverzije, nužno je prije učiniti TEE te na taj način isključiti postojanje tromba u aurikuli lijevog atrija, a elektrokardioverziju provesti uz antikoagulantnu terapiju, koja se nastavlja i nakon konverzije. Kliničke studije pokazale su da se rizik za moždani udar značajno smanjuje uz terapiju, kako varfarinom, tako i NOAK-ima (55–57). Opservacijske studije pokazale su također da se nakon TEE-om potvrđenoga odsustva tromba u aurikuli lijevog atrija, uz antikoagulantnu terapiju periproceduralno, može sa sigurnošću učiniti konverzija u sinusni ritam.(58)

### 1.5.2. KONVERZIJA ATRIJSKE FIBRILACIJE TRAJANJA <48H

Navedena strategija konverzije primjenjuje se kod atrijske fibrilacije koja traje >48h, dok se pak kod aritmije koja traje kraće može odmah raditi konverzija u sinusni ritam. Kada se izuzmu bolesnici s visokim rizikom (reumatske valvularne greške, srčano zatajivanje, raniji moždani udar), rizik za tromboembolizam kod bolesnika s trajanjem aritmije <48 h izrazito je malen. No mora postojati sigurnost u vrijeme trajanja aritmije.(59) Iako je rizik malen, neki stručnjaci smatraju da je rizik za embolizaciju najmanji tek ako aritmija traje <24 sata.

Stoga se ponekad, uz procjenu ostalih rizičnih čimbenika, ipak odlučuju prvo za antikoagulantnu terapiju, a potom za konverziju (60) ili se pak, unatoč činjenici da aritmija traje manje od 48h, kod pacijenata povećanog tromboembolijskoga rizika, odlučuju za TEE prije same konverzije. Iako nema kliničkih ispitivanja o antikoagulantnoj terapiji kod pacijenata s AF< 48 h, neke opservacijske studije ukazuju da rizik od tromboembolije kod tih bolesnika bez antikoagulantne terapije iznosi 0,7%. Riječ je o pacijentima s dominantnim rizičnim čimbenicima: dob >60 g, ženski spol, srčano zatajivanje te šećerna bolest. Kod onih bolesnika koji nemaju navedene rizične čimbenike rizik od moždanog udara bio je svega 0,2%.(61) S obzirom na sve navedeno, nema jasnih preporuka, no neki autori smjernica ipak savjetuju četiri tjedna antikoagulantne terapije nakon konverzije, čak i kod bolesnika s niskim bodovnim rezultatom CHA2DS2-VASc.

### 1.6.TROMBOGENEZA

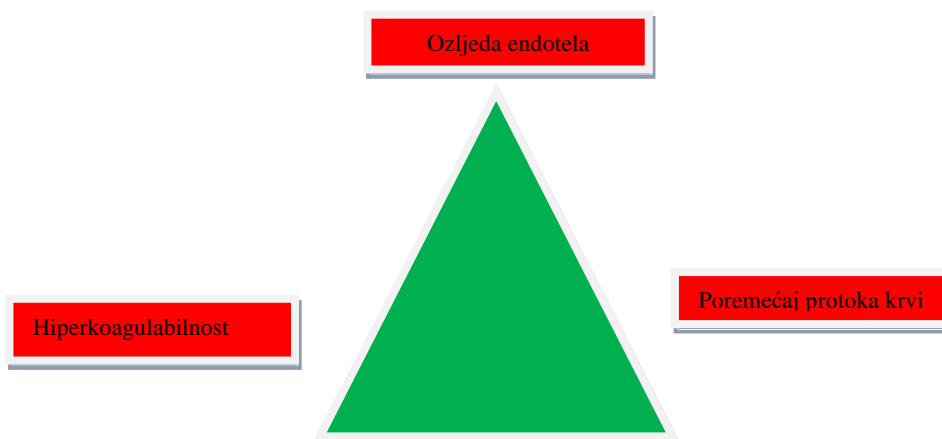
Više od 150 godina poznata je Virchowljeva trijada trombogeneze koja se sastoji od triju komponenata, početna može biti bilo koja, ali kada se prva dogodi, gotovo će nužno odrediti nastanak drugih dviju kao odgovor na početni događaj. Promjena ili neravnoteža bilo koje komponente trijade dovodi bolesnika u stanje predispozicije za trombozu ili protrombotično stanje. Važno je pojasniti da je mehanizam koji stvara ugrušak i mehanizam koji stvara tromb isti. Razlika je u tome što je ugrušak homeostatski mehanizam koji sprječava krvarenje, nastaje bez začepljenja žile i s vremenom se zamjenjuje vezivnim tkivom, odnosno djeluje kao privremeni flaster u slučaju oštećenja endotela.

S druge strane, tromb nema funkcionalnost u vrijeme i na mjestu nastanka te patološki ometa protok krvi zahvaćene žile uzrokujući ishemiju tkiva. Hemodinamski čimbenici odgovorni su za određivanje karakteristika tromba, ovisno o njihovu položaju ili mehanizmima koji ih proizvode. Kada je riječ o arterijama, u njima trombi nastanu uglavnom zbog ateromatoznih plakova ili područja krvotoka koji mogu uzrokovati oštećenje endotela, to je prvenstveno zbog toga što je brzina protoka krvi u njima veća u odnosu na venski bazen. Stoga je tromb u arterijama dominantno građen od trombocita, koji pokušavaju popraviti oštećenje endotela te ima bjelkasti izgled. S druge strane tromb u venskom sustavu nastaje primarno zbog usporenja brzine protoka krvi, što dovodi do agregacije trombocita i promjene u antikoagulacijskoj kaskadi, te se sastoji dominantno od fibrina i eritrocita, koji mu daju crvenkastu boju.(62)

Komponente trijade su:

1. ozljeda endotela;
2. poremećaj protoka krvi (usporena ili turbulentna cirkulacija);
3. hiperkoagulabilnost.

Slikovni prikaz Virchowljeve trijade na Slici 3.



Slika 3. Virchowljeva trijada trombogeneze

Ozljeda endotela jedan je od najutjecajnijih čimbenika u stvaranju tromba u krvotoku. Razni čimbenici mogu dovesti do toga: hipertenzija, turbulencija krvi, bakterijski toksini, dislipidemija, izloženost zračenju, trudnoća, ženski spolni hormoni itd. Kada dođe do oštećenja endotela, dolazi do prolazne vazokonstrikcije koja smanjuje brzinu normalne cirkulacije krvi, ustupajući mjesto drugoj komponenti trijade. Dodatno, dolazi do agregacije trombocita kako bi se popravilo nastalo oštećenje, oslobađaju se tkivni faktori koji dodatno podržavaju protrombotsko stanje. Znači, druga komponentna trijade - poremećaj protoka krvi - može biti primarni uzrok tromboze ili može biti sekundarna kao odgovor na oštećenje endotela, odnosno prvu fazu trijade. Normalni protok krvi laminaran je, na taj način krvne stanice prolaze kroz središte lumena i ne dodiruju endotel, od kojega su odvojeni slojem plazme.

Kada dođe do poremećaja toka krvi, dolazi i do promjene u agregaciji krvnih stanica kao i do promjene aktivacije pojedinih čimbenika zgrušavanja. Različita stanja mogu mijenjati protok krvi i dovoditi do turbulentnog protoka koji je prokoagulantan. Hiperkoagulabilno stanje, najjednostavnije rečeno, promjena je viskoznosti krvi, koja može biti primarna ili sekundarna. Primarne se dominantno odnose na genetske, tj. nasljedne, tu se primarno misli na trombofilije, a sekundarne su one stečene.(62,63)

Sve navedeno prisutno je kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom. Dilatirani lijevi atrij te usporeni protok u području aurikule lijevog atrija nezavisni su rizični čimbenici za tromboembolizam. Kod bolesnika s tim poremećajima vjerojatnije će se razviti staza krvi što će se ehokardiografski prezentirati kao SEK, a sve navedeno potencira tromboembolizam. Međutim, navedene promjene događaju se nakon dužega vremena, a zna se da aritmija, koja traje svega nekoliko sati, stvara prokoagulantni milje. Jedna studija naglasila je važnost trajanja aritmije u trombogenezi te je pokazala kako kod atrijske fibrilacije koja traje duže od 12 sati dolazi do povećanja razine beta-tromboglobulina i trombocitnog faktora 4 te također koncentracije fibrinogena.(64)

Stoga, osim navedenih mehaničkih promjena, tu se prvenstveno misli na turbulentni protok krvi, sama atrijska fibrilacija ima niz drugih prokoagulantnih čimbenika, na biokemijskoj razini, koji također stvaraju milje pogodan za razvoj tromboze te su svi navedeni čimbenici u međusobnoj zavisnosti. Za potonje, dovoljno je svega nekoliko sati za nastanak, a promjene na razini veličine lijevoga atrija nastaju kod dugotrajnijeg trajanja aritmije, jer se zna da se atrijska fibrilacija nikada ne pojavljuje sama, već uz nju dolaze brojna stanja i bolesti te brojni kardiovaskularni i cerebrovaskularni rizični čimbenici. Jedan od njih je i srčano zatajivanje. Poznato je da za svakih pet stupnjeva pada sistoličke funkcije lijeve klijetke raste rizik za moždani udar za 18%.(65) Incidencija moždanoga udara kod bolesnika s umjerenom do teško reduciranom sistoličkom funkcijom lijeve klijetke iznosi 9,3% u godinu dana, dok je kod onih s normalnom ili blago reduciranom sistoličkom funkcijom 4,4% na godinu dana. Osim staze krvi koja se razvija unutar nefunkcionalnog ili slabo funkcionalnog ventrikula, kod srčanoga zatajivanja postoji niz koagulacijskih promjena, oštećenja endotela te razvoja protrombotskog i hiperkoagulabilnog stanja. Na primjer, koncentracija fibrinogena u plazmi, kao i von Willebrandov faktor (vWF) povišeni su kod bolesnika sa srčanim zatajivanjem.(66,67) Arterijska hipertenzija dva puta povećava rizik od moždanog udara. Sam mehanizam još uvijek nije sasvim jasan, te se smatra da zbog poremećaja u koagulacijskoj kaskadi i endotelnoj funkciji dolazi do hiperkoagulabilnog stanja.(68) Valvularne pak bolesti, pogotovo mitralna stenoza, povećavaju rizik za moždani udar 17 puta.(69) Postoje dokazi da zapravo teška mitralna regurgitacija može biti protektivni čimbenik u razvoju tromba u lijevom atriju ili aurikuli lijevoga atrija.(70) Unatoč dobro poznatom protrombotskom stanju kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom, još uvijek je nejasno je li razlog tome u samoj atrijskoj fibrilaciji ili u postojećim komorbiditetima.

Studija koja je proučavala „sam“ AF, aritmiju bez komorbiditeta, dokazala je povećanu koncentraciju trombotskog faktora 4,  $\beta$  tromboglobulina, fibrinogena, D-dimera, vWf-a, i inhibitora aktivatora plazminogena.(71) Nasuprot tomu, Framingamska studija dokazala je da su povećane koncentracije fibrinogena i drugih spomenutih biomarkera posljedica drugih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika.(72)

Studije s TEE registriraju da bolesnici s trombom, u odnosu na one bez tromba, imaju veću pojavnost SEK-a, smanjenje brzine protoka u aurikuli lijevog atrija, povećane koncentracije u plazmi markera aktivacije trombocita (beta-tromboglobulin i trombocitni faktor 4), te dokaze o endotelnom oštećenju i/ili disfunkciji (povećane koncentracije u plazmi i endotelu vWF-a).(70)

Poremećaj viskoznosti krvi tzv. hiperkoagulabilnost, povezan je ili s aktivacijom koagulacijske kaskade ili povećane aktivacije trombocita ili poremećene fibrinolize. Mnogi dijelovi koagulacijske kaskade su uključeni u protrombotsko stanje: trombin, vWF i fibrinogen. Bolesnici sa kroničnom AF imaju povećane koncentracije koagulacijskih faktora (faktor VIII, vWF i fibrinogen), povećanu aktivaciju trombocita (trombocitni faktor 4 i  $\beta$  tromboglobulin) te sekundarnu fibrinolizu (D dimeri i spontana amidolitička aktivnost).(73,74) Terapija varfarinom dokazano normalizira razinu D-dimera, međutim navedena terapija nema isti efekt na koncentraciju fibrinogena i vWf, što sugerira kako oba ta biomarkera mogu biti indikatori hiperkoagulabilnosti i kod antikoaguliranih bolesnika.(73)

Dokazi upućuju na to da postoji razlika u protrombotskom stanju između aurikule lijevog atrija i periferne krvi. Stoga evaluacija biomarkera tromboze u lijevom atriju može biti osjetljivija od analize biomarkera tromboze u perifernoj krvi u detekciji hiperkoagulabilnog stanja.(75) Protrombotski milje koji dovodi do profibroznog i proinflatarnog odgovora vodi do atrijskog remodeliranja kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom, no bazični mehanizam još je uvijek slabo poznat. Dodatno, još uvijek nije jasno je li atrijska fibroza uzrok ili posljedica AF-a. Atrijska fibroza usko je vezana za matriks metaloproteinaze (MMP) te je stroga regulacija tog sustava ključna za održavanje hemostaze, a poremećaji tog fiziološkog procesa dovode do abnormalnog stvaranja tromba.(76) Dodatno, endotelijalna disfunkcija i redukcija u ekspresiji sintetaze dušičnog oksida na endotelu te posljedičnim padom njegove razine dovodi do pojačane ekspresije inhibitora aktivatora plazminogena unutar lijevog atrija i na taj način potiče stvaranje tromba.(77) Neki podaci govore da upala ima važnu ulogu u trombogenezi.(78) CRP i IL6 kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom neovisno su povezani s čimbenicima trombogeneze (CRP s fibrinogenom, a IL 6 s tkivnim čimbenikom).(79) Iako se za neke biomarkere zna da mogu biti prediktori moždanoga udara ili embolizacije kao npr. D dimeri i von Willebrandov faktor te kako postoje bodovne tablice za procjenu kako tromboembolijskoga tako i krvarećega rizika na bazi biomarkera, one zbog niza preklapajućih čimbenika u kliničkoj praksi nisu zaživjele.(80)

## 1.7.FIBRINOGEN: GRAĐA I ULOGA U HEMOSTAZI

### 1.7.1. ULOGA I GRAĐA FIBRINOGENA

Fibrinogen igra ključnu ulogu u normalnoj hemostazi. On je prekursor fibrina koji se veže na trombocite te stvara ugrušak. Vrlo je važna ravnoteža između stvaranja ugruška i fibrinolize te o njoj ovisi klinička slika koja se manifestira ili kao krvarenje ili kao tromboza ili oboje. Po kemijskom sastavu je bjelančevina, nalazi se u krvi, točnije u krvnoj plazmi te je jedan od specifičnih proteina u njezinu sastavu. Fibrinogen (faktor I) glikoproteinski je kompleks koji cirkulira u krvi te sudjeluje u procesu konverzije u fibrin pomoću trombina te u konačnici stvara krvi ugrušak. Fibrinski ugrušci dominantno nastaju kako bi okludirali krvnu žilu i zaustavili krvarenje. Također svojim brojnim djelovanjima na endotel, fibroblaste i angiogenezu sudjeluje u revaskularizaciji i cijeljenju rana. Fibrinogen se proizvodi isključivo u jetri. Cirkulira u plazmi u koncentraciji od 200 do 400 mg/dl, kao koagulacijski faktor s najvećom koncentracijom u plazmi. Koncentracija fibrinogena u plazmi povećava se s dobi, pušenjem, debljinom te upalnim stanjima, dok konzumacija alkohola, tjelesna aktivnost, te prehrana bogata ribom, smanjuje njegovu koncentraciju.(60) Fibrinogen je i protein akutne faze upale, a njegova sinteza potaknuta je IL6.

Fibrinogen je po sastavu glikoprotein od dvije simetrične polovice. Svaka polovica glikoproteina sastoji se od triju polipeptidnih lanaca (A-alfa  $\alpha$ , B-beta  $\beta$  i G- gamma  $\gamma$ ) koji su kodirani trima različitim genima na četvrtom kromosomu (genima za alfa lanac fibrinogena – FGA, genima za beta lanac fibrinogena - FBG i genima za gamma lanac fibrinogena- FGG).(81) Amino NH<sub>2</sub>- kraj ili N terminali svih šest lanaca povezani su u centralnu domenu, tzv. E domenu disulfidnim vezama. E domena sastoji se od fibrinopeptida A (FPA) i fibrinopeptida B (FPB) koji se u interakciji s trombinom cijepaju. Karbohidratne grupe nalaze se na svakoj strani  $\gamma$  i  $\beta$  lanca. Sva tri polipeptidna lanca sintetiziraju se u hepatocitima te se zreli protein formira u jetri. Neposredno prije sekrecije u plazmu  $\beta$  i  $\gamma$  lancima dodaju se karbohidratni lanci, a upravo polimorfizam gena za  $\beta$  lanac povezan je s povećanom koncentracijom fibrinogena u plazmi.(70) Konverzija fibrinogena u fibrin potpomognuta trombinom rezultira oslobađanjem FPA-a i FPB-a. Bazična molekula koja nastaje tom reakcijom jest fibrinski monomer koja je osnova za fibrinsku polimerizaciju i nastanak ugruška. Svaki strukturni defekt na N-terminalnoj regiji  $\alpha$  i  $\beta$  lanca može značajno onemogućiti vezanje trombina, oslobađanje FPA-a i FPB-a i u konačnici stvaranje samog fibrina. Najveći dio abnormalnog fibrinogena ima mutacije baš na toj regiji.(82) U normalnoj hemostazi otpuštanje negativno nabijenih FPA-a i FPB-a rezultira spontanom polimerizacijom fibrinskog monomera kako bi se formirao fibrinski ugrušak. Polimerizacijska mjesta locirana su na N-terminalnom dijelu  $\alpha$  i  $\beta$  lanca (E domena) i na C-terminalnom dijelu  $\gamma$  lanca (D domena). Mutacije za ta vezna mjesta mogu odgoditi polimerizaciju fibrina i na taj način remetiti normalnu hemostazu.(83) Nakon polimerizacije dolazi do umreženja polimera fibrina, što je posredovano koagulacijskim faktorom XIII, a isti je također aktiviran trombinom.

