Polimorfizmi gena NR3C1, NR3C2 i FKBP5 u populaciji hrvatskih maturanata

Bebić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:704423

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

POLIMORFIZMI GENA *NR3C1*, *NR3C2* I *FKBP5* U POPULACIJI HRVATSKIH MATURANATA

DIPLOMSKI RAD

SARA BEBIĆ

Matični broj: 45

Split, listopad 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

POLIMORFIZMI GENA *NR3C1*, *NR3C2* I *FKBP5* U POPULACIJI HRVATSKIH MATURANATA

DIPLOMSKI RAD

SARA BEBIĆ

Matični broj: 45

Split, listopad 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

POLYMORPHISMS OF *NR3C1*, *NR3C2* AND *FKBP5* GENES IN THE CROATIAN SECONDARY SCHOOL STUDENTS

DIPLOMA THESIS

SARA BEBIĆ

Parent number: 45

Split, October 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Kemija
Znanstveno polje: Biokemija i medicinska kemija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta.

Mentor: Prof. dr. sc. Mladen Miloš
Komentor: Prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman

POLIMORFIZMI GENA *NR3C1, NR3C2* I *FKBP5* U POPULACIJI HRVATSKIH MATURANATA

Sara Bebić, 45

Sažetak

U ovom istraživanju analizirana je učestalost alela i genotipova polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNP) i to: rs5522 gena *NR3C2,* rs6189 i rs6190 gena *NR3C1* te rs1360780 gena *FKBP5*. Iz uzorka sline prikupljenih od 400 maturanata iz 26 gimnazija i strukovnih škola iz 4 najveća hrvatska grada: Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka, izolirana je DNA, i amplificirana metodom PCR u realnom vremenu. Nakon provedene genotipizacije za pojedinačne SNP-ove izračunata su odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), za svaki polimorfizam, za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada te za sva tri SNP-a u cjelokupnom uzorku svih ispitanika. Analiza dobivenih rezultata pokazala je da postoji statistička značajna razlika u broju uočenih i očekivanih genotipova u ispitanika s područja Zagreba (P=0,00437) za polimorfizam rs5522, iz Rijeke (P=0,00012) za dvojni polimorfizam rs6189/rs6190 te Osijeka (P=0,0186) za polimorfizam rs1360780, dok u ostalim gradovima nije uočeno odstupanje od HWE ravnoteže. Analizom cjelokupnog broja ispitanika iz Hrvatske (N=400), uočeno je odstupanje za polimorfizam rs1360780 (P=0,025). Dobiveni rezultati potvrđuju da bi se polimorfizam rs1360780 mogao dobro iskoristiti u populacijskim studijama te da bi povećanjem broja ispitanika, najvjerojatnije, nestalo i odstupanje od HWE pa bi rezultati bili sličniji nekim drugim populacijskim istraživanjima.

Ključne riječi: polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780, Hardy-Weinbergov zakona ravnoteže (HWE), maturanti

Rad sadrži: 46 stranica, 11 slika, 8 tablica, 43 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Dr. sc. Franko Burčul, znanstv. sur – član
3. Prof. dr. sc. Mladen Miloš – član-mentor
4. Prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman - član-komentor

Datum obrane: 25. listopada 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of chemistry

Scientific area: Chemistry
Scientific field: Biochemistry and medical chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

Supervisor: Mladen Miloš, PhD, Full Professor
Co-supervisor: Irena Drmić Hofman, PhD, Full Professor