Sve dovodi do kovalentnih veza između D domena koje uključuju  $\gamma$ - $\gamma$ , kao i  $\alpha$ - $\alpha$  i  $\alpha$ - $\gamma$  interakciju te u konačnici stabilizaciju ugruška koji postaje rezistentan na pucanje. Prema modelima in vitro, pretjerano umrežavanje fibrina može dovesti do tromboembolije.(84)

### 1.7.2. POREMEĆAJI FIBRINOGENA

Poremećaji fibrinogena mogu biti nasljedni ili stečeni te se mogu odnositi na količinu fibrinogena, tzv. kvantitativni poremećaji, ili na njegovu funkciju, tzv. kvalitativni poremećaji. Kvantitativni poremećaji dijele se na afibrinogemiju, hipofibrinogemiju te hiperfibrinogemiju, dok su kvalitativni poremećaji disfibrinogemija, hipodisfibrinogemija i krio-fibrinogemija. Na abnormalnost fibrinogena može se posumnjati ako postoji produljenje protrombinskog vremena (PV), aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) i/ili trombinskog vremena (TV). Krvarenje kod bolesnika s poremećajem fibrinogena može biti blago do teško, sa značajno većim rizikom za krvarenje kod afibrinogemije ili izrazito niskim vrijednostima fibrinogena (< 100 mg/dl). Paradoksalno, neki poremećaji fibrinogena dovode do tromboza, unatoč glavnoj ulozi fibrinogena u stvaranju ugrušaka, pa bi bilo logično da će određene promjene funkcije fibrinogena, ako postoje, uzrokovati krvareće komplikacije, a ne tromboze. Abnormalnosti fibrinogena, kao npr. kongenitalna afibrinogemija, u vrlo malom postotku dovode do tromboze, < od 1%, i zbog toga analiza fibrinogena nije rutinski dio dijagnostičkog protokola za trombofiliju. Mehanizam kojim manjak fibrinogena ili njegova niža koncentracija dovodi do tromboze još uvijek nije jasan.(85) Za razliku od hipo- i afibrinogenemije, hiperfibrinogenemija povezana je s raznim upalnim stanjima i kardiovaskularnim oboljenjima. Povećane koncentracije fibrinogena u plazmi neovisan su prediktor kardiovaskularnih događaja. Kod bolesnika s moždanim udarom povećane razine fibrinogena povezane su s lošijim ishodom i povećanom smrtnošću te je ta veza neovisna o dobi, težini moždanoga udara i ostalim upalnim varijablama kod takvih bolesnika(86). Rezultati nekih studija također pokazuju da hiperfibrinogenemija u ishemijskom moždanom udaru perzistira i godinu dana nakon događaja. Smatra se da je poticaj za sintezu fibrinogena aktivan mjesecima nakon događaja te s obzirom na to da je koncentracija fibrinogena određena genomskim sekvencama, navedeno može biti posljedica genetskih mutacija.(87,88) Povećane koncentracije fibrinogena također su povezane s većom smrtnosti kod koronarne bolesti, šećerne bolesti ili renalne insuficijencije.(89–91) Sve navedene opservacije sugeriraju kako je koncentracija fibrinogena u plazmi specifičan marker mortaliteta. Razine fibrinogena mogu biti modificirane stilom života (prestanak pušenja, redovita tjelovježba, prehrana) te lijekovima kao npr. fibratima.

### 1.8. GENETIKA FIBRINOGENA I POLIMORFIZMI

#### 1.8.1. LJUDSKI GENOM

Ljudski genom potpuni je skup svih genskih informacija u ljudskoj vrsti. Sadržan je u sekvencijama deoksiribonukleinske kiseline (DNK) unutar 23 kromosomska

para u staničnoj jezgri i u maloj molekuli DNK koja se nalazi unutar mitohondrija. Ljudski genom obuhvaća i gene DNK koje kodiraju proteine i nekodirajuću DNK. Otprilike 1,5% naše DNK je protein kodirajuća sekvenca, dok ostatak predstavlja nekodirajuća DNK, koja također ima brojne funkcije, dominantno u genskoj ekspresiji. Početak mapiranja ljudskog genoma seže u 1986. godinu otkrićem za Huntingtonovu bolest, a projekt humanog genoma započet je 1990. godine. Ljudski DNK polimorfan je i razlikuje se između pojedinaca, a različite sekvence zovemo aleli. Haplotip je zapravo haploidni genotip, tj. skup specifičnih alela (pojedinačnih DNK sekvenci) u skupini usko povezanih gena na istom kromosomu, koji se nasljeđuju zajedno. Svaki gen može imati različite alele. Ponekad zbog različitih DNK sekvenci (alela) mogu nastati različite osobine, kao što je boja. Nekada će, opet, različite DNK sekvence dati isti rezultat u pojavljivanju (jednog) gena. Homozigot je genotip koji na oba homologna kromosoma ima dva istovjetna genska alela, tj. istovjetne varijante nukleotidne sekvence. To se javlja kada genski lokus za proizvodnju specifičnoga proteina zauzimaju istovjetne sekvence genetičke informacije na oba homologa. Uobičajeno je da se homozigotnost genotipa predstavlja transkripcijskim parom velikih i malih slova (npr. A i a): sukladno tome homozigot ima dva genotipa: AA i aa. Fenotip homozigota redovito odaje punu ili djelomičnu ekspresiju pripadajućega alelogena. Ako su kopije alela različite, govori se o heterozigotu. Populacija ili vrsta organizama obično uključuje više alela na svakom lokusu među različitim pojedincima. Alelska varijacija na lokusu može se izmjeriti po broju prisutnih alela (polimorfizam) ili razmjeru heterozigota (heterozigotivnost) u populaciji. Primjer je lokus gena za proteine krvnih grupa ABO sustava kod ljudi. Klasična genetika razlikuje tri alela (A, B i 0) koji se ispoljavaju u šest genotipova i četiri fenotipa: A homozigot AA i heterozigot A0, B homozigot BB i heterozigot B0, te AB heterozigot i 00 homozigot. U većini slučajeva genotipske interakcije dvaju alela na lokusu mogu se opisati kao dominantne ili recesivne, prema tome kojem od dvaju homozigotnih genotipova najviše slični homozigotni fenotip. Tamo gdje se homozigotni ne može razlikovati od heterozigotnog, za dani alel kaže se da je dominantan u odnosu na drugi alel, za koji se kaže da je recesivan u odnosu na prvi. Divlji tip alela termin je kojim se označava najvjerojatnija ishodišna DNK sekvenca i odgovarajuća fenotipska osobina iz „divljih“ populacija organizama. Kroz povijest se takav „divlji“ alel gledao kao dominantan, čest i „normalan“, suprotno od „mutirajućih“ alela koji su smatrani recesivnim, rijetkima i često štetnima. Danas se zna da mutiranjem divljeg tipa mogu nastati i dominantni aleli i da je većina lokusa visoko polimorfna, a učestalost njihovih alela varira od populacije do populacije te da je velik dio genetičkih varijacija skriven u obliku alela koji ne proizvode očite fenotipske razlike. Učestalost alela u populaciji može se koristiti za predviđanje učestalosti odgovarajućih genotipova. Dosta genetičkih poremećaja posljedica je nasljeđivanja obaju recesivnih alela za osobinu koja ovisi o samo jednom genu. U takve se poremećaje ubrajaju albinizam, cistična fibroza, fenilketonurija itd. Neki drugi poremećaji, kao što je Huntingtonova bolest, redovito se javljaju kada pogođena osoba naslijedi samo jedan dominantan alel.(92,93)

Kada je riječ o autosomno recesivnom poremećaju, tj. bolesti, oba gena moraju biti mutirana te se poremećaj viđa kod jednog ili više srodnika u obitelji. Kod autosomno dominantnog nasljeđivanja jedan defektan, tj. mutiran gen, ako je dominantan, dostatan je da izazove fenotipski bolest, tj. poremećaj. Kod takvog nasljeđivanja pojedinci će u nekoliko naraštaja biti zahvaćeni bolešću i niti jedna generacija neće biti preskočena u nasljeđivanju. Muškarci i žene zahvaćeni su u jednakom postotku, a kod oboljelog roditelja u prosjeku 50% djece imat će mutirani gen.(94)

Pri nasljeđivanju bitna je i penetracija gena, točnije kojom učestalošću određeni genotip dovodi do manifesnoga fenotipa, točnije oboljenja. Tako se govori o kompletnoj ili nekompletnoj penetraciji genotipa te penetraciji ovisnoj o dobi osobe. Kod varijabilne ekspresije gena oboljeli pate od klinički različitih manifestacija bolesti te različitih težina iste bolesti.(95) Funkcijske posljedice mutacija imaju učinak na nekoliko nivoa: transkripciju, mRNA stabilnost i translaciju, stabilnost proteina i lokacija, funkcija proteina. Mutacije na promotorskim regijama gena dovode do smanjene transkripcije ili je potpuno zaustavljaju, dok pak neke druge remete proces translacije i potiču nestabilnost mRNA. U konačnici postoje takve mutacije koje remete stabilnost proteina ili pak one kod kojih postoji normalna razina proteina, no funkcija proteina promijenjena je mutacijom.

#### 1.8.2.POLIMORFIZMI

Pojavnost dviju ili više različitih morfi i oblika u populaciji neke vrste smatra se polimorfizmom. Tipovi polimorfizama su sljedeći: 1. RFLP („restriction fragment length polymorphism“) - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata; 2. VNTR („variable number of tandem repeats) – varijabilni broj tandemskih ponavljanja; 3. SSR („simple sequence repeats or STR – simple tandem repeat, i.e. microsatellites“) - mikrosateliti ili ponavljanje jednostavne sekvence; 4. SNP („single nucleotide polymorphism“) - jednonukleotidni polimorfizmi.

Primjer polimorfizma u prirodi su npr. jaguari koji imaju dvije osobine kada je posrijedi boja kože: oni s tamnim ili oni sa svijetlim točkama. Budući da je više od jedne mogućnosti te osobine, govori se o polimorfizmu. Primjer polimorfizma u prirodi prikazuje Slika 4.





Slika 4. Primjer polimorfizma u prirodi - svijetli i tamni morf jaguara

Polimorfizmi, kada govorimo o genomici, odnose se na prisutnost dviju ili više varijanti specifične DNK sekvence (tj. gena) koje se mogu pojaviti između različitih pojedinaca ili populacija. Najčešći tip polimorfizama je jednonukleotidni polimorfizam, tj. polimorfizam koji zahvaća varijante na samo jednom nukleotidu, no postoje i drugi polimorfizmi koji mogu zahvaćati puno duže ulomke DNK. Nukleotid je građevni dio DNK te zamjena jednog nukleotida nekim drugim stvara polimorfizam. Osim na kodirajućem dijelu DNK, SNP se može pojaviti i na nekodirajućoj DNK. Oko 90% genetskih varijacija u ljudskoj populaciji posljedica je SNP-a. Većina njih nisu funkcijske, no postoje neke opservacije gdje se SNP povezuje s razvojem bolesti, dominantno malignih oboljenja. Kako protein-kodirajući geni čine samo 1-2% ljudskog genoma, većina polimorfizma neće imati učinak na aktivnost gena. No ako se polimorfna varijanta dogodi u regulatornom dijelu genoma, to može imati značajnu ulogu u funkciji samih gena. Dok se polimorfizam pojavljuje kao normalna varijanta određenoga gena u populaciji, i to >1% cijele populacije, mutacija je specifična promjena gena koja dovodi do stvaranja gena različitog od tzv. divljeg tipa s posljedicama koje mogu biti fatalne i zahvaća <1% populacije. Primjer za mutaciju je npr. bolest srpastih stanica gdje je mutacija samo jednog nukleotida dovela do promjene aminokiseline i razvoja potpuno abnormalnog eritrocita.(96,97)

### 1.8.3. POLIMORFIZMI FIBRINOGENA

Transkripcijska regulacija biosinteze fibrinogena proučavana je u mnogim istraživanjima. Povećana koncentracija fibrinogena u plazmi rizični je čimbenik za koronarnu bolest, moždani udar i perifernu vaskularnu bolest.(98) Dosadašnje spoznaje pokazuju kako je otprilike 50% varijabilnosti u koncentraciji fibrinogena u plazmi uzrokovano genetskim čimbenicima.(99)

Svaki lanac fibrinogena, od triju koja čine konačni protein, kodiran je posebnim genima, a oni se nalaze na četvrtom kromosomu regije Q28 te čine otprilike 50 kilobaza DNK.

Studije su dokazale da unutar hepatocita postoji suvišak  $\alpha$  i  $\gamma$  lanaca te da je sinteza  $\beta$  lanca ograničavajući korak u sintezi i stvaranju zrelog proteina fibrinogena. Postoje dokazi da su genetske varijacije u genima koji kodiraju  $\beta$  lanac fibrinogena ključne za konačnu koncentraciju proteina u plazmi, no jasan mehanizam još uvijek nije sasvim poznat. Stoga su zapravo polimorfizmi u sekvencama za sintezu  $\beta$  lanca ključni u razumijevanju pojavnosti različite koncentracije fibrinogena u populaciji s različitim učincima na razvoj i tijek bolesti, primarno kardiovaskularnih oboljenja, pa tako i trombogenezе u bolesnika s atrijskom fibrilacijom.(100)

U procesu aktivacije sinteze fibrinogena vrlo je bitna citokinska stimulacija primarno proinflammatoryh citokina, kao što je IL-6. Sekvence gena koje su odgovorne za tu interakciju nalaze se primarno u promotorskoj regiji gena za sva tri lanca fibrinogena, a dosadašnja istraživanja potvrđuju da polimorfizmi za  $\beta$  lanac fibrinogena značajno mijenjaju navedeni transkripcijski odgovor na stimulaciju IL-6.(101) Ova genetski određena senzitivnost fibrinogena na ekspresiju IL-6 može objasniti dosadašnja istraživanja koja su pokazala da SNP gena za fibrinogen utječe na povećanu koncentraciju plazmatskog fibrinogena u nekim podskupinama ispitanika, kao npr. kod pušača ili kod onih koji imaju povećani CRP, a kod svih njih bila je i povećana koncentracija IL-6 kao odgovor na upalu.(102)

Do sada je poznato više od deset polimorfizama, no njih pet lociranih u promotorskoj regiji  $\beta$  fibrinogen gena na poziciji -148, -249, -455, -854, i -993 od mjesta početka transkripcije gena, najviše su istraživani do sada. Eksperimentalne studije pokazale su kako učinak na povećanje bazalne frekvencije transkripcije proteina nastaje isključivo kod promjene nukleotida gvanina (G) u adenin (A) na poziciji -455 i na poziciji -854, dok ostale zamjene nukleotida na drugim pozicijama u promotorskoj regiji nisu pokazale takav učinak. Alel A -455, koji je prisutan u 20% populacije, povezan je s povećanjem koncentracije fibrinogena u plazmi za otprilike 0,30 g/L u usporedbi s homozigotom za alel G. Eksperimentalne studije dokazale su kako polimorfizmi na navedenim pozicijama značajno mijenjaju aktivnost promotorske regije i na taj način utječu na frekvenciju transkripcije jezgrinih proteina. Rijetki aleli -455A i -854A povezani s povećanom koncentracijom fibrinogena u plazmi pojavljuju se u frekvenciji od 21,4% i 18,6% u populaciji. Dodatno, ta dva polimorfizma (-854 G/A i -455G/A) u potpuno su negativnoj neravnoteži povezanosti gena, točnije rijetki alel -854A uvijek je prisutan s čestim alelom -455G i obrnuto.(103)

Osim izravnog učinka na koncentraciju fibrinogena koju imaju polimorfizmi, također su poznati neizravni učinci interakcijom s okolišnim čimbenicima. Tako je npr. dokazano da pojačana tjelesna aktivnosti dovodi do akutno povećane koncentracije fibrinogena, a učinak je dodatno intenziviran kod AA homozigota za G/A – 455 polimorfizam fibrinogena.(104) Također povećana incidencija infarkta miokarda kod bolesnika koji imaju infekciju želuca uzročnikom H. pylori, pojavljuje se češće kod nosilaca alela B2 za Bcl I polimorfizam fibrinogena.(98)

Poznato je da pušenje može biti povezano s povećanom koncentracijom fibrinogena, kao i spol, dob, indeks tjelesne mase te koncentracija lipoproteina u plazmi. (105) Dosadašnja istraživanja većinom su se bazirala na povećanoj koncentraciji fibrinogena u plazmi kao rizičnom čimbeniku za kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, dok je sam polimorfizam -455G/A mahom istraživani u ovisnosti o pojavnosti te prognozama ishemijskog moždanoga udara.

### 1.9. PREDIKTORI TROMBOZE LIJEVOG ATRIJA

Prediktori tromboze aurikule lijevog atrija mogu biti klinički, ehokardiografski i biokemijski. Koliko se o tome do sada zna, toliko je još i nepoznato, a tema je zasigurno intrigantna kako za klinička, tako i za bazična istraživanja na molekularnoj razini. Kod embolijskih moždanih udara 90% uzrokovano je ugruškom koji dolazi iz aurikule lijevog atrija.(106) Postojanje tromba u aurikuli lijevog atrija, SEK-a ili malih brzina pražnjenja poznati su ehokardiografski prediktori neželjenih tromboembolijskih događaja. Zbog svoje anatomije aurikula je idealno mjesto za nastanak tromboze, pogotovo jer se zna da postoji nekoliko njezinih anatomskih varijacija, a to su:

1. aurikula u obliku pilećeg krilca
2. aurikula u obliku cvjetače
3. aurikula u obliku kaktusa
4. aurikula u obliku vjetromotora.

(107)

Razna istraživanja povezivala su tip anatomije aurikule lijevog atrija s rizikom od tromboze pa su tako neka istraživanja pokazala kako aurikula u obliku pilećih krilca ima manju vjerojatnost za razvoj tromba u odnosu na ostale varijante (107), dok su pak neka istraživanja pokazala kako je aurikula u obliku cvjetače neovisni prediktor tromboze lijevog atrija, pogotovo kod bolesnika s niskim tromboembolijskim rizikom prema bodovnom sustavu CHA2DS2-VASc.(108) Dodatno, sama veličina lijevog atrija povezana je s rizikom od tromboze pa se tako zna da što je lijevi atrij veći, to je veći rizik za razvoj tromba u njegovoj aurikuli.(109) Brojne studije pokazale su pozitivnu prediktivnu vrijednost uvećanog lijevog atrija za pojavnost tromba u njegovoj aurikuli.(110–112) Navedeno također korelira s prirodnim tijekom bolesti koja je progresivna te ide od paroksizmalne do perzistentne i u konačnici trajne atrijske fibrilacije uz razvoj značajne fibroze atrija.(113)

Što se tiče ejijske frakcije lijeve klijetke, i ona se u nekim istraživanjima pokazala kao prediktor tromboze lijevog atrija,(114,115) a zna se da je, neovisno o postojanju atrijske fibrilacije, niska ejijska frakcija povezana s povećanom smrtnošću i pojavnošću moždanoga udara.(116,117)

Nedavno objavljen rad iz baze podataka pacijenata s atrijskom fibrilacijom dokazao je pozitivnu prediktivnu moć snižene ejijske frakcije za trombozu lijevog atrija, pogotovo kod bolesnika s niskim tromboembolijskim rizikom.(118) Osim poznatih ehokardiografskih prediktora tromboze lijevog atrija, provedena su i brojna istraživanja koja pokušavaju pronaći biokemijski marker pa je

poznato da, prema nekim istraživanjima, prediktor tromboze lijevog atrija može biti povećana koncentracija D-dimera,(119,120) a slično se pokazalo i za povećane vrijednosti CRP-a.(121) Do sada je zamijećeno da postoje razlike u biomarkerima fibrinolize kod bolesnika ovisno o tipu atrijske fibrilacije. Tako kod onih koji imaju permanentnu atrijsku fibrilaciju vrijednosti vWF-a, topljivog P selektina, kao i fibrinogena bile su značajno povišene, kod onih s paroksizmalnom atrijskom fibrilacijom bile su povišene i vrijednosti vWF-a i fibrinogena, no ne P selektina, a kod bolesnika s perzistentnom atrijskom fibrilacijom sve su vrijednosti navedenih biomarkera bile normalne.(122) Neka istraživanja povezala su povećanu koncentraciju fibrinogena s pojavnošću tromba u aurikuli lijevog atrija, pogotovo kod bolesnika s niskim tromboembolijskim rizikom.(109)

Jedini alat za procjenu tromboembolijskoga rizika trenutačno je bodovni sustav CHA2DS2-VASc. Međutim ostali potencijalno relevantni klinički čimbenici nisu do sada dovoljno istraženi. Tako je jedna poljska studija pokazala da se u čak 6% pacijenata koji su primili antikoagulantnu terapiju prije elektrokonverzije ili ablacije plućnih vena TEE-om detektirao tromb, a kao novi prediktori tromboembolizma, a koji nisu uključeni bodovni sustav u CHA2DS2-VASc, u njihovu su se istraživanju pokazali tip atrijske fibrilacije (perzistentna i permanentna u odnosu na paroksizmalnu) i renalna insuficijencija (GFR < 56 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>). (123) Dokazano je kako je prediktivna snaga modela bodovnog sustava CHA2DS2-VASc, kada mu se doda tip aritmije i bubrežna insuficijencija, veća u predikciji tromboze aurikule lijevog atrija. Također jedna studija s 223 ispitanika koji su doživjeli akutni ishemijski moždani udar, a bili su u sinusnom ritmu, pokazala je kako se u čak 6% bolesnika detektirao tromb u aurikuli lijevoga atrija na TEE-u, a svi ti pacijenti imali su paroksizmalnu atrijsku fibrilaciju u HOLTER EKG-u.(124)

## **2.HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Polimorfizam -455 G/A gena  $\beta$  fibrinogena učestaliji je u bolesnika s atrijskom fibrilacijom koji su razvili trombozu aurikule lijevoga atrija u odnosu na bolesnike koji je nisu razvili.