POLYMORPHISMS OF *NR3C1, NR3C2* AND *FKBP5* GENES IN THE CROATIAN SECONDARY SCHOOL STUDENTS

Sara Bebić, 45

Abstract

In this study, we analyzed the genotyping of single nucleotide polymorphism (SNP), as follows: rs5522 from the gene *NR3C2*, rs6189 and rs6190 from the gene *NR3C1* and rs1360780 from the gene *FKBP5*. DNA was isolated from saliva samples collected from 400 Croatian upper high school seniors from 26 high schools from four largest cities in Croatia: Zagreb, Split, Rijeka and Osijek. Amplification was performed by real time-PCR. After the conducted genotyping we obtained alleles and genotypes for individual SNPs and we calculated deviations from Hardy-Weinberg law of equilibrium (HWE), for each polymorphism, for each group of subjects and for all three SNPs in the overall sample. Statistically significant difference in the number of observed and expected genotypes was found in the population sample from Zagreb (P=0,00437) for rs5522, from Rijeka (P=0,00012) for a double polymorphism rs6189/rs6190 and Osijek (P=0,01861) for rs1360780p, while in other cities deviations from HWE were not observed. In the analysis of the overall sample from Croatia (N= 400), deviation from HWE was observed for rs1360780 polymorphism (P=0,025). The results suggest that rs1360780 polymorphism could be useful in population studies and, most likely, by increasing the number of subjects the deviation would perish and the results would be similar to other population studies.

Keywords: single nucleotide polimorfism (SNP), rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), upper high school seniors

Thesis contains: 46 pages, 11 figures, 8 tables, 43 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević - PhD, Associate Professor	chair person
2. Franko Burčulj - PhD, Research Associate	member
3. Mladen Miloš – PhD, Full Professor	supervisor
4. Irena Drmić Hofman – PhD, Full Professor	co-supervisor

Defence date: October 25 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku, Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Drmić Hofman, u razdoblju od lipnja do listopada 2016. godine. Rad je predan na ocjenu Kemijskom odsjeku Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Drmić Hofman na ukazanoj prilici, predloženoj temi, znanstvenim raspravama, savjetima i stručnoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade diplomskog rada.

I mama hvala ti.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolirati DNA iz uzorka sline prikupljenih od 400 maturanata iz 26 gimnazija i strukovnih škola iz 4 najveća hrvatska grada: Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka, pomoću komercijalno dostupnog Danagen saliva kita.
- Genotipizaciju polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNP) i to: rs5522 gena *NR3C2*, rs6189 i rs6190 gena *NR3C1* te rs1360780 gena *FKBP5* analizirati metodom PCR u realnom vremenu na instrumentu ABI Prism 7500. Dobivene rezultate analizirati pomoću pripadajućeg sofware-a v2.3.
- Nakon provedene genotipizacije očitati alele i genotipove za pojedinačne SNP-ove.
- Izračunati odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), pomoću χ^2 testa, za svaki polimorfizam, za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada (Osijek, Rijeka, Split i Zagreb) te za sva tri SNP-a, u cjelokupnom uzorku svih ispitanika.

SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je učestalost alela i genotipova polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNP) i to: rs5522 gena *NR3C2*, rs6189 i rs6190 gena *NR3C1* te rs1360780 gena *FKBP5.*

Iz uzorka sline prikupljenih od 400 maturanata iz 26 gimnazija i strukovnih škola iz 4 najveća hrvatska grada: Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka, izolirana je DNA, i amplificirana metodom PCR u realnom vremenu. Nakon provedene genotipizacije za pojedinačne SNP-ove izračunata su odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), za svaki polimorfizam, za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada te za sva tri SNP-a u cjelokupnom uzorku svih ispitanika.

Analiza dobivenih rezultata pokazala je da postoji statistička značajna razlika u broju uočenih i očekivanih genotipova u ispitanika s područja Zagreba (P=0,00437) za polimorfizam rs5522, iz Rijeke (P=0,00012) za dvojni polimorfizam rs6189/rs6190 te Osijeka (P=0,0186) za polimorfizam rs1360780, dok u ostalim gradovima nije uočeno odstupanje od HWE ravnoteže. Analizom cjelokupnog broja ispitanika iz Hrvatske (N=400), uočeno je odstupanje za polimorfizam rs1360780 (P=0,025).

Dobiveni rezultati potvrđuju da bi se polimorfizam rs1360780 mogao dobro iskoristiti u populacijskim studijama te da bi povećanjem broja ispitanika, najvjerojatnije, nestalo i odstupanje od HWE pa bi rezultati bili sličniji nekim drugim populacijskim istraživanjima.

Ključne riječi: polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780, Hardy-Weinbergov zakona ravnoteže (HWE), maturanti

SUMMARY

In this study, we analyzed the genotyping of single nucleotide polymorphism (SNP), as follows: rs5522 from the gene *NR3C2*, rs6189 and rs6190 from the gene *NR3C1* and rs1360780 from the gene *FKBP5.*

DNA was isolated from saliva samples collected from 400 Croatian upper high school seniors from 26 high schools from four largest cities in Croatia: Zagreb, Split, Rijeka and Osijek. Amplification was performed by real time-PCR. After the conducted genotyping we obtained alleles and genotypes for individual SNPs and we calculated deviations from Hardy-Weinberg law of equilibrium (HWE), for each polymorphism, for each group of subjects and for all three SNPs in the overall sample.

Statistically significant difference in the number of observed and expected genotypes was found in the population sample from Zagreb (P=0,00437) for rs5522, from Rijeka (P=0,00012) for a double polymorphism rs6189/rs6190 and Osijek (P=0,01861) for rs1360780p, while in other cities deviations from HWE were not observed. In the analysis of the overall sample from Croatia (N= 400), deviation from HWE was observed for rs1360780 polymorphism (P=0,025).

The results suggest that rs1360780 polymorphism could be useful in population studies and, most likely, by increasing the number of subjects the deviation would perish and the results would be similar to other population studies.

Keywords: single nucleotide polimorfism (SNP), rs5522, rs6189, rs6190, rs1360780, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), upper high school seniors

SADRŽAJ

UVOD.....1

1. OPĆI DIO.....2

1.1. STRES I STRESNI ODGOVOR.....2

1.1.1. Stres i adolescencija.....3

1.2. HORMONI.....5

1.2.1. Steroidni hormoni.....5

1.2.1.1. Hormoni kore nadbubrežne žlijezde.....7

1.2.1.1.1. Glukokortikoidni hormoni.....7

1.2.1.1.2. Mineralokortikoidni hormoni.....8

1.2.1.1.3. Androgeni hormoni nadbubrežne žlijezde.....9

1.2.1.2. Biosinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde.....9

1.2.1.3. Kortizol.....11

1.2.1.3.1. Unutarstanično djelovanje kortizola.....12

1.2.1.3.2. Regulacija sinteze kortizola i ostalih glukokortikoida.....13

1.3. GENSKA REGULACIJA DJELOVANJA GLUKOKORTIKOIDA

I MINERALOKORTIKOIDA.....15

1.3.1. Mineralokortikoidni receptori.....15

1.3.1.1. Struktura i djelovanje mineralokortikoidnog receptora.....16

1.3.2. Glukokortikoidni receptori.....18

1.3.2.1. Struktura i djelovanje glukokortikoidnog receptora.....18

1.3.3. FK506-vezujući protein 5 (FKBP5).....20

1.3.3.1. Struktura i djelovanje gena *FKBP5*.....20

1.3.3.2. Uloga FKBP5 u regulaciji GR-a i HPA osi.....21

1.3.4. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP).....22

1.3.4.1. Utjecaj SNP-ova na funkciju proteina.....23

1.3.4.2. Polimorfizmi gena *NR3C1*, *NR3C2* i *FKBP5*.....24

1.4. HARDY-WEINBERGOV ZAKON RAVNOTEŽE.....26

2. EKSPERIMENTALNI DIO.....27

2.1. ISPITANICI.....27

2.2. ISPITIVANI POLIMORFIZMI.....27

2.3. METODE ISPITIVANJA.....28

2.3.1. Izolacija DNA iz uzorka sline.....28

2.3.2. Genotipizacija polimorfizama DNA.....30

2.3.3. Statistička obrada rezultata.....30

3. REZULTATI.....31

3.1. UČESTALOST GENOTIPOVA I ALELA ZA ISPITANE POLIMORFIZME.....31

3.2. PROVJERA ODSTUPANJA OD HARDY-WEINBERGOVOG ZAKONA RAVNOTEŽE (HWE) ZA ANALIZIRANE POLIMORFIZME.....33

4. RASPRAVA.....37

5. ZAKLJUČAK.....41

6. LITERATURA.....42

UVOD

Koncentracije kortizola prate snažni dnevni obrazac, u kojem su visoke odmah nakon buđenja, postižu maksimum otprilike pola sata kasnije te se polako smanjuju tijekom ostatka dana. Na ovaj prirodni dnevni ciklus utječu način života i svakodnevni stresori, a on sam utječe na brojne fiziološke sustave koji su temelj za povećan rizik od kroničkih bolesti.[1] Izloženost stresorima predstavlja značajan izvor rizika zdravog razvoja adolescenata, u adolescenciji stresori se proživljavaju različitim intezitetom i trajanjem.[2]