### **3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

OPĆI CILJ: Analizirati prevalenciju polimorfizma -455 G/A gena  $\beta$  fibrinogena u bolesnika s atrijskom fibrilacijom kod kojih je transezofagelnim ultrazvukom srca verificiran tromb u aurikuli lijevoga atrija te u bolesnika s atrijskom fibrilacijom koji nemaju verificiran tromb u aurikuli lijevoga atrija.

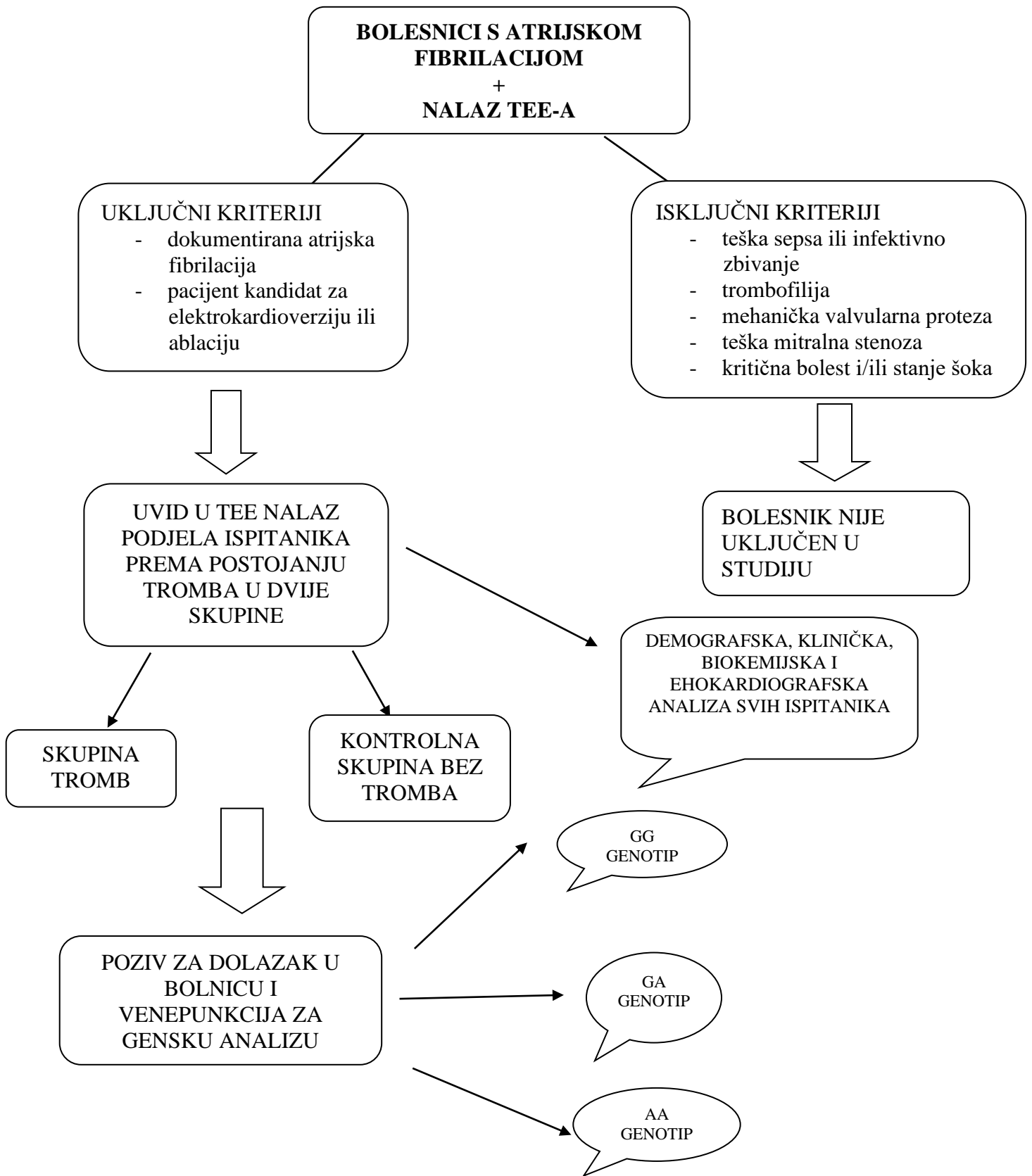
SPECIFIČNI CILJEVI: Analizirati povezanost između povišene koncentracije fibrinogena, polimorfizama gena za fibrinogen i pojavnosti tromba. Odgovoriti na pitanje je li povećana koncentracija fibrinogena rezultat genskog polimorfizma ili samog prokoagulantnog miljea uzrokovanog prisustvom tromba u cirkulaciji.

## 4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1. TIP ISTRAŽIVANJA I ISPITANICI

Dizajnirano je opservacijsko, analitičko, upareno istraživanje koje se provodilo na Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb kao nastavak već prije provedenog istraživanja pod nazivom „Tromboza lijevoga atrija u bolesnika s atrijskom fibrilacijom koji se podvrgavaju zahvatu elektrokardioverzije.“ Spomenuta studija analizirala je povezanost koncentracije fibrinogena i pojavnosti tromba u aurikuli lijevoga atrija u bolesnika s atrijskom fibrilacijom podvrgnutih elektrokardioverziji. Obuhvatila je ukupno 287 ispitanika te je dokazana pozitivna povezanost koncentracije fibrinogena u plazmi s pojavnošću tromba u lijevom atriju u bolesnika s atrijskom fibrilacijom. S obzirom na te rezultate formirano je i ovo istraživanje koje je proširilo istraživanje navedene populacije bolesnika. Ispitanici ovoga istraživanja bili su bolesnici s atrijskom fibrilacijom koji su podvrgnuti transezofagealnom ultrazvuku srca radi pokušaja konverzije u sinusni ritam te su liječeni u Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb od 2010. do 2017. godine. Baza podataka nastala je prikupljanjem podataka iz bolničkog informacijskog sustava za bolesnike koji su u navedenom razdoblju hospitalizirani i liječeni u ustanovi.

Baza se sastoji od općih i demografskih podataka, podataka vezanih za temu istraživanja: vrsta i trajanje fibrilacija atrija, ehokardiografski podaci, laboratorijske analize, terapija pacijenata te komorbiditeti. Iz navedenih podataka svakom je ispitaniku izračunat tromboembolijski rizik putem bodovnog sustava CHA2DS2VASc. Svim uključenim bolesnicima istraživanje je podrobno opisano te su potpisali Informirani pristanak za sudjelovanje u njemu, a odobrilo ga je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC-a Zagreb. Sva dokumentacija ispitanika ove studije, uključujući njihove potpisane Informirane pristanke, arhivirana je u arhivu Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb. Metodologija istraživanja prikazana je u slici 5.



Slika 5. Metodologija istraživanja



U istraživanje je uključen ukupno 181 ispitanik i oni su podijeljeni u dvije skupine: ispitivana skupina sa 60 bolesnika kojima je detektiran tromb u aurikuli lijevoga atrija te kontrolna skupina koja je ukupno sadržavala nešto više od dvostruko ispitanika od ispitivane skupine, njih 121. Uključeni kriteriji za sudjelovanje bili su bolesnici s atrijskom fibrilacijom kojima je rađen TEE s ciljem detekcije tromba u aurikuli lijevog atrija. Pacijenti koji su imali bilo kakvu mehaničku valvularnu protezu, aktivnu malignu bolest, trombofiliju ili hematološki poremećaj koji vodi do sklonosti zgrušavanju krvi, akutnu infekciju i/ili sepsu, te pacijenti koji su imali tešku mitralnu regurgitaciju ili stenozu nisu bili uključeni u istraživanje. Svi isključni kriteriji sami su po sebi protrombotski i mogli bi imati negativni učinak na rezultate istraživanja.

#### 4.2. ANALIZA KRVI I PRIKUPLJANJE PODATAKA

Svi ispitanici pozvani su na venepunkciju krvi (5 ml pune krvi) te se svima učinila genska analiza za polimorfizam -455 G/A gena za  $\beta$  lanac fibrinogena. Dodatno se zabilježila izmjerena koncentracija fibrinogena iz periferne krvi uzeta pri standardnoj laboratorijskoj analizi bolesnika hospitaliziranih za postupak elektrokardioverzije fibrilacije atrija. Prije venepunkcije svaki je ispitanik potpisao spomenuti Informirani pristanak.

##### 4.2.1. GENSKA ANALIZA

Svim ispitanicima za gensku je analizu uzeto 3-5 ml periferne krvi s antikoagulansom EDTA.

Laboratorijska analiza dijeli se na tri koraka:

1. IZOLACIJA DNK
2. AMPLIFIKACIJA I DIGESTIJA
3. ELEKTROFOREZA

Metoda izolacije DNK iz pune krvi uz pomoć komercijalnog seta za izolaciju DNK (Nucleospin Blood, Macherey Nagel, Duren, Njemačka) jednostavna je i brza metoda koja se temelji na upotrebi silikonskih membrana. U postupku izolacije koji traje približno 30 minuta koristi se 200  $\mu$ l krvi, a konačna količina izolirane DNK je 100  $\mu$ l (konc 50 $\mu$ g/ml).

Princip metode izolacije DNK sastoji se u tome da se tijekom inkubacije na 700°C uz pomoć enzima proteinaza K, te pufera za razgradnju, razara proteinska struktura staničnih membrana čime se omogućava izlazak DNK iz jezgre. Nakon toga se uzorak ispire apsolutnim alkoholom i nanosi na kolumnu sa silikonskom membranom na koju će se vezati DNK, dok će se alkohol i pufer za razgradnju istaložiti na dnu kolumne.

Potom se uzorak DNK ispire puferima za ispiranje i na kraju otapa pomoću pufera za otapanje (prethodno zagrijanim na 700 °C).

Amplifikacija i digestija umnoženog fragmenta promotora gena koji kodira  $\beta$  lanac fibrinogena provodi se uz pomoć komercijalnog kita AMPLI- $\beta$  FIBRINOGEN -455 G/A (Kit for the detection of -455G/A polymorphism of the  $\beta$  fibrinogen gene (dia-chem S.R.L, Napulj, Italija).

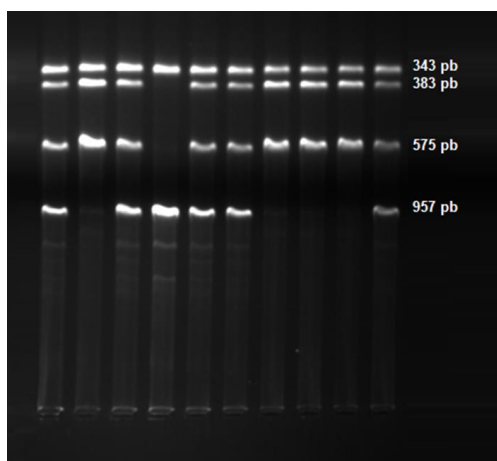
Umnažanje lančanom reakcijom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) provodi se pripremom mješavine PCR koja sadrži 20  $\mu$ l pufera PCR s početnicama, 28  $\mu$ l H<sub>2</sub>O i 2  $\mu$ l genomske DNK (100-150 ng).

Pripremljena mješavina PCR potom se stavlja u aparat za automatsko umnažanje DNK pod sljedećim uvjetima:

1. 95 °C 5 min
2. 35 ciklusa
  - 95 °C 1 min
  - 57 °C 1 min
  - 72 °C 2 min
3. 72 °C 10 min.

Određivanje polimorfizma -455G/A izvodi se umnažanjem odsječka DNK (1300 parova baza, pb) specifičnim početnicama te uz pomoć restrikcijskog enzima Hae III. Provjera umnoženog produkta PCR provodi se elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Dobiveni fragment DNK dugačak je 1300 pb. Nakon provjere produkt PCR digestira se uz pomoć enzima Hae III, i to pripremom sljedeće mješavine po jednom uzorku: 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pufera 10X, 0,5 $\mu$ L Hae III enzima i 10  $\mu$ l umnoženog produkta PCR na temperaturi od 37 °C 4 sata u vodenoj kupelji.

Elektroforeza digestiranog uzorka provodi se na 1,5% agaroznom gelu. Rezultati se očitavaju i dokumentiraju vizualizacijom na UV transiluminatoru. Očitava se rezultat koji je jedan od triju mogućih genotipova (GG, GA i AA genotip). Naime, svaki genotip ima odsječke DNK različitih dužina i broja. Prikaz jedne elektroforetske analize prikazan je na Slici 6.



GENOTIP		
GG	3 fragmenta	575 pb 383 pb 343 pb
GA	4 fragmenta	975 pb 575 pb 383 pb 343 pb
AA	2 fragmenta	975 pb 343 pb

Slika 6. Elektroforeza na agaroznom gelu, pb-parovi baza

Kada je riječ o polimorfizmima, analizom su se dobila tri genotipa -455G/A polimorfizma: genotip GG (divlji tip); genotip GA (heterozogot) i genotip AA (homozigot).

Budući da je genotip AA najrjeđi u populaciji, u ispitivanim skupinama oko 7%, što je jednako kao i u dosadašnjim istraživanjima ovoga polimorfizma (125–129) u konačnom prikazu rezultata tri genotipa podijeljena su u dvije skupine: genotip GG (divlji tip), te tzv. genotip A+ koji objedinjuje GA heterozigot + AA homozigot, koji čini ukupno nešto više od 50%, što je također već opisano u dosadašnjim istraživanjima.

Kao sekundarni cilj istraživanja povezana je povišena koncentracija fibrinogena s pojavnošću tromba i prevalencijom polimorfizama, te su bolesnici s trombom podijeljeni u dvije skupine ovisno o koncentraciji fibrinogena (granična vrijednost od 3,5 g/L) u onu s koncentracijom >3,5 g/L i onu s koncentracijom <3,5 g/L u krvi te se u te dvije skupine analizirala prevalencija polimorfizama gena -455 G/A  $\beta$  fibrinogena.

#### 4.2.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA

Svi podaci korišteni u istraživanju prikupljeni su pretraživanjem u Bolničkom informacijskom sustavu KBC-a Zagreb kao i pretraživanjem podataka o učinjenim ehokardiografskim pregledima u Ehokardiografskom laboratoriju Zavoda za neinvazivnu dijagnostiku Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb.

Anamnestički i laboratorijski podaci koji su se koristili u ovom istraživanju prikupljeni su iz Bolničkog informacijskog sustava (BIS-a) dok su ehokardiografski podaci prikupljeni iz baze podataka (Echopack sustav, GE Health care, prema verziji koja je bila aktualna u tom razdoblju) Ehokardiografskog laboratorija Zavoda za neinvazivnu dijagnostiku Klinike za bolesti srca i krvnih žila.

Sve ehokardiografske preglede obavili su na uređajima GE Vivid 6, 7 ili 9 (General Electric Company, New York, SAD) specijalisti kardiolozi koji rade u Ehokardiografskom laboratoriju Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb.

Demografski podaci koji su zabilježeni kod ispitanika uključuju dob i spol, dok su klinički podaci obuhvatili tip atrijske fibrilacije (paroksizmalna, perzistentna ili permanentna), kardiovaskularne i cerebrovaskularne rizične čimbenike koji su obuhvaćeni bodovnim sustavom CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, koronarna bolest, srčano zatajivanje, vaskularna bolest, preboljeli CVI ili TIA).

Prikupljeni ehokardiografski podaci ispitanika bili su: ejekcijska frakcija, veličina lijevoga atrija te prisutnost ili odsutnost tromba aurikule lijevog atrija na TEE-u. Dodatno je zabilježen anamnestički podatak o konzumaciji alkohola, o navici pušenja duhanskih proizvoda te o bolesti jetre u anamnezi.

Također za sve je ispitanike zabilježena činjenica o prethodnoj antikoagulantnoj terapiji te od laboratorijskih nalaza koncentraciju fibrinogena u plazmi.

Pri obradi podataka prema tipu aritmije ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, u prvoj su oni s paroksizmalnom fibrilacijom atrija, a svi ostali (s perzistentnom i permanentnom atrijskom fibrilacijom) svrstani su u drugu skupinu.

Što se tiče ehokardiografskih parametara, svi su određivani prema kriterijima i smjernicama Europskog društva za kardiologiju, njihove radne skupine - Europskog udruženja za kardiovaskularnu dijagnostiku (European Society of cardiology ESC - European Association of Cardiovascular Imaging- EACVI) te Američkog kardiološkog društva (American College of Cardiology) kao i njihove podskupine za ehokardiografiju.

U konačnici, svim je ispitanicima zabilježen dobiveni genotip za polimorfizam – 455G/A  $\beta$  fibrinogena, prema navedenom postupku.

#### 4.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Podaci su pripremljeni pomoću programa Microsoft Office Excel, 2007 (12.0), Microsoft corporation, Redmond, WA, SAD. Kategorijske i nominalne vrijednosti prikazane su odgovarajućim frekvencijama i udjelima te su se razlike između pojedinih skupina analizirale testom  $\chi^2$ . Kontinuirane vrijednosti prikazane su medijanima i interkvartilnim rasponima, a razlike su analizirane testom Mann-Whitney U.

Za usporedbu prevalencije genotipa AA, kao kategorijske varijable, koristili smo test McNemar,  $\alpha=0,05$ , snage  $(1-\beta)$  80%, očekivane prevalencije kod ispitanika bez tromba 20%, a očekivane prevalencije kod ispitanika s trombom 50 %; za predviđenu snagu testa bilo je potrebno pridobiti 118 ispitanika (59 u svakoj skupini).

Za usporedbu koncentracije fibrinogena, kao kontinuirane varijable koja nije normalno distribuirana, koristili smo Wilcoxon signed ranks test  $\alpha=0,05$ , snage  $(1-\beta)$  80%, srednje razlike između grupa 0,2, standardne devijacije razlike 0,5, intervala pouzdanosti (CI)=95% te je za predviđenu snagu testa bilo potrebno pridobiti 102 ispitanika.

Prvo smo rezultate svih ispitanika, ukupno njih 181, prikazali deskriptivnom statistikom te smo potom prikazali razlike između ispitivane i kontrolne skupine, u neprilagođenoj statističkoj analizi, gdje smo koristili navedene testove, ovisno o tipu ispitivane varijable. Nakon toga napravljen je univarijantni model logističke regresije te potom uparena analiza metodom uparivanja prema vjerojatnosti sklonosti pomoću dva multi varijantna modela logističke regresije. Prvi model, koji smo nazvali MODEL LR 1 uključivao je sve varijable koje smo analizirali u istraživanju, dok je pak drugi model, koji smo nazvali MODEL LR 2, uključivao samo one varijable koje su u neprilagođenoj analizi pokazale statistički značajnu razliku između dviju skupina (ispitivane i kontrolne).

Detaljan prikaz navedenih modela, prvo univarijantnog, potom multivarijantnih, njihovih karakteristika, s navedenim omjerima izgleda (eng. Odds ratio, OR) i 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (engl. Confidence interval, CI) kao i varijabli koje su se koristile u modelima donose Tablice 3 - 8.

Tablica 3. Univarijantni model logističke regresije

Prikaz modela	
Null model -2 Log Likelihood	229,953
Full model -2 Log Likelihood	229,885
Chi-squared	0,0685
DF („degrees of freedom), hrv. broj stupnjeva slobode	1
Significance level	P=0,7935
Cox&Snell R2	0,0003786
Nagelkerke R2	0,0005263

Tablica 4. Karakteristike i rezultati univarijantnog modela logističke regresije

KOEFICIJENTI I STANDARDNA POGREŠKA			
varijable	koeficijent	standardna pogreška	P vrijednost
A+	-0,082652	0,31585	0,7955
konstanta	-0,65925	0,22489	0,0034
omjer izgleda i 95% interval pouzdanosti (eng. „OR“ I „CI“)			
OR = 0,9206			
95% CI = 0,4997 do 1,7099			
ROC ANALIZA			
AUC	0,510		
standardna pogreška	0,0457		
95% CI	0,495 do 0,585		

Tablica 5. Karakteristike modela logističke regresije 1 (model LR1)

-2 Log Likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
189,572a	0,200	0,278
HOSMER I LEMESHOW TEST		
Chi-square	df	P vrijednost
7,311	8	0,503

Tablica 6. Varijable u modelu LR1

VARIJABLE LR1	P VRIJEDNOST	OMJER IZGLEDA (eng. „OR“)	95 % INTERVAL POUZDANOSTI (eng. „CI“)	
			Min	Maks.
spol	0,002	3,960	1,661	9,442
pušenje	0,665	1,301	0,396	4,272
paroksizmalna AF	0,036	3,313	1,083	10,136
hipertenzija	0,586	0,767	0,295	1,996
šećerna bolest	0,108	0,456	0,175	1,189
vaskularna bolest	0,037	0,396	0,166	0,945
bolesti jetre	0,255	4,126	0,360	47,351
kronično srčano zatajivanje	0,031	0,287	0,092	0,895
ejekcijska frakcija	0,590	1,013	0,966	1,062
fibrinogen	0,279	1,181	0,874	1,596
antikoagulantna terapija	0,335	1,975	0,495	7,883
CVI/TIA	0,900	0,876	0,111	6,883
dob	0,315	0,975	0,928	1,024

Tablica 7. Model logističke regresije 2 (model LR2)

-2 Log Likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
193,291a	0,183	0,255
test HOSMER LEMGESHOW		
Chi-square	df	P vrijednost
5,803	8	0,669

Tablica 8. Varijable u modelu LR 2

VARIJABLE LR2	P VRIJEDNOST	OMJER IZGLEDA (eng. OR)	95 % INTERVAL POUZDANOSTI(eng.CI)	
			min.	maks.
spol	0,002	3,411	1,582	7,356
paroksizmalna AF	0,033	3,235	1,099	9,525
šećerna bolest	0,145	0,503	0,205	1,263
vaskularna bolest	0,049	0,442	0,196	0,995
kronično srčano zatajivanje	0,005	0,350	0,167	0,732
fibrinogen	0,262	1,187	0,880	1,600

Valjanost obaju modela logističke regresije s ciljem predikcije ispitivanog ishoda istraživanja, a to je tromboza lijevog atrija, analizirana je krivuljom operativnih karakteristika ROC (Receiver Operating Characteristics) i površinom ispod nje (AUC- area under the curve).

Kako bi se testirala valjanost modela, potrebno je razmotriti dvije karakteristike testa, a to su osjetljivost i specifičnost. Osjetljivost modela regresije sposobnost je da model predvidi pozitivni ishod u opserviranoj populaciji, a da je ishod stvarno pozitivan, tzv. stvarno pozitivni rezultat.

Specifičnost modela pak sposobnost je modela da predvidi negativni ishod u opserviranoj populaciji, a da je taj ishod stvarno negativan, tzv. stvarno negativni rezultat. Jedan način vizualizacije karakteristike modela jest stvaranje ROC krivulje, koja na svojoj osi Y pokazuje osjetljivost, a na osi X specifičnost. Kvantitativna mjera kvalitete modela prikazuje se relativnom površinom ispod krivulje, AUC brojem. Taj broj ima vrijednost od 0 do 1. Model koji ima AUC 1,0 ima savršenu sposobnost predikcije ishoda koji se testira, dok model koji ima AUC 0,5 zapravo je loš u predviđanju ishoda i jednak najobičnijem nagađanju. Ne postoji „zlatni“ broj koji klasificira dobar AUC za pojedini model. Zna se da što je veći AUC, to je veća snaga predviđanja modela za ispitivani ishod.

Često korišteno pravilo za klasifikaciju modela prema AUC-u pravilo je po Hosmeru i Lemenshowu, koje tvrdi sljedeće:

AUC 0,5 i manje: nema diskriminacije

AUC 0,5-0,7: slaba diskriminacija

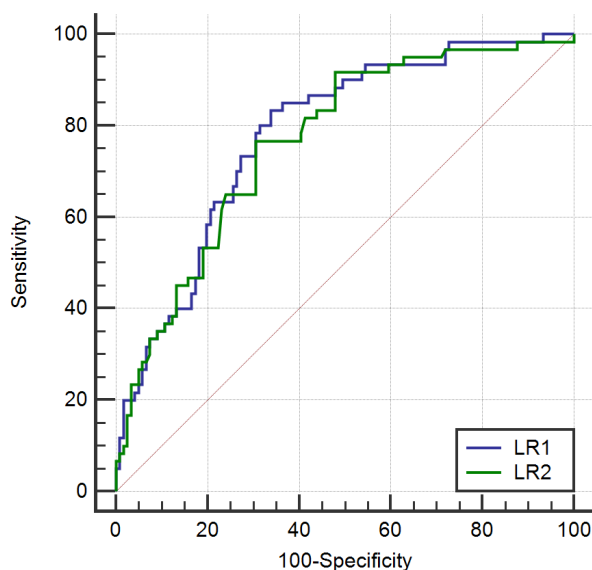
AUC 0,7-0,8: prihvatljiva diskriminacija

AUC 0,8-0,9: odlična diskriminacija

AUC > 0,9 : izvanredna diskriminacija.

No treba znati da procjena valjanosti AUC broja ovisi i o tipu istraživanja, ishodu koji se gleda, ispitivanoj populaciji, hipotezi istraživanja itd.(130)

ROC krivulje za oba modela prikazane su na Slici 7.



Slika 7. ROC krivulja i AUC za oba modela (LR1 i LR2)

Detalji ROC krivulja kao i AUC brojevi te komparacije ROC krivulja obaju modela LR( LR1 i LR2) prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Komparacija ROC krivulje i površine ispod nje za oba modela LR1 i LR2

MODEL	AUC	SP	95% CI
LR1	0,782	0,0353	0,714 - 0,839
LR2	0,766	0,0367	0,698 - 0,826

SP- standardna pogreška - DeLong et al, 1988

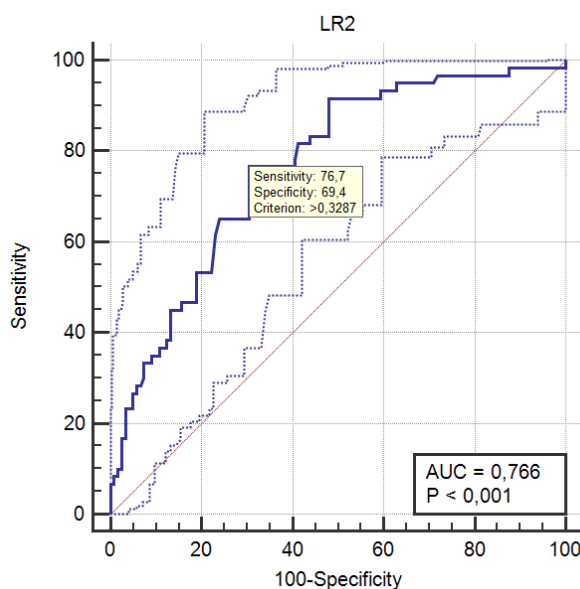
95 % CI- 95% interval pouzdanosti

LR1-LR2 KOMPARACIJA	
razlike između površina	0,0152
standardna pogreška	0,0136
95 % interval pouzdanosti	od -0,0115 do 0,0419
Z statistika	1,117
razina značajnosti	P=0,2639



Budući da oba modela imaju vrlo sličan AUC, za daljnju analizu uzet je model s manje varijabli, MODEL LR 2.

Slikovni prikaz ROC krivulje i površine ispod nje za LR2 prikazan je na Slici 8.



Slika 8. ROC i AUC za model LR2

Karakteristike ROC krivulje i površine ispod nje za model LR2 prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Karakteristike modela LR2

VARIJABLA	MODEL LR2
klasifikacijska varijabla	TROMB
uzorak	181
tromb	60 (33,15%)
kontrola	121 (66,85%)
površina ispod ROC krivulje (AUC)	
AUC	0,766
standardna pogreška	0,0367
95 % interval pouzdanosti	0,698 do 0,826
Z statistika	7,260
razina značajnosti P (površina=0.5)	<0,0001

Sve ispitanike analizirali smo modelom logističke regresije MODEL LR 2 koji je svakom ispitaniku dodijelio vjerojatnost pozitivnog ishoda, tj. tromboze (racionalni broj između 0 i 1) te smo na osnovi tih vrijednosti, za svakog pojedinog ispitanika, našli par u suprotnoj skupini (tromb i kontrola), tj. napravili statističku metodu uparivanja po vjerojatnosti sklonosti - tzv. „Propensity score matching“

Metoda uparivanja bazirana je na vjerojatnosti sklonosti. Presjek između kontrolne i ispitivane skupine mora biti dovoljno velik, što se postiže tako da se u kontrolnoj skupini nađe najmanja (minimalna) i najveća (maksimalna) vjerojatnost sklonosti, a zatim u ispitivanoj skupini maknu sve opservacije kod kojih je vjerojatnost sklonosti manja od minimalne i veća od maksimalne vrijednosti. Kako bi se izbjegla "loša uparivanja", postavlja se prag koji označava maksimalnu dopuštenu udaljenost između uparenih jedinki. Na taj smo način u našem ispitivanju u konačnici dobili skupinu koja je ispitivana, ukupno 60 bolesnika, te njezinu potpuno uparenu kontrolnu skupinu u kojoj je također 60 bolesnika. Konačno, obavljena je statistička analiza između dviju takvih uparenih skupina. Svi testovi su dvosmjerni, (eng. „two tailed“). Razina statističke značajnosti ( $p$ ) postavljena je na  $p < 0,05$ .

U analizi smo koristili programe SPSS Statistics verzija 20.0.0, IBM, Armonik, NY, SAD. i MEDCALC verzija 19.2.6, MedCalc Software Ltd, Ostend Belgija.

## 5.REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. PRIKAZ SOCIO-DEMOGRAFSKIH, KLINIČKIH, EHOKARDIOGRAFSKIH I BIOKEMIJSKIH KARAKTERISTIKA UKLJUČENIH ISPITANIKA

Prvo ćemo prikazati rezultate deskriptivne statistike naše cijele skupine s karakteristikama svih ispitanika i razlikama među njima. Zatim ćemo prikazati neprilagođene razlike među skupinama bolesnika s trombom lijevog atrija i bez njega, a potom rezultate univarijantnog modela te multivarijantnih modela logističke regresije. Naposljetku ćemo usporediti skupine prilagođene uparivanjem prema vjerojatnosti sklonosti.

U ispitivanje je bio uključen ukupno 181 ispitanik, 60 u ispitivanoj skupini, oni koji su imali tromb u aurikuli lijevog atrija (33,1 %), te 121 u kontrolnoj skupini bez tromba (66,9 %).

Kontinuirane varijable istraživane u skupinama jesu: dob, koncentracija fibrinogena u plazmi te ehokardiografski parametar globalna sistolička e젝cijska frakcija lijeve klijetke (LVEF).

Kategorijske varijable bile su: spol, podatak o pušenju, tip atrijske fibrilacije (paroksizmalna ili neparoksizmalna), arterijska hipertenzija, šećerna bolest, vaskularna bolest (podatak o bolesti koronarnih krvnih žila, perifernih krvnih žila i/ili plaka na aorti), bolest jetre, kronično srčano zatajivanje, antikoagulacijska terapija, podatak o preboljenom CVI-u ili TIA-i, ehokardiografski podatak o veličini lijevog atrija te tip -455G/A polimorfizma beta-fibrinogena.

Kao što je već navedeno, kontinuirane varijable u neprilagođenoj analizi analizirali smo testom Mann-Whitney U, a kategorijske varijable testom  $\chi^2$ .

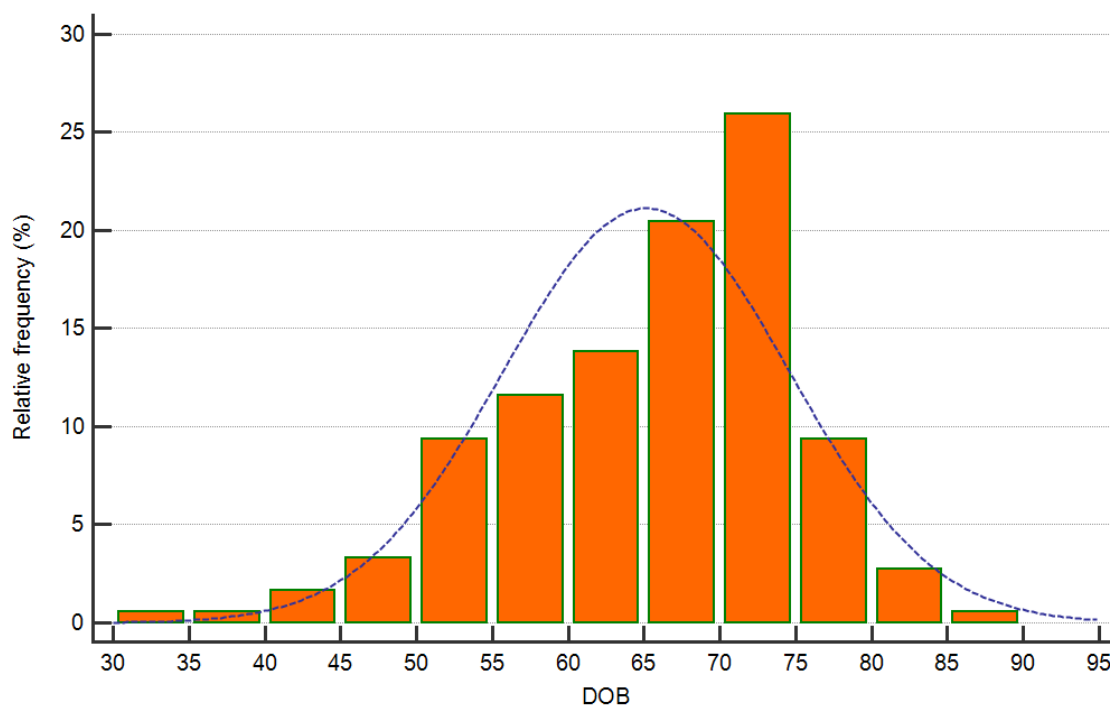
Sve socio-demografske, kliničke, ehokardiografske i biokemijske karakteristike ispitanika za genotip A+ prikazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Prikaz socio-demografskih, kliničkih, ehokardiografskih i biokemijskih karakteristika svih ispitanika, neuparena analiza za genotip A+ i AA (n=181)

Varijable	Ispitivana skupina-tromb, n=60	Kontrolna skupina bez tromba n=121	P vrijednost
dob (medijan, IQR)	68 (60,5-72,5)	67(58-72)	0,4747
muški spol n, %	33, 55	93, 76,9	0,0027
paroksizmalna AF n, %	5, 8,3	29,24	0,0115
pušenje n, %	7, 11,7	14, 11,6	0,9848
arterijska hipertenzija n, %	49, 81,7	86, 71,7	0,1244
šećerna bolest n, %	15, 25	16, 13,2	0,0484
srčano zatajivanje n, %	35, 58,3	42, 34,7	0,0025
vaskularna bolest n, %	20, 33,3	18, 14,9	0,0042
antikoagulacijska terapija n,%	55, 91,7	112, 92,6	0,8324
veličina LA n, %	52, 86,7	96, 79,3	0,2293
jetreno oštećenje n, %	1, 1,7	5, 4,1	0,3844
EF (%) medijan, IQR	50, (40-60)	55 (45-60)	0,0903
fibrinogen (g/L) medijan, IQR	3,9 (3,3-5,0)	3,6 (3-4,225)	0,0115
CHA2DS2VAScs n, %			0,0025
1.niski rizik 0 -1 n,%	8, 13,3	42, 34,7	
2.umjereni i visoki rizik 2-8 n,%	52, 86,7	79, 65,3	
CVI/TIA n, %	2, 3,3	4, 3,3	0,9922
-455G/A polimorfizam A+ n,%	30, 50	63, 52,1	0,794
-455G/A polimorfizam AA n, %	4, 6,7	8, 6,6	0,9888

AF- atrijska fibrilacija, IQR- interkvartilni raspon, LA- lijevi atrij; EF: ejekcijaska frakcija; CVI- cerebrovaskularni inzult; TIA- tranzitorna ishemijska ataka

Medijan dobi bolesnika u ispitivanoj skupini bio je 68 (IQR raspon 60,5-72,5), a u kontrolnoj skupini 67 (IQR 58-72). Grafički prikaz raspodjele dobi kod svih ispitanika prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Raspodjela svih ispitanika prema dobi

U ispitivanoj skupini 33 bolesnika bila su muškog spola (55%), dok su njih 27 bile žene (45%). U kontrolnoj skupini više od dvije trećine bolesnika bili su muškarci, njih 93 (76,9%), a 28 je bilo žena (23,1%).

U obje skupine bio je jednak udio pušača u odnosu na nepušače (sedam bolesnika u ispitivanoj skupini (11,7%) u odnosu na 14 bolesnika u kontrolnoj skupini (11,6%), dok je bolesnika s paroksizmalnom atrijskom fibrilacijom u ispitivanoj skupini bilo 8,3%, a u kontrolnoj skupini 24%, ostalo su bili bolesnici s permanentnom ili perzistentnom atrijskom fibrilacijom, njih 91,7% u ispitivanoj skupini i 76% u kontrolnoj. U kontrolnoj skupini 86 (71,7 %) bolesnika imalo je arterijsku hipertenziju, dok u ispitivanoj skupini njih 49 (81,7%), a šećernu bolest njih 15 (25%) u ispitivanoj te 16 (13,2%) u kontrolnoj skupini.