Kada je tijelo izloženo stresoru, aktivira svoj simpatički živčani sustav i hipotalamus-hipofiza-nadbubrežnu os (HPA os).[1] HPA os je jedan od glavnih sustava u tijelu odgovornih za odgovor na stres, povećava prozvodnju hormona stresa, uključujući kortizol, koji se oslobađaju iz kore nabubrežne žlijezde.[1,3] Kortizol se veže za dva tipa receptora, mineralokortikoidne receptore (MR) i glukokortikoidne receptore (GR), koji se nalaze u moždanom tkivu, hipokampusu i dentatnom girusu, gdje zajedno djeluju u odgovoru na razinu kortizola.[1] Smatra se da mineralokortikoidni receptori uglavnom reguliraju početak aktivacije HPA osi, dok glukokortikoidni receptori reguliraju terminaciju aktivnosti.[4]

Većina genetičkih istraživanja do danas bila je usmjerena prema genima povezanim s kortizolom, posebno prema genu za GR (*NR3C1*) i genu za MR (*NR3C2*), koji kodiraju receptore uključene u djelovanje kortizola na mozak.[1] Istraživanja genskih biljega u genima za GR i MR mogla bi pridonijeti potpunijem razumijevanju fiziologije odgovora na psihološke i socijalne stresne poticaje. Novija istraživanja pokazuju da se individualne razlike u fiziološkom odgovoru na stres mogu dovesti u vezu s polimorfizmima gena HPA osi.[5-7]