Kada je riječ o drugim kardiovaskularnim komorbiditetima kao što su kronično srčano zatajivanje, bolesti jetre te vaskularna bolest, odnos ispitivane i kontrolne skupine bio je sljedeći: 58,3% ispitivane skupine imalo je srčano zatajivanje, 1,7% bolesti jetre te 33,3% vaskularnu bolest, a vrijednosti za navedeno u kontrolnoj skupini bile su 34,7%, 4,1% te 14,9%. Jednak udio bolesnika u obje skupine već je prije prebolio CVI i/ili TIA-u, njih 3,3%.

Također jednak udio bolesnika bio je antikoaguliran, u kontrolnoj skupini njih 92,6%, a u ispitivanoj 91,7%.

Medijan globalne sistoličke funkcije lijeve klijetke u ispitivanoj je skupini 50% (IQR 40-60), a u kontrolnoj 55% ( IQR 45-60).

Varijablu veličine lijevog atrija opisali smo kao binarnu varijablu, točnije bolesnike smo podijelili u one koji imaju uvećan lijevi atrij i one koji imaju normalnu veličinu lijevog atrija. Navedenu diskretizaciju učinili smo jer nismo imali ujednačene podatke za sve bolesnike, odnosno većina ispitanika imala je zabilježen dijametar (mm) iz 2D ehokardiografskog prikaza, a neki indeksirani volumen (ml/m<sup>2</sup>). Prema aktualnim preporukama Europskog i Američkog kardiološkog društva za mjerenje i određivanje dilatiranog lijevog atrija, za svakog ispitanika prema učinjenom mjerenju, odredili smo je li lijevi atrij dilatiran ili ne, kao što je detaljno opisano i potkrijepljeno referencom u poglavlju Metode i ispitanici.

U ispitivanoj skupini 52 bolesnika (86,7%) imala su dilatiran lijevi atrij, a u kontrolnoj skupini 96 bolesnika (79,3%). Među skupinama u toj varijabli nije bilo statistički značajne razlike.

Medijan fibrinogena u plazmi u ispitivanoj skupini bio je 3,9 g/L (IQR 3,3-5), a u kontrolnoj skupini 3,6 g/L (IQR 3-4,225)

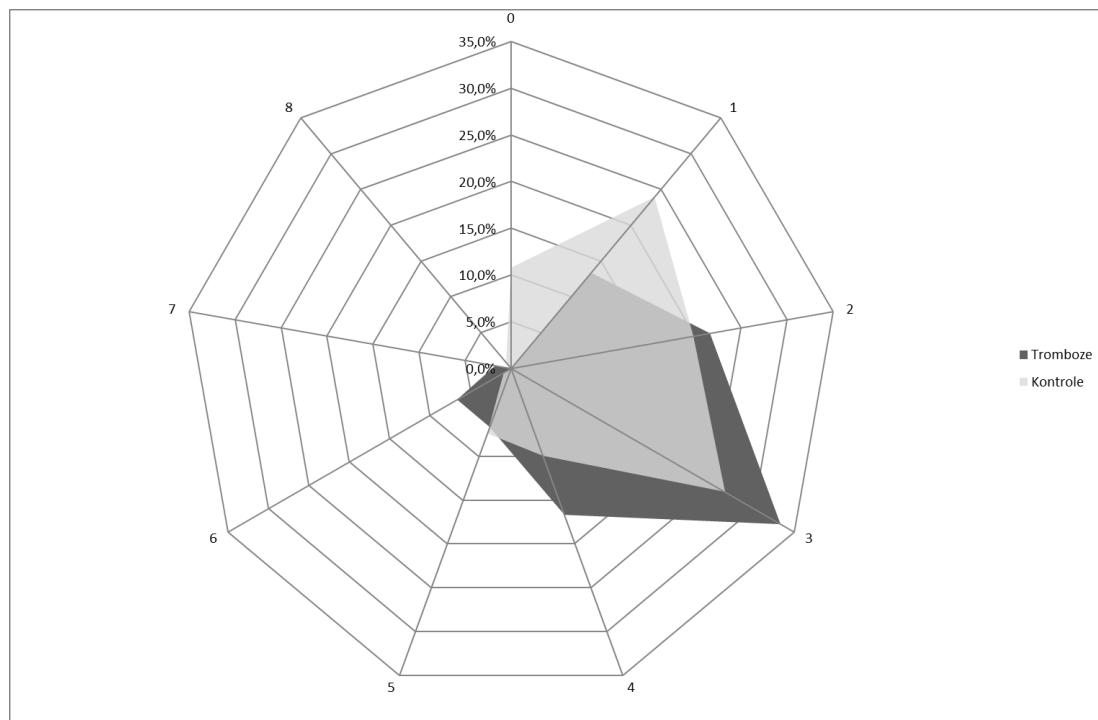
Što se tiče bodovnog sustava CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc, bolesnike smo podijelili u dvije skupine, one niskoga tromboembolijskoga rizika koji su imali bodovni rezultat 0 ili 1 te u one umjerenog i visokog tromboembolijskoga rizika koji su imali bodovni rezultat 2-8.

Tablični prikaz raspodjele ispitanika prema bodovnom sustavu CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc prikazan je u Tablici 12.

Tablica 12. Raspodjela ispitanika prema bodovnom sustavu CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc

bodovni rezultat CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> VASc	ISPITIVANA SKUPINA TROMB	KONTROLNA SKUPINA BEZ TROMBA
0	0,0%	10,7%
1	13,3%	24,0%
2	21,7%	19,8%
3	33,3%	26,4%
4	16,7%	9,9%
5	6,7%	7,4%
6	6,7%	0,8%
7	1,7%	0,0%
8	0,0%	0,8%

U ispitivanoj skupini bilo je 13,3% bolesnika niskog rizika, dok su ostali, njih 86,7%, bili bodovnog ranga CHA2DS2VASc 2 ili više. U kontrolnoj skupini također 34,7% bolesnika bilo je niskog rizika, dok je 65,3% imalo bodovni rezultat 2 ili više. Relativne frekvencije bodovnog sustava CHA2DS2VASc prema grupama naših ispitanika prikazane su u superponiranom „Nightingale“ grafu.



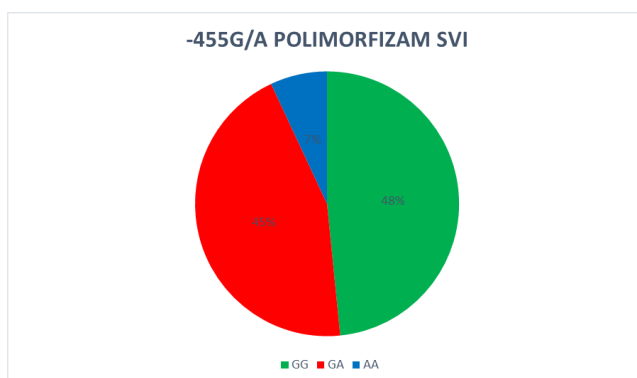
Slika 10. „Nightingale“ graf relativnih frekvencija bodovnog sustava CHA2DS2VASc prema grupama ispitanika

Nakon što su se navedeni deskriptivni neupareni podaci analizirali neparametrijskim testovima za kategorijske varijable testom  $\chi^2$ , te za kontinuirane varijable testom Mann Whitney, razvidno je da su se skupine značajno razlikovale u sljedećim varijablama: spol, tip aritmije, šećerna bolest, srčano zatajivanje, bodovni rezultat CHA2DS2VASc, vaskularna bolest te koncentracija fibrinogena u plazmi. U kontrolnoj je skupini bilo značajnije više bolesnika muškoga spola ( $p=0,0027$ ), onih koji su imali paroksizmalnu atrijsku fibrilaciju ( $p=0,0115$ ) te onih koji su bili u blagom tromboembolijskom riziku prema bodovnom rezultatu CHA2DS2VASc ( $p=0,0025$ ).

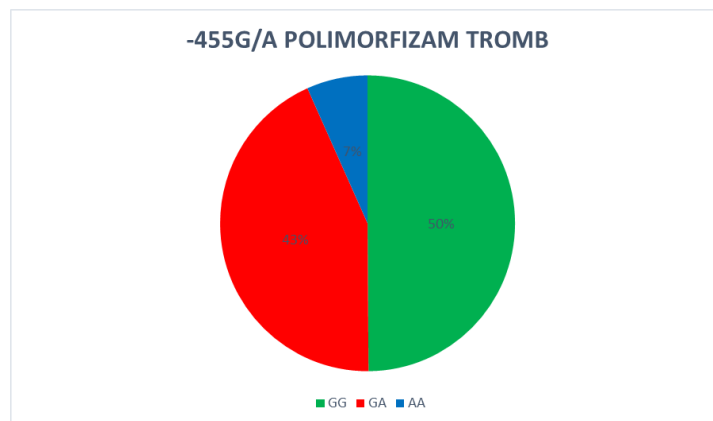
S druge pak strane ispitivana skupina s trombom u aurikuli lijevoga atrija imala je značajnije više ispitanika sa šećernom bolesti tip 2, srčanim zatajivanjem, vaskularnom bolesti, koncentracijom fibrinogena u plazmi te bolesnika s umjerenim i visokim tromboembolijskim rizikom ( $p=0,0484$ ;  $p=0,0025$ ;  $p=0,0042$ ;  $p=0,0115$ ,  $p=0,0025$ ).

## 5.2. PRIKAZ RASPODJELE -455G/A POLIMORFIZMA KOD ISPITANIKA

Kod svih ispitanika, njih ukupno 181, udio genotipa AA -455G/A polimorfizma bio je 12 (6,6%), genotipa GA 81 (44,8%) te genotipa GG 88 (48,6%). U kontrolnoj skupini genotip AA bio je zastupljen kod osam ispitanika (6,6%), GA kod 55 (45,5%), a GG kod 58 ispitanika (47,9%). U ispitivanoj skupini genotip AA detektiran je kod četiri ispitanika (6,7%), genotip GA kod 26 ispitanika (43,5%) te genotip GG kod 30 ispitanika (50,0%). Slike 11,12 i 13 prikazuju raspodjelu polimorfizma kod skupina naših ispitanika.

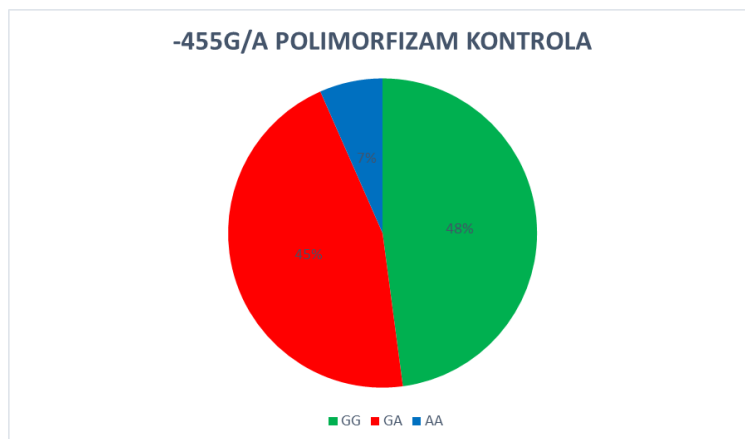


Slika 11. Udio -455G/A polimorfizma kod svih ispitanika



Slika 12. Udio -455G/A polimorfizma kod ispitivane skupine s tromбом





Slika 13. Udio -455G/A polimorfizma kod kontrolne skupine bez tromba

### 5.3.PRIKAZ SOCIO-DEMOGRAFSKIH, KLINIČKIH, EHOKARDIOGRAFSKIH, BIOKEMIJSKIH I GENETSKIH KARAKTERISTIKA ISPITANIKA NAKON PROVEDENE METODE UPARIVANJA PREMA VJEROJATNOSTI SKLONOSTI

Nakon uparivanja naših dviju skupina po 60 ispitanika (kontrolna i skupina s trombom), metodom uparivanja prema vjerojatnosti sklonosti dobiveni su sljedeći rezultati.

U ispitivanoj skupini medijan dobi bio je 68 godina (IQR 60,5-72,5), a u kontrolnoj skupini također 68 godina (IQR 62-72). Jednak udio muškoga spola bio je prisutan u obje skupine, 33 bolesnika (55%) u ispitivanoj skupini, a 37 (61%) u kontrolnoj skupini. Skupine se nisu razlikovale prema broju pušača te je u obje skupine bilo po sedam pušača (11,7% u obje skupine). Četiri bolesnika (6,7%) u kontrolnoj skupini imala su paroksizmalnu atrijsku fibrilaciju, dok su svi ostali imali perzistentnu ili permanentnu atrijsku fibrilaciju. Pet bolesnika (8,3%) u ispitivanoj skupini imalo je paroksizmalnu atrijsku fibrilaciju, a ostali perzistentnu ili permanentnu. Arterijsku hipertenziju u ispitivanoj skupini imalo je 49 bolesnika (81,7%) bolesnika, a u kontrolnoj skupini njih 47 (78,3%). Šećernu bolest u ispitivanoj je skupini imalo 15 (25%) bolesnika, te 11 (18,3%) u kontrolnoj skupini.

Rezultati za druge kardiovaskularne komorbiditete, kao što su kronično srčano zatajivanje, bolesti jetre te vaskularna bolest su sljedeći: 58,3% ispitivane skupine imalo je srčano zatajivanje, 1,7% bolesti jetre te 33,3 % vaskularnu bolest, dok su vrijednosti za navedene varijable u kontrolnoj skupini bili su 63,3%, 5%, te 26,7%. Sličan udio bolesnika i u kontrolnoj i u ispitivanoj skupini ranije su preboljeli CVI i/ili TIA-u, njih 3,3% u ispitivanoj te 1,7% u kontrolnoj. Nije bilo razlike u podatku o antikoagulantnoj terapiji.

Tako je u ispitivanoj skupini 91,7% bilo antikoaguliranih bolesnika, dok je u kontrolnoj skupini bilo njih 95%.

Medijan globalne sistoličke funkcije lijeve klijetke u ispitivanoj skupini bio je 50% (IQR 40-60), a u kontrolnoj 45% (IQR 37,5-55). Kada govorimo o uvećanom lijevom atriju, u ispitivanoj skupini 52 su bolesnika (86,7%) imala uvećan lijevi atrij, a u kontrolnoj skupini 50 bolesnika (83,3%).

Prosječne vrijednosti fibrinogena u plazmi u ispitivanoj skupini bile su 3,9 g/L (IQR 3,3-5), a u kontrolnoj skupini 3,6 g/L (IQR 3,3-4,35).

Što se tiče bodovnog sustava CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc, također nije bilo statistički značajne razlike između skupina te je u ispitivanoj skupini bilo ukupno 13,3% bolesnika u skupini niskog tromboembolijskog rizika (bodovni rezultat 0 i 1), a njih 86,7% bilo je u skupini umjerenog i visokoga tromboembolijskog rizika (bodovni rezultat 2-8). U kontrolnoj skupini rezultati za navedeno su: 15% i 85%.

Kategorijske varijable u uparenoj analizi testirali smo testom McNemar, a kontinuirane varijable testom Wilcoxon signed ranks, kao što je detaljno opisano u poglavlju o statističkoj analizi.

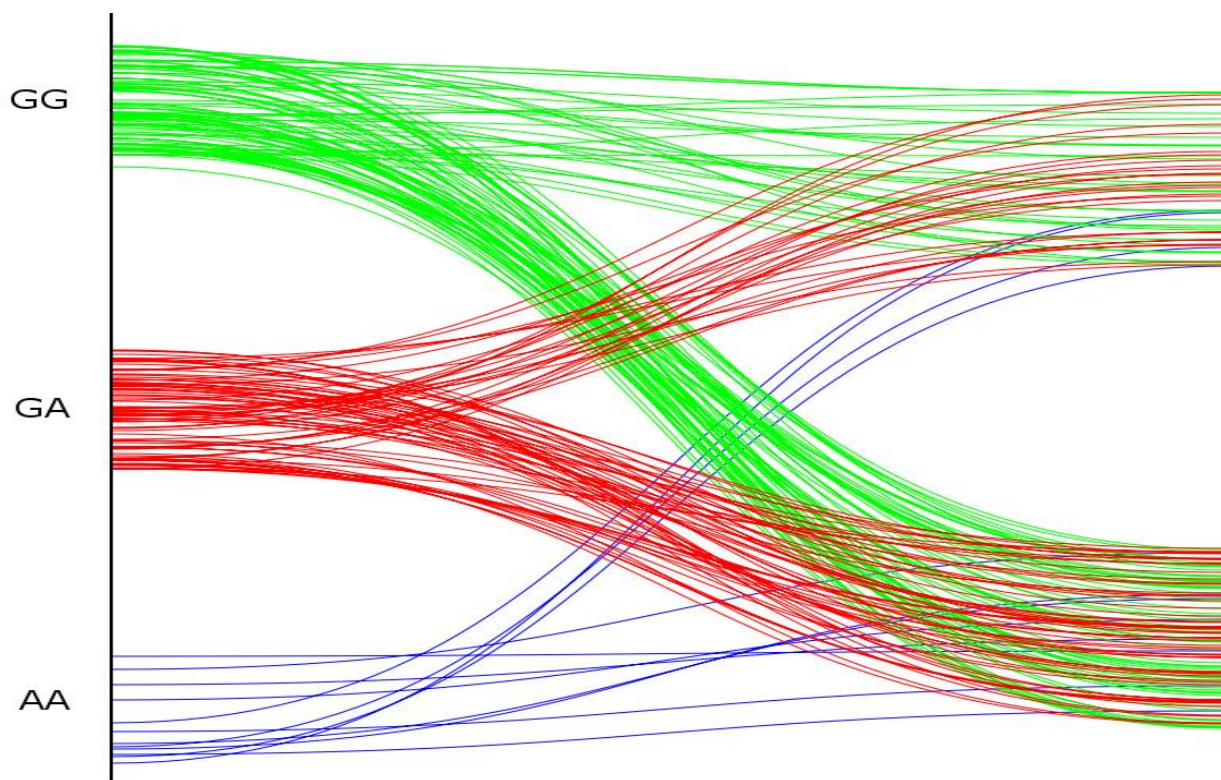
Rezultati pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike između skupina niti u jednoj ispitivanoj varijabli pa tako niti u ispitivanom polimorfizmu fibrinogena.

Niti za jedan genotip nismo dokazali statistički značajnu prevalenciju između skupina, a također kada su se rezultati prikazali za zajednički genotip A+ (GA + AA) u obje skupine prevalencija je bila podjednaka te nije bilo statistički značajne razlike između skupina. Niti jedna varijabla koju smo ispitali, kako klinička, tako i ehokardiografska i biokemijska, nije se pokazala kao prediktor tromboze aurikule lijevog atrija, uključujući genotip A+ -455 G/A polimorfizma za  $\beta$  lanac fibrinogena.

Također, univarijantnim modelom logističke regresije genotip A+ nije se pokazao učinkovitim prediktorom tromboze lijevog atrija kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom.

U konačnici smo napravili analizu za postizanje specifičnih ciljeva istraživanja, gdje smo skupinu s trombom podijelili u dvije podskupine, onu u kojoj je koncentracija fibrinogena <3,5 g/L te onu u kojoj je koncentracija fibrinogena >3,5 g/L. U prvoj skupini bilo je 19 ispitanika od kojih je 11 (57,9%) imalo genotip A+, dok je u drugoj skupini bio 41 ispitanik od kojih je 19 imalo genotip A+ (46,3%). Niti tu nije bilo statistički značajne razlike,  $p=0,405$  ( $\chi^2$  test).