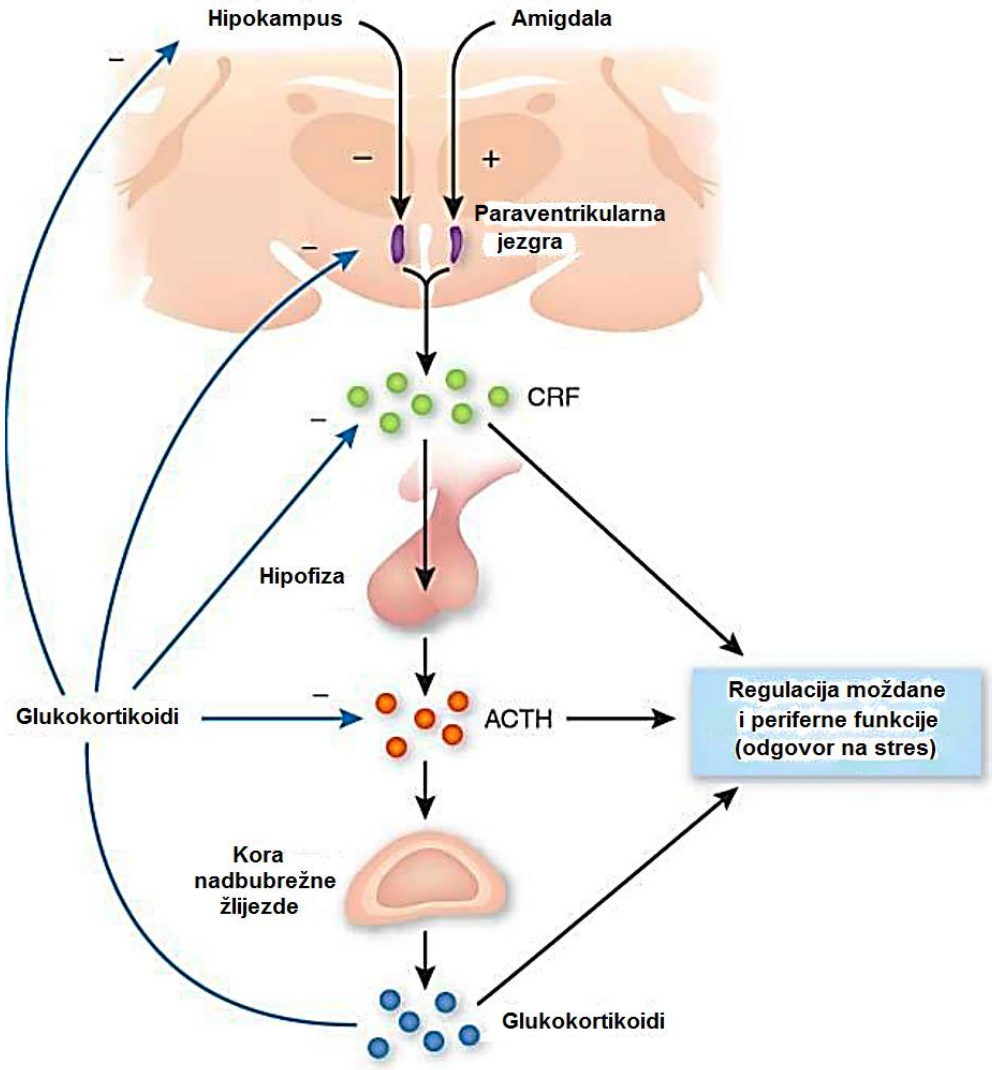
1. OPĆI DIO

1.1. STRES I STRESNI ODGOVOR

Posljednjih 50 godina stres je postao jedan od fokusa kojim se bave znanstvenici iz područja javnog zdravstva i drugih područja medicine, te se stoga povećalo razumijevanje mehanizama stresa i stresnog odgovora.[1]

Danas je prihvaćeno da se stres može manifestirati u više oblika (akutni, kronični) i da može biti posljedica velikog broja različitih uzroka (fizioloških, psiholoških i psihosocijalnih). Odgovor pojedinca na stresor također može poprimiti višestruke forme. Prvi, kratkotrajni odgovor na stres je mehanizam „borba ili bijeg" (engl. *fight or flight*), koji je posljedica aktivacije simpatičkog živčanog sustava, dok je drugi emocionalni, depresivni odgovor rezultat aktivacije hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde. Mozak je odgovoran za procijenu je li određeni stresor uzrok nastanka akutnog ili kroničnog signala, je li pozitivan (pomaže zdravlju) ili negativan (šteti zdravlju) te konačno i za određivanje prikladnog odgovora na stresor. Odgovori mogu uključivati širok spektar bihevioralnih (ponašajnih) ili fizioloških reakcija u kojem mogu sudjelovati kardiovaskularni, imunološki ili metabolički sustav koje su posredovane oslobađanjem neurotransmitera (npr. kateholamina, adrenalina, glukokortikoida).[1]

Veliki dio kaskade neurotransmitera u odgovoru na stresor javlja se kroz višefazi put hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde (HPA). Slika 1 ukratko sažeto prikazuje taj put, u kojem hipotalamus šalje kortikotropin-oslobađajući faktor (CRF) hipofizi, koja otpušta adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji je, s druge strane, preuzela nadbubrežna žlijezda, koja zatim otpušta glukokortikoide. Pored navedenih faktora koji imaju druge periferne učinke, glukokortikoidi su uključeni u negativnu povratnu petlju koja isključuje HPA os kada dođe do dostatnog odgovora na stresor. U hipotalamusu, paraventikularna jezgra oslobađa CRF, koji se transportira do prednjeg režnja hipofize, gdje uzrokuje oslobađanje ACTH u krvotok. ACTH stimulira koru nadbubrežne žlijezde da sintetizira i otpušta glukokortikoide kortizol (ljudi) ili kortikosteron (glodavci). Glukokortikoidi imaju povratni mehanizam na razini hipokampusa, hipotalamusa i hipofize da priguše prekomjernu aktivaciju HPA osi.[1]



Slika 1. Prikaz multifaznog procesa HPA osi s proizvodnjom i povratnom vezom glukokortikoida. CRF, kortikotropin-oslobađajući faktor; ACTH, adrenokortikotropni hormon.[1]

1.1.1. Stres i adolescencija

Adolescencija je razvojno razdoblje karakterizirano brojnim promjenama u gotovo svakom aspektu života pojedinca te poziva na nove psihološke prilagodbe. Izloženost različitim stresorima nastalim tim promjenama, predstavlja središnji i normalni dio procesa rasta i razvoja tijekom puberteta. Doživljaj kumulativnih i istovremenih negativnih stresora ostaje centralan kao potencijalna prijetnja dobrobiti i zdravom razvoju tijekom adolescencije.[8]

Adolescenti provode mnogo vremena u školi, koja je izvor socijalnih i akademskih izazova. Psihosocijalni stres vezan uz školu uključuje interpersonalne probleme, kao što su sukobi s prijateljima i kolegama, učiteljima, školski pritisak te strah od neuspjeha.[2]

Stres se definira u okviru transakcijske teorije koja stres promatra kao odnos osobe i okoline u kojem dolazi do nepodudarnosti osobnih resursa i zahtjeva okoline, odnosno kao sklop psihičkih i fizioloških reakcija na stresni poticaj koji predstavlja zahtjev kojemu se ne može udovoljiti, a strategije suočavanja promatra kao kognitivne napore svladavanja, podnošenja ili smanjenja stresnih poticaja koji su procijenjeni prevelikim za sposobnosti osobe.[9]

1.2. HORMONI

Hormoni reguliraju cjelokupni metabolizam i sudjeluju u održavanju homeostaze, tj. konstantnog kemijskog sastava staničnih i izvanstaničnih tjelesnih tekućina, normalne funkcije organizma te kontroliraju rast i razvoj pojedinih djelova tijela. To se postiže regulacijom metabolizma soli, vode, ugljikohidrata, masti i proteina. Važne funkcije hormona jesu i stvaranje i skladištenje energije, odgovori na glad, infekciju, traumu, psihološki stres i regulacija reproduktivne funkcije. Hormoni sudjeluju u svim fiziološkim funkcijama kao što su mišićna aktivnost, disanje, probava, hematopoeza, ponašanje i raspoloženje. Funkcija endokrinog sustava tijesno je povezana s funkcijom živčanog, kardiovaskularnog, respiracijskog i probavnog sustava i samo se zajedničkim neurohumoralnom regulacijom održava konstantnost unutarnje sredine organizma.[10]

Po svojoj građi hormoni su vrlo različiti spojevi, a njihovo djelovanje je ovisno upravo o kemijskoj strukturi. Najmanje promjene u toj strukturi uzrokuju promjene u djelovanju.[10]

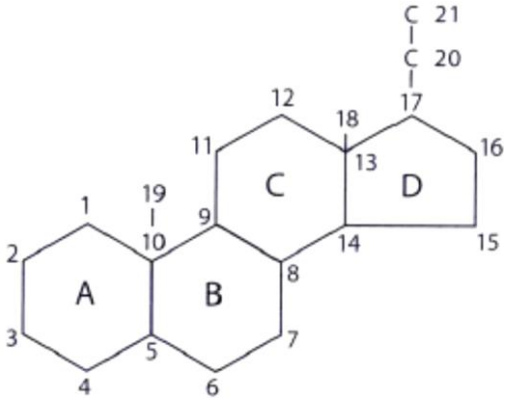
Prema građi, hormoni se dijele na:

a) steroidne hormone (spolni hormoni, kortikosteroidi),
b) hormone nastale od aminokiselina (tiroksin, trijodtironin, dopamin, adrenalin, noradrenalin),
c) peptidne i polipeptidne hormone (adrenokortikotropni hormon (ACTH), somatotropin, antidiuretički hormon, inzulin, glukagon),
d) proteinske hormone (prolaktin, PRL; tireotropni hormon, TSH; folikul stimulacijski hormon, FSH; luteinizirajući hormon, LH; humani korionski gonadotropin, HCG).[10]