Kompletan detaljan prikaz rezultata uključujući p vrijednost nalazi se u Tablici 13, dok slikovni prikaz raspodjele polimorfizama između dviju skupina prikazuje fluvijalni graf na Slici 14.



Slika 14. Fluvijalni graf raspodjele polimorfizma bez statistički značajne razlike između skupina ( $p=1$ , test McNemar)

Tablica 13. Prikaz rezultata metode uparivanja po vjerojatnosti sklonosti za genotip A+ i AA; dvije uparene skupine po 60 ispitanika (n=121)

Varijable	Ispitivana skupina s trombom, n=60	Uparena kontrolna skupina bez tromba n=60	P vrijednost
dob (medijan, IQR)	68 (60,5-72,5)	68 (62-72)	0,9362
muški spol n, %	33, 55	37,61	0,125
paroksizmalna AF n, %	5, 8,3	4, 6,7	1
pušenje n, %	7, 11,7	7, 11,7	1
arterijska hipertenzija n, %	49, 81,7	47, 78,3	0,5
šećerna bolest n, %	15, 25	11, 18,3	0,125
srčano zatajivanje n, %	35, 58,3	38, 63,3	0,25
vaskularna bolest n, %	20, 33,3	16, 26,7	0,125
antikoagulacijska terapija n,%	55, 91,7	57, 95	0,5
veličina LA n, %	52, 86,7	50, 83,3	0,5
jetreno oštećenje n, %	1, 1,7	3, 5	0,5
EF(%) medijan, IQR	50, (40-60)	45 (37,5-55)	0,3524
fibrinogen (g/L) medijan, IQR	3,9 (3,3-5,0)	3,6 (3,3-4,35)	0,4295
CHA2DS2VASCs n, %			1
1.niski rizik 0 -1 n,%	8, 13,3	9, 15	
2. umjereni i visoki rizik 2-8 n,%	52, 86,7	51, 85	
CVI/TIA n, %	2, 3,0	1, 1,7	1
-455G/A polimorfizam A+ n,%	30, 50	31, 51,7	1
-455G/A polimorfizam AA n,%	4, 6,7	4, 6,7	1

AF- atrijska fibrilacija, IQR- interkvartilni raspon, LA- lijevi atrij; EF: ejekcijaska frakcija; CVI- cerebrovaskularni inzult; TIA- tranzitorna ishemijska ataka

## 6.RASPRAVA

Prema dosadašnjim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje je postavilo hipotezu da pojavnost tromba u aurikuli lijevoga atrija kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom može biti posljedica polimorfizma gena za fibrinogen s ovolikim brojem ispitanika. Slično istraživanje provedeno je 2010. godine, no na oko tri puta manjem broju ispitanika. U spomenuto istraživanje (129) bilo je uključeno 45 ispitanika s atrijskom fibrilacijom kojima se analizirao polimorfizam -455G/A beta-fibrinogena u dvije skupine, jednoj bez tromba u aurikuli lijevoga atrija te u drugoj s trombom. U navedenim skupinama navedeni polimorfizam nije bio statistički značajno povezan s pojavnosti tromba, no u podanalizi statistički značajna razlika postigla se tek kada su se ispitanicima s trombom dodali i bolesnici koji nisu imali tromb, već samo SEK.

Ovo istraživanje uključuje gotovo četiri puta više ispitanika od navedene studije te smo uključili ispitanike samo s trombom, u toj skupini bilo je tri puta više ispitanika. Navedeno predstavlja dodatnu prednost jer je tromb u aurikuli lijevoga atrija puno veći klinički ishod od samoga SEK-a. Kada govorimo o SEK-u, onda znamo da je to ehokardiografska karakteristika koju možemo prikazati u brojnim situacijama, jedna je od njih turbulentno gibanje krvi u lijevom atriju i aurikuli kod atrijske fibrilacije, kada ona predstavlja vrtložno nakupljanje eritrocita koji su povezani fibrinogenom te se na TEE-prikazu vidi kao „dim“ u području aurikule i/ili čitavoga lijevog atrija. SEK je česti fenomen kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom te je nekoliko studija do sada dokazalo kako on može dovesti do stvaranja tromba i u konačnici do razvoja moždanog udara. (121–124) Sam SEK predstavlja jedan od ehokardiografskih pokazatelja prokoagulantnog miljea u lijevom atriju, no sam po sebi nije znak prisutnosti tromba. Prema istraživanju koje je pokušalo pronaći prediktore za SEK kod pacijenata s nevalvularnom atrijskom fibrilacijom koji su bolji od samog bodovnog sustava CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc, a radilo se o retrospektivnom istraživanju koje je uključilo više od 1400 ispitanika, dokazali su kako kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom bolji prediktivni model za SEK uključuje sljedeće čimbenike: dob, neparoksizmalnu atrijsku fibrilaciju, raniji moždani udar i/ili TIA, kongestivno srčano zatajivanje kao i uvećanje lijevog atrija. (125)

Unatoč činjenici da smo imali puno „snažniji“ ishod istraživanja, niti ovi rezultati, kao niti rezultati prethodnog istraživanja, nisu dokazali povezanost između genskog polimorfizma fibrinogena i pojavnosti tromba u aurikuli lijevog atrija kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom. Inicijalno u neovisnoj analizi kao prediktori tromboze lijevog atrija pokazali su se tip aritmije, šećerna bolest tip 2, vaskularna bolest, muški spol, bodovni sustav CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc, koncentracija fibrinogena i kongestivno srčano zatajivanje. Međutim, nakon logističke regresije i uparene analize metodom uparivanja prema vjerojatnosti sklonosti, niti jedna od tih ispitivanih varijabli nije se pokazala kao neovisni prediktor tromboze aurikule lijevog atrija kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom, uključujući koncentraciju fibrinogena i polimorfizam -455G/A beta-fibrinogena.

Iz navedenoga se može zaključiti kako je povećana koncentracija fibrinogena i pojavnost tromba u aurikuli lijevog atrija ipak posljedica brojnih drugih čimbenika, samih za sebe i u međusobnoj interakciji, te da nije povezana isključivo i samo s našim genima.

Naravno, zaključak iznosimo prema rezultatima ovoga istraživanja. U literaturi se može pronaći nekoliko istraživanja koja su se bazirala na ispitivanom polimorfizmu, no ona su gotovo uvijek kao konačni ishod imala moždani udar, a niti jedno trombo u aurikuli lijevog atrija.

Tako je finska studija, koja je uključila oko petsto ispitanika, dokazala da je A+ genotip -455G/A polimorfizma povezan s lošijim preživljenjem kod žena u dobi 55-71 godine nakon preboljenog moždanog udara.(131) Iako se zna da je incidencija moždanog udara manja kod žena nego kod muškaraca, poznato je da će žene dva puta češće umrijeti od moždanoga udara nego muškarci. Spomenuto istraživanje nije dokazalo povezanost polimorfizma sa svim ispitanicima, već isključivo sa ženama te dobi, gdje je polimorfizam -455G/A, njegov genotip A+, bio neovisan prediktor lošijeg ishoda i preživljenja. Rezultat je bio isti i nakon prilagođene analize za srčane aritmije, atrijsku fibrilaciju, vrijednosti CRP-a, dislipidemiju, arterijsku hipertenziju, anamnezu koronarne bolesti, dob, spol te ostale zbujujuće čimbenike, kao npr. pušenje.

Kineska studija iz 2017. godine, u koju je također bilo uvršteno oko petsto ispitanika, analizirala je bolesnike s dokazanim kardioembolijskim moždanim udarom koji su imali atrijsku fibrilaciju te nizak bodovni rezultat CHA2DS2VASc (0 i 1). Kod tih ispitanika analizirano je nekoliko genotipova, između ostalog i polimorfizam -455G/A beta-fibrinogena. Rezultati pokazuju kako je genotip A+ neovisno povezan s pojavnošću kardioembolijskog moždanog udara kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom i niskim tromboembolijskim rizikom. Dodatno ispitanici s verificiranim genotipom A+ imali su značajnije veću koncentraciju fibrinogena nego ispitanici s verificiranim divljim tipom genotipa GG.(126)

Još je nekoliko studija do sada povezalno genotip A+ s pojavom moždanog udara; jedna je npr. pokazala da je navedeni polimorfizam češći kod bolesnika s moždanim udarom velikih krvnih žila,(132), a jedna pak japanska studija dokazala je da je navedeni polimorfizam neovisni rizični čimbenik kod bolesnika s moždanim udarom i arterijskom hipertenzijom. (133)

Nekoliko velikih metaanaliza potvrdilo je povezanost – 455G/A polimorfizma za beta lanac fibrinogena s ishemijskim moždanim udarom kod kineske i azijske populacije. (134–136) Kao što se vidi iz svih citiranih studija, sve su provedene na kineskoj i azijskoj populaciji te je kod svih glavni ishod istraživanja bio moždani udar. Do sada nema studija koje navedeni polimorfizam povezuju s trombom u aurikuli lijevog atrija kod pacijenata s atrijskom fibrilacijom, a kod kojih su ispitanici bijelci. Upravo je to jedna od prednosti ovoga istraživanja jer je uključila populaciju bijele rase, europskoga kontinenta.

Posljednja metanaliza iz 2018. godine, koja je uključila do tada objavljene 33 studije, na temu povezanosti polimorfizama za β lanac fibrinogena s rizikom za razvoj ishemijskog moždanog udara, pokazala je kako su polimorfizmi -148 C/T i – 455 G/A beta-fibrinogena značajno povezani s rizikom za razvoj ishemijskog moždanoga udara. Međutim, podanaliza prema etničkoj pripadnosti pokazala je kako je upravo polimorfizam -455G/A povezan s moždanim udarom kod Azijata,

dok je pak polimorfizam -148 C/T povezan s bijelcima. Iako navedena metaanaliza ima nekoliko nedostataka, najveća je metaanaliza o toj temi objavljena do sada te u velikoj mjeri može objasniti negativan rezultat i ovoga istraživanja. (137)

Točan mehanizam kojim polimorfizam -455G/A beta-fibrinogena može utjecati na pojavnost moždanoga udara nije sasvim jasan. Eksperimentalne studije dokazale su kako -455G/A polimorfizam može utjecati na različite razine transkripcije gena, te da je alel A povezan sa značajnom povećanom aktivnošću promotorske regije. (103,138)

Prema dosadašnjim epidemiološkim i biokemijskim istraživanjima, polimorfizam -455G/A beta-fibrinogena genetska je varijacija koja je najjače povezana s povećanom koncentracijom fibrinogena u plazmi. (98,139,140)  
Homozigotnost AA povezana je s povećanjem koncentracije fibrinogena za otprilike 0,3 g/L kada se uspoređi s homozigotom GG. (141)

Nekoliko je zanimljivih istraživanja u literaturi vezanih za povećanu koncentraciju fibrinogena; tako je jedna studija s tristo ispitanika dokazala kako povećane koncentracije fibrinogena perzistiraju tijekom cijelog trajanja akutne faze moždanoga udara i da su povezane s lošijim ishodom, neovisno o inicijalnim vrijednostima.(142) Nadalje, studija kolega iz Kine dokazala je povećanu koncentraciju fibrinogena kod bolesnika sa šećernom bolesti tip 2 i koronarnom bolesti, a nosioci su genotipa AA polimorfizma -455G/A. (143) Navedena studija zanimljiva je po tome što je pokazala značajni učinak interakcije gena s okolišem pa se tako pokazalo da je povećana koncentracija fibrinogena kod žena vezana za hormonalni status i/ili oralnu kontracepciju, dok je pak najveća koncentracija fibrinogena bila kod homozigota AA koji su pušači.

Metodologija istraživanja o ovoj temi je mnogo, tako je u jednom istraživanju hipoteza bila dokazati značajnu razliku u polimorfizmima ovisno o tipu moždanog udara (male krvne žile ili velike cerebralne krvne žile). No, tu su rezultati također bili negativni, točnije nije bilo razlike kod tipa moždanoga udara u ovisnosti o -455G/A polimorfizmu (115), a studija je uključila nešto više od 250 ispitanika te je rađena također na kineskoj populaciji. Međutim, i u ovom istraživanju bolesnici s genotipom GA i AA (genotip A+) imali su značajnije veću koncentraciju fibrinogena u odnosu na one s genotipom GG.

I u ovom istraživanju početni neupareni rezultati pokazali su kako skupina s trombom ima veću koncentraciju fibrinogena u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, nakon logističke regresije i uparene analize, nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji fibrinogena između tih dviju skupina. Kao što je već spomenuto, koncentraciju fibrinogena u plazmi uvjetuju brojni čimbenici. Prema dosadašnjim spoznajama dominantno je posljedica interakcije gena i okoliša. Stoga je rezultat ovoga istraživanja vjerojatno posljedica karakteristike uključene populacije te drugih okolišnih čimbenika koji su prošli nezamijećeni u ovom opservacijskom retrospektivnom istraživanju. Vrlo je važan okolišni čimbenik pušenje, no skupine se nisu statistički značajno

razlikovale niti u toj varijabli. Nadalje, fibrinogen je vrlo važna komponentna koagulacijske kaskade te povećana koncentracija fibrinogena dovodi do hiperkoagulabilnog stanja i protrombotskog miljea, koji dovodi u konačnici do stvaranja tromba, tj. ugrušaka. No isto tako znamo da je fibrinogen i marker upale, a u tom procesu sudjeluju brojni čimbenici koji su međusobno u interakciji jedni s drugima te dovode do proinflamatornog miljea koji je sam po sebi protrombotski i profibrotski.

Negativni rezultat ovoga istraživanja možemo tumačiti s nekoliko obrazloženja. Prvo obrazloženje jest da su na pojavnost tromba u aurikuli lijevog atrija utjecali brojni drugi čimbenici koagulacijske kaskade te prokoagulantnog i proinflamatornog miljea same atrijske fibrilacije, a ne isključivo -455G/A polimorfizam i s njim povezane povećane koncentracije fibrinogena. Već je prije navedena spoznaja o različitim prokoagulantnim uvjetima periferne krvi od one u lijevom atriju i njegovoj aurikuli, gdje se sam tromb i stvara, stoga bi rezultat možda bio i drukčiji kada bi se analizirali koagulacijski čimbenici i biomarkeri iz krvi uzete u samom lijevom atriju, u odnosu na krv uzetu na periferiji. Naravno, takva vrsta istraživanja bila bi mnogo invazivnija za bolesnike, metodološki zahtjevnija te upitne etičke i kliničke opravdanosti. Dodatno, nekoliko studija iz literature također nisu uspjele dokazati povezanost polimorfizma -455 G/A beta-fibrinogena s povećanom koncentracijom fibrinogena i trombotskim događajima. (91,137,138)

Osim istraživanog polimorfizma, postoje brojni drugi SNP-i u području beta-fibrinogen promotorske regije, stoga sam funkcionalni učinak izoliranog polimorfizma -455G/A ostaje kontroverzan. Neke genske analize pokazale su kako navedeni polimorfizam nije funkcijski te da je zapravo povezanost povećane koncentracije fibrinogena s polimorfizmom -455G/A rezultat povezanost neravnoteže između polimorfizma -455 G/A i ostalih mogućih polimorfizama. (144)

Neke pak druge studije pokazuju suprotne rezultate. Studija „ARGINE“ iz 2008. godine analizirala je ukupno 12 SNP-a za fibrinogen kod 895 ispitanika koji su preboljeli srčani udar u pet europskih gradova. Od 12 ispitivanih, osam SNP-a bili su značajno povezani s koncentracijom fibrinogena u plazmi (4 SNP za  $\alpha$  lanac fibrinogena: rs2070011; rs207006; rs2070022; rs2070014, te 4 SNP za  $\beta$  lanac fibrinogena: rs1800790; rs2227399; rs6056 i rs4220) te su dokazali da specifični haplotipovi za skupine gena za  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  lance fibrinogena (FGA, FGB, FGG) modificiraju ekspresiju fibrinogena kao odgovor na proinflamatorni stimulans, kao npr. IL-6, tako da koncentracija fibrinogena bude veća uz prisutnost IL-6. Sve navedeno može utjecati na normalnu interindividualnu varijabilnost u koncentraciji fibrinogena. Navedeno istraživanje dokazalo je kako 4 SNP-a, smještene na genima za  $\beta$  lanac fibrinogena, koji su u snažnoj povezanosti neravnoteži, utječu na razinu fibrinogena. Upravo polimorfizam -455G/A (FGB rs1800790) pokazuje najveću povezanost s koncentracijom fibrinogena u plazmi. Navedena studija zanimljiva je i po činjenici da je pokazala kako razina koncentracije fibrinogena ne ovisi samo o rasi i etničkoj pripadnosti, već su zamijećene razlike u varijabilnosti koncentracije fibrinogena ovisno o



gradovima iz kojih su ispitanici (studija je uključila ispitanike iz pet različitih europskih gradova).(145)

Znamo da se razina fibrinogena u plazmi razlikuje kod različitih etničkih skupina, kao rezultat genetskih varijacija.(146) Dodatno, na njezinu varijabilnost utječe prehrana i stil života, godišnje doba te drugi demografski čimbenici kao što su dob, spol i indeks tjelesne mase.(105,147,148) Pogotovo je bitna informacija o sezonskoj varijaciji koncentracije fibrinogena, stoga nam zapravo serijsko mjerenje fibrinogena daje mnogo točnije podatke od jednokratnog mjerenja. Sve navedene činjenice mogu djelomično opravdati nesklad između rezultata brojnih kliničkih studija o temi fibrinogena, a time i ovoga istraživanja, gdje se koncentracija fibrinogena mjerila jednokratno, i to za vrijeme hospitalizacije, a pacijenti su se prikupljali u intervalu od nekoliko godina.

Nekoliko je čimbenika koji ograničavaju generalizaciju zaključaka našeg istraživanja. Primarno, činjenica da se radi o opservacijskoj studiji na relativno malom broju ispitanika, iako je ova studija do sada najveća prema broju ispitanika za navedenu hipotezu. Dodatni limitirajući čimbenik jest i to da je istraživanje provedeno na populaciji jednog bolničkoga centra, jedne regije i rase te da su u istraživanje uključeni samo hospitalizirani bolesnici, a ne opća populacija. Glavni ishod ovoga istraživanja je tromb u aurikuli lijevog atrija te smo prva studija s ovom hipotezom koja je uključila tako velik broj ispitanika s trombom u aurikuli lijevog atrija, a nismo uključivali ispitanike sa SEK-om. Svjesni smo činjenice da je klinički značajniji ishod ishemijski moždani udar, međutim, znamo da se tromb u aurikuli lijevog atrija smatra glavnim mehanizmom razvoja tromboembolijskog moždanoga udara, stoga predstavlja prihvatljiv ishod za procjenu rizika.

Nekoliko je prednosti ovoga istraživanja. Prvo, ovo je prva studija ovakvog tipa na tolikom broju ispitanika, a koja je uključila različite prediktore tromboze u svojoj analizi: kliničke, demografske, ehokardiografske, biokemijske i genetske. Drugo, ovo istraživanje uključilo je podatak i o antikoagulantnoj terapiji bolesnika te je više od 90% naših ispitanika (91,7% u ispitivanoj, 92,6% u kontrolnoj), u vrijeme detekcije tromba u aurikuli lijevog atrija bilo na antikoagulantnoj terapiji.

Buduća istraživanja o ovoj temi trebala bi uključiti još veći broj ispitanika, biti prospektivna s dužim periodom praćenja bolesnika, gdje bi glavni ishod uz tromb u aurikuli lijevog atrija svakako trebao biti i moždani udar. Istraživanje bi trebalo uključiti nekoliko različitih centara te uz hospitalne bolesnike uključiti i opću populaciju. Dodatno za analizu koncentracije fibrinogena, svakako bi je trebalo mjeriti serijski. Možda bi nam takvo istraživanje pokazalo nove spoznaje o kliničkim, biokemijskim, ehokardiografskim i genskim prediktorima tromboze kod bolesnika s atrijskom fibrilacijom, kojima bismo mogli mijenjati terapijski i dijagnostički protokol, poboljšati prevenciju bolesti te u konačnici unaprijediti liječenje i prognozu bolesnika koje liječimo.

## 7.ZAKLJUČAK

Koncentracija fibrinogena smatra se rizičnim čimbenikom za aterosklerozu i tromboembolijske neželjene događaje kod bolesnika s koronarnom bolesti, perifernom vaskularnom bolesti, šećernom bolesti itd. No još uvijek nije sasvim jasno koliko bi terapijske strategije koje ciljaju na fibrinogen imale kliničkog efekta na smanjenje kardiovaskularnog, cerebrovaskularnog i tromboembolijskog rizika, kao što još uvijek nije jasno koliko je fibrinogen dobar marker kardiovaskularnog rizika. Iako se u brojnim studijama pokazalo da je koncentracija fibrinogena povezana s genskim polimorfizmima, isto tako brojne studije tu tezu opovrgavaju. Stoga se u ovom trenutku još uvijek smatra kako su zapravo varijabilnost fibrinogena u plazmi te u konačnici njegov učinak na krajnji ishod, kao što je tromboza i/ili moždani udar, posljedica nekoliko interakcija, na prvom mjestu interakcija između gena, a onda u konačnici između gena i okoliša. Kada je povećana koncentracija fibrinogena u plazmi, ona u konačnici ne dovodi uvijek do krajnjeg negativnog ishoda, primarno moždanoga udara, već navedeno ovisi o brojnim drugim čimbenicima, što genetskim, što demografskim, što kliničkim i biokemijskim. Iako mnogi opisani polimorfizmi gena za fibrinogen vjerojatno imaju funkcionalni učinak, za to još uvijek nema sigurnih i čvrstih dokaza u literaturi. Je li za njihovu funkcionalnost bitnija interakcija između gena ili interakcija gena i okoliša, tek ostaje za istraživanje. U svakom slučaju, rezultati ovoga istraživanja uklapaju se u skupinu studija koje nisu potvrdile funkcionalnost polimorfizma -455G/A beta-fibrinogena, te u ovoj ispitivanoj populaciji navedeni polimorfizam nije povezan s pojavnošću tromba u aurikuli lijevog atrija, već je isti posljedica nekih drugih prokoagulantnih i proinflamatornih čimbenika aritmije i bolesti vezanih uz nju, koji su ostali nezamijećeni u ovoj opservacijskoj studiji.

## 8.SAŽETAK

### **Povezanost genskoga polimorfizma - 455G/A beta-fibrinogena i pojavnosti tromba u aurikuli lijevog atrija u bolesnika s atrijskom fibrilacijom**

Petra Angebrandt Belošević

Zagreb, 2023.

**Uvod:** Do sada su poznati brojni prediktori tromboze aurikule lijevog atrija, no u tom je području još uvijek mnogo nepoznanica, pogotovo kada je riječ o genetskim prediktorima. Cilj ovoga istraživanja bio je pronaći genski marker koji može biti prediktor tromboze i time poboljšati procjenu tromboembolijskog rizika.

**Metode i ispitanici:** Dizajnirana je opservacijska, unicentrična, retrospektivna studija koja je uključila ukupno 181 bolesnika s atrijskom fibrilacijom. Primarni ishod istraživanja bio je detekcija tromba u aurikuli lijevoga atrija, a svim bolesnicima rađena je genska analiza na - 455 G/A polimorfizam gena za  $\beta$  lanac fibrinogena.

**Rezultati:** Nakon provedene metode uparivanja prema vjerojatnosti sklonosti dviju skupina bolesnika, niti jedna ispitivana varijabla, uključujući polimorfizam - 455 G/A beta-fibrinogena, nije se pokazala neovisnim prediktorom tromboze aurikule lijevog atrija.

**Rasprava:** Rezultati istraživanja u skladu su s do sada objavljenim studijama, gdje još uvijek postoji nesklad u rezultatima te su neka istraživanja pronašla povezanost - 455 G/A polimorfizma s trombogenezom, dok pak neka druga istraživanja nisu pronašla funkcionalnu vezu.

**Zaključak:** Rezultati upućuju na to da tromboza aurikule lijevoga atrija nije neovisno povezana sa - 455 G/A polimorfizmom za  $\beta$  lanac fibrinogena te je vjerojatno posljedica interakcije između gena, te gena i okoliša. No za dokazivanje navedenoga bit će nužna daljnja istraživanja.

## 9.SUMMARY

### **The association of beta-fibrinogen – 455G/A gene polymorphism with left atrial thrombus in patient with atrial fibrillation**

Petra Angebrandt Belošević

Zagreb, 2023.

**Introduction:** There are many predictors of left atrial appendage thrombosis, but still there are many unknown facts, particularly in the area of genetic predictors. Purpose of this study was to find genetic predictor of thrombosis and to enhance evaluation of thromboembolic risk.

**Methods:** We conducted an observational, retrospective, unicentric study involving 181 patients with AF. Primary outcome of this study was to detect thrombus in left atrial appendage and all patients were scheduled for genetic analysis for - 455G/A  $\beta$  fibrinogen polymorphism.

**Results:** After performing propensity score matching method, none of tested parameters, including - 455G/A polymorphism, were not independent predictors of left atrial appendage thrombosis.

**Discussion:** This results are consistent with the results from many other studies in this field, where some studies have found functional relationship between thrombosis and - 455G/A polymorphism, but still many other studies have not found the same interaction.

**Conclusion:** Results showed that left atrial appendage thrombosis is not independently related with - 455G/A polymorphism for  $\beta$  chain of fibrinogen. It's probably consequence of interactions between genes, and genes and environment. However, to confirm such statement we need to conduct more research in the future.

## 11.LITERATURA

1. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, i sur.ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2021 Feb 1;42(5):373-498.
2. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011;121(8):2955–68.
3. Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):204-16.
4. Goette A, Lendeckel U, Klein HU. Signal transduction systems and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):247-58.
5. Bosch RF, Nattel S. Cellular electrophysiology of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):259-69.
6. van der Velden HM, Jongsma HJ. Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):270-9.
7. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, i sur.Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998 Sep 3;339(10):659-66.
8. de Bakker JM, Ho SY, Hocini M. Basic and clinical electrophysiology of pulmonary vein ectopy. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):287-94.
9. Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):315-24.
10. Shimizu A, Centurion OA. Electrophysiological properties of the human atrium in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):302-14.
11. Kurita Y, Mitamura H, Shiroshita-Takeshita A, Yamane A, Ieda M, Kinebuchi O, i sur.Daily oral verapamil before but not after rapid atrial excitation prevents electrical remodeling. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):447-55.
12. Shinagawa K, Mitamura H, Ogawa S, Nattel S. Effects of inhibiting Na(+)/H(+)-exchange or angiotensin converting enzyme on atrial tachycardia-induced remodeling. *Cardiovasc Res*. 2002 May;54(2):438-46.

13. Chung MK, Refaat M, Shen WK, Kutuyifa V, Cha YM, Di Biase L, i sur. ACC Electrophysiology Section Leadership Council. Atrial Fibrillation: JACC Council Perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Apr 14;75(14):1689-1713.
14. Benjamin EJ, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA, Levy D. Left atrial size and the risk of stroke and death. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1995;92: 835 –41.
15. Barnes ME, Miyasaka Y, Seward JB, Gersh BJ, Rosales AG, Bailey KR i sur. Left atrial volume in the prediction of first ischemic stroke in an elderly cohort without atrial fibrillation. *Mayo Clin Proc* 2004;79:1008 –14.
16. Flaker GC, Fletcher KA, Rothbart RM, Halperin JL, Hart RG. Clinical and echocar\_diographic features of intermittent atrial fibrillation that predict recurrent atrial fibrillation. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation (SPAF) Investigators. *Am J Car\_diol* 1995;76:355 –8.
17. Lip GY, Clementy N, Pericart L, Banerjee A, Fauchier L. Stroke and major bleeding risk in elderly patients aged  $\geq 75$  years with atrial fibrillation: the Loire Valley Atrial Fibrillation Project. *Stroke* 2015;46:143-50.
18. Fauchier L, Clementy N, Bisson A, Ivanes F, Angoulvant D, Babuty D, Lip GY. Should atrial fibrillation patients with only 1 nongender-related CHA2DS2- VASc risk factor be anticoagulated? *Stroke* 2016;47:1831-1836.
19. Killu AM, Granger CB, Gersh BJ. Risk stratification for stroke in atrial fibrillation: a critique. *Eur Heart J* 2019;40:1294-1302.
20. Chao TF, Liao JN, Tuan TC, Lin YJ, Chang SL, Lo LW, i sur. Incident comorbidities in patients with atrial fibrillation initially with a CHA2DS2-VASc score of 0 (males) or 1 (females): implications for reassessment of stroke risk in initially 'low-risk' patients. *Thromb Haemost* 2019;119:1162-1170.
21. Bassand JP, Accetta G, Al Mahmeed W, Corbalan R, Eikelboom J, Fitzmaurice DA, i sur. Risk factors for death, stroke, and bleeding in 28,628 patients from the GARFIELD-AF registry: Rationale for comprehensive management of atrial fibrillation. *PLoS One*. 2018 Jan 25;13(1):e0191592.
22. Friberg L, Benson L, Lip GY. Balancing stroke and bleeding risks in patients with atrial fibrillation and renal failure: the Swedish Atrial Fibrillation Cohort study. *Eur Heart J* 2015;36:297-306.
23. Atrial Fibrillation Investigators. Echocardiographic predictors of stroke in patients with atrial fibrillation: a prospective study of 1066 patients from 3 clinical trials. *Arch Intern Med*. 1998 Jun 22;158(12):1316-20.
24. Hijazi Z, Oldgren J, Siegbahn A, Wallentin L. Application of biomarkers for risk stratification in patients with atrial fibrillation. *Clin Chem* 2017;63:152-164.

25. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2007;146:857-867.
26. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:883-891.
27. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-1151.
28. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2013;369:2093-2104.
29. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-992.
30. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014;383:955-962.
31. Holmes DR Jr, Kar S, Price MJ, Whisenant B, Sievert H, Doshi SK, et al. Prospective randomized evaluation of the Watchman left atrial appendage closure device in patients with atrial fibrillation versus long-term warfarin therapy: the PREVAIL trial. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:1-12.
32. Mant J, Hobbs FD, Fletcher K, Roalfe A, Fitzmaurice D, Lip GY, et al. Warfarin versus aspirin for stroke prevention in an elderly community population with atrial fibrillation (the Birmingham Atrial Fibrillation Treatment of the Aged Study, BAFTA): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:493-503.
33. Heijman J, Hohnloser SH, Camm AJ. Antiarrhythmic drugs for atrial fibrillation: lessons from the past and opportunities for the future. *Europace*. 2021 Apr 10;23(23 Suppl 2):ii14-ii22.
34. Kirchhof P, Monnig G, Wasmer K, Heinecke A, Breithardt G, Eckardt L, et al. A trial of self-adhesive patch electrodes and hand-held paddle electrodes for external cardioversion of atrial fibrillation (MOBIPAPA). *Eur Heart J* 2005;26:1292-1297.
35. Lei M, Wu L, Terrar DA, Huang CL. Modernized Classification of Cardiac Antiarrhythmic Drugs. *Circulation*. 2018 Oct 23;138(17):1879-1896.

36. Marrouche NF, Brachmann J, Andresen D, Siebels J, Boersma L, Jordaens L, et al. Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure. *N Engl J Med*. 2018 Feb 1;378(5):417-427.
37. Zabalgoitia M, Halperin JL, Pearce LA, Blackshear JL, Asinger RW, Hart RG. Transesophageal echocardiographic correlates of clinical risk of thromboembolism in nonvalvular atrial fibrillation. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Jun;31(7):1622-6.
38. Transesophageal echocardiographic correlates of thromboembolism in high-risk patients with nonvalvular atrial fibrillation. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators Committee on Echocardiography. *Ann Intern Med*. 1998 Apr 15;128(8):639-47.
39. Black IW, Chesterman CN, Hopkins AP, Lee LC, Chong BH, Walsh WF. Hematologic correlates of left atrial spontaneous echo contrast and thromboembolism in nonvalvular atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Feb;21(2):451-7.
40. Manning WJ, Silverman DI, Keighley CS, Oettgen P, Douglas PS. Transesophageal echocardiographically facilitated early cardioversion from atrial fibrillation using short-term anticoagulation: final results of a prospective 4.5-year study. *J Am Coll Cardiol*. 1995 May;25(6):1354-61.
41. Fatkin D, Loupas T, Low J, Feneley M. Inhibition of red cell aggregation prevents spontaneous echocardiographic contrast formation in human blood. *Circulation*. 1997 Aug 5;96(3):889-96.
42. Fatkin D, Kelly RP, Feneley MP. Relations between left atrial appendage blood flow velocity, spontaneous echocardiographic contrast and thromboembolic risk in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Mar 15;23(4):961-9.
43. Puwanant S, Varr BC, Shrestha K, Hussain SK, Tang WH, Gabriel RS, et al. Role of the CHADS2 score in the evaluation of thromboembolic risk in patients with atrial fibrillation undergoing transesophageal echocardiography before pulmonary vein isolation. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 24;54(22):2032-9.
44. Shively BK, Gelgand EA, Crawford MH. Regional left atrial stasis during atrial fibrillation and flutter: determinants and relation to stroke. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Jun;27(7):1722-9.
45. Srimannarayana J, Varma RS, Satheesh S, Anilkumar R, Balachander J. Prevalence of left atrial thrombus in rheumatic mitral stenosis with atrial fibrillation and its response to anticoagulation: a transesophageal echocardiographic study. *Indian Heart J*. 2003 Jul-Aug;55(4):358-61.



46. Manning WJ, Silverman DI, Waksmonski CA, Oettgen P, Douglas PS. Prevalence of residual left atrial thrombi among patients with acute thromboembolism and newly recognized atrial fibrillation. *Arch Intern Med.* 1995 Nov 13;155(20):2193-8.
47. Ayirala S, Kumar S, O'Sullivan DM, Silverman DI. Echocardiographic predictors of left atrial appendage thrombus formation. *J Am Soc Echocardiogr.* 2011 May;24(5):499-505.
48. Manning WJ, Weintraub RM, Waksmonski CA, Haering JM, Rooney PS, Maslow AD, et al. Accuracy of transesophageal echocardiography for identifying left atrial thrombi. A prospective, intraoperative study. *Ann Intern Med.* 1995 Dec 1;123(11):817-22.
49. Berger M, Schweitzer P. Timing of thromboembolic events after electrical cardioversion of atrial fibrillation or flutter: a retrospective analysis. *Am J Cardiol.* 1998 Dec 15;82(12):1545-7, A8.
50. Kinch JW, Davidoff R. Prevention of embolic events after cardioversion of atrial fibrillation. Current and evolving strategies. *Arch Intern Med.* 1995 Jul 10;155(13):1353-60.
51. Stoddard MF, Dawkins PR, Prince CR, Longaker RA. Transesophageal echocardiographic guidance of cardioversion in patients with atrial fibrillation. *Am Heart J.* 1995 Jun;129(6):1204-15.
52. Josephson RA. Exclusion of atrial thrombus by transesophageal echocardiography does not preclude embolism after cardioversion of atrial fibrillation. *Circulation.* 1994 Dec;90(6):3122.
53. Israel CW, Grönefeld G, Ehrlich JR, Li YG, Hohnloser SH. Long-term risk of recurrent atrial fibrillation as documented by an implantable monitoring device: implications for optimal patient care. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jan 7;43(1):47-52.
54. Tejan-Sie SA, Murray RD, Black IW, Jasper SE, Apperson-Hansen C, Li J, et al. Spontaneous conversion of patients with atrial fibrillation scheduled for electrical cardioversion: an ACUTE trial ancillary study. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Nov 5;42(9):1638-43.
55. Ezekowitz MD, Nagarakanti R, Noack H, Brueckmann M, Litherland C, Jacobs M, et al. Comparison of Dabigatran and Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Disease: The RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulant Therapy). *Circulation.* 2016 Aug 23;134(8):589-98.

56. Flaker G, Lopes RD, Al-Khatib SM, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Tinga B, *et al*. Efficacy and safety of apixaban in patients after cardioversion for atrial fibrillation: insights from the ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation). *J Am Coll Cardiol*. 2014 Mar 25;63(11):1082-7.
57. Cappato R, Ezekowitz MD, Klein AL, Camm AJ, Ma CS, Le Heuzey JY, *et al*. Rivaroxaban vs. vitamin K antagonists for cardioversion in atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2014 Dec 14;35(47):3346-55.
58. Klein AL, Murray RD, Grimm RA. Role of transesophageal echocardiography-guided cardioversion of patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Mar 1;37(3):691-704.
59. Weigner MJ, Caulfield TA, Danias PG, Silverman DI, Manning WJ. Risk for clinical thromboembolism associated with conversion to sinus rhythm in patients with atrial fibrillation lasting less than 48 hours. *Ann Intern Med*. 1997 Apr 15;126(8):615-20.
60. Van Gelder IC, Healey JS, Crijns HJGM, Wang J, Hohnloser SH, Gold MR, *et al*. Duration of device-detected subclinical atrial fibrillation and occurrence of stroke in ASSERT. *Eur Heart J*. 2017 May 1;38(17):1339-1344.
61. Airaksinen KE, Grönberg T, Nuotio I, Nikkinen M, Ylitalo A, Biancari F, *et al*. Thromboembolic complications after cardioversion of acute atrial fibrillation: the FinCV (Finnish CardioVersion) study. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Sep 24;62(13):1187-92.
62. Chung I, Lip GY. Virchow's triad revisited: blood constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):449-54.
63. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol*. 2008 Oct;143(2):180-90.
64. Sohara H, Amitani S, Kurose M, Miyahara K. Atrial fibrillation activates platelets and coagulation in a time-dependent manner: a study in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Jan;29(1):106-12.
65. Loh E, Sutton MS, Wun CC, Rouleau JL, Flaker GC, Gottlieb SS, *et al*. Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1997 Jan 23;336(4):251-7.
66. Lip GY, Lowe GD, Metcalfe MJ, Rumley A, Dunn FG. Effects of warfarin therapy on plasma fibrinogen, von Willebrand factor, and fibrin D-dimer in left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease with and without aneurysms. *Am J Cardiol*. 1995 Sep 1;76(7):453-8.

67. Chung I, Lip GY. Platelets and heart failure. *Eur Heart J*. 2006 Nov;27(22):2623-31.
68. Lip GY, Beevers DG. Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension. *J Hum Hypertens*. 1994 Sep;8(9):693-702.
69. Wolf PA, Dawber TR, Thomas HE Jr, Kannel WB. Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham study. *Neurology*. 1978 Oct;28(10):973-7.
70. Lip GY. Intracardiac thrombus formation in cardiac impairment: the role of anticoagulant therapy. *Postgrad Med J*. 1996 Dec;72(854):731-8.
71. Mondillo S, Sabatini L, Agricola E, Ammaturo T, Guerrini F, Barbati R, et al. Correlation between left atrial size, prothrombotic state and markers of endothelial dysfunction in patients with lone chronic nonrheumatic atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2000 Sep 15;75(2-3):227-32.
72. Feng D, D'Agostino RB, Silbershatz H, Lipinska I, Massaro J, Levy D, et al. Hemostatic state and atrial fibrillation (the Framingham Offspring Study). *Am J Cardiol*. 2001 Jan 15;87(2):168-71.
73. Gustafsson C, Blombäck M, Britton M, Hamsten A, Svensson J. Coagulation factors and the increased risk of stroke in nonvalvular atrial fibrillation. *Stroke*. 1990 Jan;21(1):47-51.
74. Lip GY, Lowe GD, Rumley A, Dunn FG. Increased markers of thrombogenesis in chronic atrial fibrillation: effects of warfarin treatment. *Br Heart J*. 1995 Jun;73(6):527-33.
75. Ding WY, Gupta D, Lip GYH. Atrial fibrillation and the prothrombotic state: revisiting Virchow's triad in 2020. *Heart*. 2020 Oct;106(19):1463-1468.
76. Marín F, Roldán V, Climent V, Garcia A, Marco P, Lip GY. Is thrombogenesis in atrial fibrillation related to matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1? *Stroke*. 2003 May;34(5):1181-6.
77. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest*. 1997 Jul 15;100(2):350-6.
78. Boos CJ, Anderson RA, Lip GY. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J*. 2006 Jan;27(2):136-49.
79. Conway DS, Buggins P, Hughes E, Lip GY. Relationship of interleukin-6 and C-reactive protein to the prothrombotic state in chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 2;43(11):2075-82.
80. Lip GY. Stroke and bleeding risk assessment in atrial fibrillation: when, how, and why? *Eur Heart J*. 2013 Apr;34(14):1041-9.

81. Medved L, Weisel JW; Fibrinogen and Factor XIII Subcommittee of Scientific Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost.* 2009 Feb;7(2):355-9.
82. Martinez J. Congenital dysfibrinogenemia. *Curr Opin Hematol.* 1997 Sep;4(5):357-65.
83. Chernysh IN, Weisel JW. Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization. *Blood.* 2008 May 15;111(10):4854-61.
84. Ajjan R, Lim BC, Standeven KF, Harrand R, Dolling S, Phoenix F, i sur. Common variation in the C-terminal region of the fibrinogen beta-chain: effects on fibrin structure, fibrinolysis and clot rigidity. *Blood.* 2008 Jan 15;111(2):643-50.
85. Haverkate F, Samama M. Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost.* 1995 Jan;73(1):151-61.
86. Swarowska M, Polczak A, Pera J, Klimkowicz-Mrowiec A, Slowik A, Dziedzic T. Hyperfibrinogenemia predicts long-term risk of death after ischemic stroke. *J Thromb Thrombolysis.* 2014 Nov;38(4):517-21.
87. Rothwell PM, Howard SC, Power DA, Gutnikov SA, Algra A, van Gijn J, i sur. Fibrinogen concentration and risk of ischemic stroke and acute coronary events in 5113 patients with transient ischemic attack and minor ischemic stroke. *Stroke.* 2004 Oct;35(10):2300-5.
88. Fibrinogen Studies Collaboration, Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, i sur. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA.* 2005 Oct 12;294(14):1799-809.
89. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation.* 1997 Dec 16;96(12):4204-10.
90. Bruno G, Merletti F, Biggeri A, Bargero G, Ferrero S, Pagano G, i sur. Fibrinogen and AER are major independent predictors of 11-year cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. *Diabetologia.* 2005 Mar;48(3):427-34.
91. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, i sur. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *J Intern Med.* 2003 Aug;254(2):132-9.

92. Feero WG, Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--an updated primer. *N Engl J Med*. 2010 May 27;362(21):2001-11.
93. Malats N, Calafell F. Basic glossary on genetic epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. 2003 Jul;57(7):480-2.
94. Floreani A, Molaro M, Mottes M, Sangalli A, Baragiotta A, Roda A, i sur. Autosomal dominant benign recurrent intrahepatic cholestasis (BRIC) unlinked to 18q21 and 2q24. *Am J Med Genet*. 2000 Dec 18;95(5):450-3.
95. van Mil SW, Klomp LW, Bull LN, Houwen RH. FIC1 disease: a spectrum of intrahepatic cholestatic disorders. *Semin Liver Dis*. 2001 Nov;21(4):535-44.
96. Albert PR. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *J Psychiatry Neurosci*. 2011 Nov;36(6):363-5.
97. Dean M. Resolving DNA mutations. *Nat Genet*. 1995 Feb;9(2):103-4.
98. Zito F, Di Castelnuovo A, D'Orazio A, Negrini R, De Lucia D, Donati MB, i sur. Helicobacter pylori infection and the risk of myocardial infarction: role of fibrinogen and its genetic control. *Thromb Haemost*. 1999 Jul;82(1):14-8.
99. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):216-29.
100. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM. Intracellular assembly of human fibrinogen. *J Biol Chem*. 1983 Nov 25;258(22):13407-10.
101. Verschuur M, de Jong M, Felida L, de Maat MP, Vos HL. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen beta promoter is important for interleukin 6-induced expression, and its activity is influenced by the adjacent -148C/T polymorphism. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):16763-71.
102. Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, Katz N, Weiss T, Tillmanns H, i sur. Positive association of the beta fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1997 Jun;77(6):1120-6.
103. van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Dec;19(12):3063-70.
104. Montgomery HE, Clarkson P, Nwose OM, Mikailidis DP, Jagroop IA, Dollery C, i sur. The acute rise in plasma fibrinogen concentration with exercise is influenced by the G-453-A polymorphism of the beta-fibrinogen gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Mar;16(3):386-91.

105. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):3034-9.
106. Furie KL, Goldstein LB, Albers GW, Khatri P, Neyens R, Turakhia MP, i sur. Oral antithrombotic agents for the prevention of stroke in nonvalvular atrial fibrillation: a science advisory for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2012 Dec;43(12):3442-53.
107. Wang Y, Di Biase L, Horton RP, Nguyen T, Morhanty P, Natale A. Left atrial appendage studied by computed tomography to help planning for appendage closure device placement. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2010 Sep;21(9):973-82.
108. Kimura T, Takatsuki S, Inagawa K, Katsumata Y, Nishiyama T, Nishiyama N, i sur. Anatomical characteristics of the left atrial appendage in cardiogenic stroke with low CHADS2 scores. *Heart Rhythm*. 2013 Jun;10(6):921-5.
109. Chen J, Zhou M, Wang H, Zheng Z, Rong W, He B, i sur. Risk factors for left atrial thrombus or spontaneous echo contrast in non-valvular atrial fibrillation patients with low CHA2DS2-VASc score. *J Thromb Thrombolysis*. 2022 Feb;53(2):523-531.
110. Han D, Chu Y, Wu Y, Wang X. Determinants of left atrial thrombus or spontaneous echo contrast in nonvalvular atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2020 Nov;195:233-237.
111. Lin WD, Xue YM, Liu FZ, Fang XH, Zhan XZ, Liao HT, Tse G, Wu SL. Left atrial enlargement and non-paroxysmal atrial fibrillation as risk factors for left atrial thrombus/spontaneous Echo contrast in patients with atrial fibrillation and low CHA2DS2-VASc score. *J Geriatr Cardiol*. 2020 Mar;17(3):155-159.
112. Osawa K, Nakanishi R, Ceponiene I, Nezarat N, French WJ, Budoff MJ. Predicting Left Atrial Appendage Thrombus from Left Atrial Volume and Confirmation by Computed Tomography with Delayed Enhancement. *Tex Heart Inst J*. 2020 Apr 1;47(2):78-85.
113. Chelu MG, King JB, Kholmovski EG, Ma J, Gal P, Marashly Q, i sur. Atrial Fibrosis by Late Gadolinium Enhancement Magnetic Resonance Imaging and Catheter Ablation of Atrial Fibrillation: 5-Year Follow-Up Data. *J Am Heart Assoc*. 2018 Dec 4;7(23):e006313.
114. Echocardiographic predictors of stroke in patients with atrial fibrillation: a prospective study of 1066 patients from 3 clinical trials. *Arch Intern Med*. 1998 Jun 22;158(12):1316-20.

115. Uziębło-Życzkowska B, Krzesiński P, Jurek A, Kapłon-Cieślicka A, Gorczyca I, Budnik M, i sur. Left Ventricular Ejection Fraction Is Associated with the Risk of Thrombus in the Left Atrial Appendage in Patients with Atrial Fibrillation. *Cardiovasc Ther.* 2020 Apr 24;2020:3501749.
116. Dries DL, Rosenberg YD, Waclawiw MA, Domanski MJ. Ejection fraction and risk of thromboembolic events in patients with systolic dysfunction and sinus rhythm: evidence for gender differences in the studies of left ventricular dysfunction trials. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Apr;29(5):1074-80.
117. Lip GY, Gibbs CR. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Apr;33(5):1424-6.
118. Angebrandt Belošević P, Šmalcelj A, Kos N, Kordić K, Golubić K. Left Ventricular Ejection Fraction Can Predict Atrial Thrombosis Even in Non-High-Risk Individuals with Atrial Fibrillation. *J Clin Med.* 2022 Jul 7;11(14):3965.
119. Diaz-Arocutipa C, Gonzales-Luna AC, Brañez-Condorena A, Hernandez AV. Diagnostic accuracy of D-dimer to detect left atrial thrombus in patients with atrial fibrillation: A systematic review and meta-analysis. *Heart Rhythm.* 2021 Dec;18(12):2128-2136.
120. Lin C, Bao Y, Hua W, Zhang N, Jin Q, Xie Y, i sur. Differences in D-dimer blood concentration in atrial fibrillation patients with left atrial thrombus or severe left atrial spontaneous echo contrast. *J Interv Card Electrophysiol.* 2022 Aug;64(2):341-347.
121. Cianfrocca C, Loricchio ML, Pelliccia F, Pasceri V, Auriti A, Bianconi L, i sur. C-reactive protein and left atrial appendage velocity are independent determinants of the risk of thrombogenesis in patients with atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2010 Jun 25;142(1):22-8.
122. Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Gurney D, Lip GY. Plasma von Willebrand factor, fibrinogen and soluble P-selectin levels in paroxysmal, persistent and permanent atrial fibrillation. Effects of cardioversion and return of left atrial function. *Eur Heart J.* 2001 Sep;22(18):1741-7.
123. Kapłon-Cieślicka A, Budnik M, Gawałko M, Peller M, Gorczyca I, Michalska A, i sur. Atrial fibrillation type and renal dysfunction as important predictors of left atrial thrombus. *Heart.* 2019 Sep;105(17):1310-1315.
124. Nguyen HT, Nguyen HVB, Nguyen HQ, Le HQ. Prevalence of left atrial appendage thrombus in patients with acute ischaemic stroke and sinus rhythm: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2021 Dec 17;11(12):e051563.

125. Martiskainen M, Oksala N, Pohjasvaara T, Kaste M, Oksala A, Karhunen PJ, i sur. Beta-fibrinogen gene promoter A -455 allele associated with poor longterm survival among 55-71 years old Caucasian women in Finnish stroke cohort. *BMC Neurol.* 2014 Jun 22;14:137.
126. Hu X, Wang J, Li Y, Wu J, Qiao S, Xu S, i sur. The  $\beta$ -fibrinogen gene 455G/A polymorphism associated with cardioembolic stroke in atrial fibrillation with low CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VaSc score. *Sci Rep.* 2017 Dec 13;7(1):17517.
127. Lee SH, Kim MK, Park MS, Choi SM, Kim JT, Kim BC, i sur. Beta-fibrinogen Gene -455 G/A Polymorphism in Korean Ischemic Stroke Patients. *J Clin Neurol.* 2008 Mar;4(1):17-22.
128. Lam KS, Ma OC, Wat NM, Chan LC, Janus ED. Beta-fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 1999 Oct;42(10):1250-3.
129. Bozdemir V, Kirimli O, Akdeniz B, Ulgenalp A, Aslan A, Kala V, i sur. The association of beta-fibrinogen 455 G/A gene polymorphism with left atrial thrombus and severe spontaneous echo contrast in atrial fibrillation. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2010 Jun;10(3):209-15.
130. David W. Hosmer Jr., Stanley Lemeshow, Rodney X. Sturdivant. *Applied Logistic Regression.* John Wiley & Sons, Inc.;2013. DOI:10.1002/9781118548387
131. Martiskainen M, Oksala N, Pohjasvaara T, Kaste M, Oksala A, Karhunen PJ, i sur. Beta-fibrinogen gene promoter A -455 allele associated with poor longterm survival among 55-71 years old Caucasian women in Finnish stroke cohort. *BMC Neurol.* 2014 Jun 22;14:137.
132. Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Stadlmüller J, Walther R, i sur. The apolipoprotein E and beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):2880-4.
133. Nishiuma S, Kario K, Yakushijin K, Maeda M, Murai R, Matsuo T, i sur. Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998 Jun;9(4):373-9.
134. Chen XC, Xu MT, Zhou W, Han CL, Chen WQ. A meta-analysis of beta-fibrinogen gene-455G/A polymorphism and plasma fibrinogen level in Chinese cerebral infarction patients. *Biomed Environ Sci.* 2007 Oct;20(5):366-72.



135. Gu L, Wu G, Su L, Yan Y, Long J, Tan J, et al. Genetic polymorphism of  $\beta$ -fibrinogen gene-455G/A can contribute to the risk of ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2014 Feb;35(2):151-61.
136. Xu X, Li J, Sheng W, Liu L. Meta-analysis of genetic studies from journals published in China of ischemic stroke in the Han Chinese population. *Cerebrovasc Dis*. 2008;26(1):48-62.
137. Luo H, Li X, Jiang A, Zhang B, Bi P, Dong Y, Guo Y. Associations of  $\beta$ -Fibrinogen Polymorphisms with the Risk of Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019 Feb;28(2):243-250.
138. Brown ET, Fuller GM. Detection of a complex that associates with the Bbeta fibrinogen G-455-A polymorphism. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3286-93.
139. Siegerink B, Rosendaal FR, Algra A. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2009 Mar;7(3):385-90.
140. Albert MA, Pare G, Morris A, Rose L, Buring J, Ridker PM, Zee RY. Candidate genetic variants in the fibrinogen, methylenetetrahydrofolate reductase, and intercellular adhesion molecule-1 genes and plasma levels of fibrinogen, homocysteine, and intercellular adhesion molecule-1 among various race/ethnic groups: data from the Women's Genome Health Study. *Am Heart J*. 2009 Apr;157(4):777-83.e1.
141. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*. 1996 Nov;19(11):1265-8.
142. Swarowska M, Polczak A, Pera J, Klimkowicz-Mrowiec A, Slowik A, Dziedzic T. Hyperfibrinogenemia predicts long-term risk of death after ischemic stroke. *J Thromb Thrombolysis*. 2014 Nov;38(4):517-21.
143. Lam KS, Ma OC, Wat NM, Chan LC, Janus ED. Beta-fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 1999 Oct;42(10):1250-3.
144. Morozumi T, Sharma A, De Nardin E. The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the beta-fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms. *Immunol Invest*. 2009;38(3-4):311-23.

145. Jacquemin B, Antoniadou C, Nyberg F, Plana E, Müller M, Greven S, et al. Common genetic polymorphisms and haplotypes of fibrinogen alpha, beta, and gamma chains affect fibrinogen levels and the response to proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors: the AIRGENE study. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Sep 9;52(11):941-52.
146. Cook DG, Cappuccio FP, Atkinson RW, Wicks PD, Chitolie A, Nakandakare ER, et al. Ethnic differences in fibrinogen levels: the role of environmental factors and the beta-fibrinogen gene. *Am J Epidemiol*. 2001 Apr 15;153(8):799-806.
147. de Maat MP. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:509-21.
148. Hermida RC, Calvo C, Ayala DE, López JE, Fernández JR, Mojón A, et al. Variación estacional del fibrinógeno plasmático en pacientes dippers y no dippers con hipertensión arterial esencial ligera-moderada [Seasonal variation in plasma fibrinogen in dipper and non-dipper patients with mild-moderate essential hypertension]. *Med Clin (Barc)*. 2003 Jun 7;121(1):6-11. Spanish.

## 11. ŽIVOTOPIS

Petra Angebrandt Belošević rođena je 30. srpnja 1985. godine u Đakovu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Godine 2010. upisala se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te je 5. srpnja 2010. diplomirala s odličnim uspjehom. Od 2005. godine do kraja studija bila je članica CroMSIC-a (Hrvatska udruga studenata medicine) i sudjelovala u brojnim aktivnostima, posebno u studentskim razmjenama. Tako je od 2. do 26. rujna 2008. godine sudjelovala u Znanstveno-istraživačkoj studentskoj razmjeni u Bonnu, u Njemačkoj. Na toj razmjeni stekla je iskustvo rada u laboratoriju, uzimanja uzoraka krvi, rada u sterilnim uvjetima, kao i kliničko iskustvo u radu s bolesnicima. Dobitnica je Dekanove nagrade za najbolju studenticu šeste godine studija, a tijekom studija druge godine bila je demonstrator na Kliničkoj propedeutici. Od 4. listopada 2010. godine zaposlena je u KBC-u Zagreb kao liječnik stažist te je 26. listopada 2011. položila stručni ispit za doktora medicine. U listopadu 2011. godine upisala se na Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a u siječnju 2017. uspješno obranila temu doktorske disertacije.

Od listopada 2011. radila je kao liječnik volonter na Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb, sve do lipnja 2013. godine kada je dobila specijalizaciju iz kardiologije, a 18. siječnja 2019. godine uspješno je položila specijalistički ispit te stekla zvanje specijalista kardiologa.

Tijekom specijalističkog usavršavanja sudjelovala je kao istraživač u kliničkoj studiji SIGNIFY, u Europskoj studiji prevencije kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (EUROASPIRE IV) te u kliničkoj studiji ODYSSEY.

Autor je i koautor dvaju znanstvenih radova, devet stručnih i kongresnih sažetaka te je nekoliko puta aktivno sudjelovala s usmenim i poster-predavanjima na domaćim i međunarodnim skupovima.

Područja njezina stručnog interesa jesu interna medicina, kardiologija, liječenje srčanih aritmija i srčanog zatajivanja te ehokardiografija.

Od 2006. godine članica je međunarodne humanitarne organizacije The International Association of Lions clubs. Brojnim humanitarnim aktivnostima pridonijela je boljitku zajednice u kojoj živi, a dužnostima koje je obnašala u toj organizaciji stekla je vještine u organizaciji i komunikaciji. Sudjelovala je i u tri međunarodna kampa mladih te je bila organizator kampa mladih u Hrvatskoj. Tijekom tih putovanja i aktivnosti stekla je mnogobrojna iskustva i prijateljstva, promovirala svoju zemlju i kulturu te postigla tečnu razinu govora engleskog i njemačkog jezika. Položila je ispit Cambridge ESOL i stekla međunarodnu diplomu znanja engleskog jezika na razini B2, pohađala tečajeve njemačkog jezika s razinom znanja B1.1 te francuskog jezika s razinom znanja A1.1.

Udana je i majka je jednog sina.