1.2.1. Steroidni hormoni

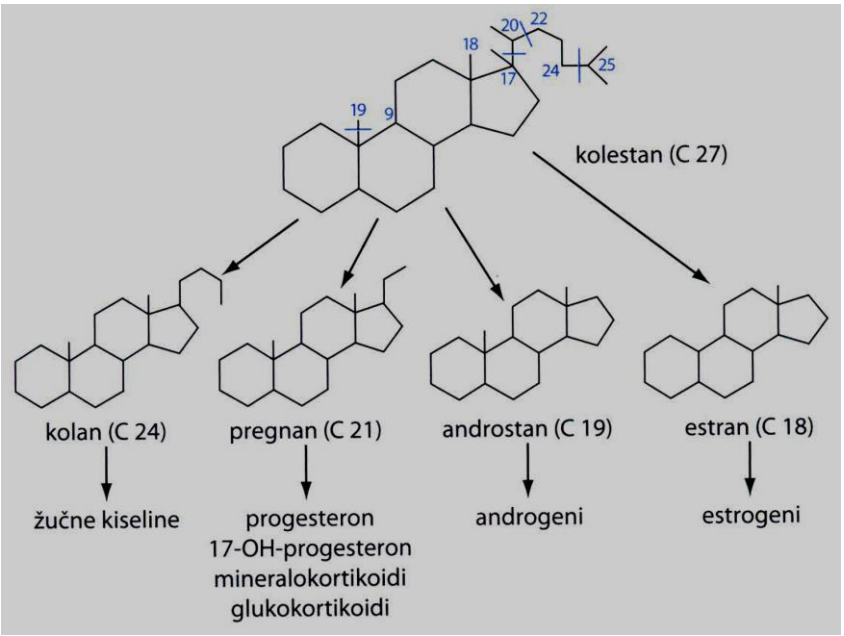
Steroidni hormoni imaju osnovnu strukturu koja se sastoji od ciklopentanoperhidrofenantrenske jezgre (Slika 2.). Ona sadržava tri zasićena šesteročlana prstena na koje je vezan još jedan peteročlani prsten. Steroidni

hormoni imaju do 21 C-atom. Osnovna struktura steroida ima prostornu konfiguraciju stolca.[10]



Slika 2. Osnovna struktura steroidnih hormona.[10]

Postupnim cijepanjem veza osnovnog ugljikovodika kolestana nastaju ugljikovodici kolan, estran, androstan i pregnan. Uvođenjem dvostrukih veza u ciklopentanoperhidrofenantrensku jezgru i supstituenata na mjesto vodikovih atoma jezgre ili postranog lanca, nastaju žučne kiseline i steroidni hormoni kortikosteroidi, progesteron, androgeni i estrogeni (Slika 3.).[10]



Slika 3. Osnovni ugljikovodici i hormoni koji nastaju iz njih.[10]

1.2.1.1. Hormoni kore nadbubrežne žlijezde

Kora nadbubrežne žlijezde luči niz hormona iz svojih triju zona: fascikulatne zone, retikularne zone i glomerulozne zone. Pod kontrolom hipotalamusa iz adenohipofize se luči ACTH, koji nadubrežnu žlijezdu potiče na stvaranje nekoliko hormona koji se zajednički nazivaju kortikosteroidi. Uz kortikosteroide koji se stvaraju samo u kori nadbubrežne žlijezde, tu se u malim količinama stvaraju još i androgeni, estrogeni i progesteron, koji se inače većim dijelom stvaraju u testisima (androgeni) i jajniku (estrogeni, progesteron).[10] Aldosteron, glavni bioaktivni mineralokortikoid u ljudi, sintetizira se u zoni glomerulozi, dok zona fascikulata i retikularna zona proizvode i kortizol i kortikosteron.[11]

Svi kortikosteroidi sadržavaju 21 C-atom, te imaju dvostruku vezu između C-4 i C-5, ketonsku skupinu na C-3 i postrani lanac u *β*-položaju na C-17. Neki na C-17 imaju još OH-skupinu u *α*-položaju (glukokortikoidi) te ketonsku ili *β*-hidroksilnu skupinu na C-11. Svi imaju metilne skupine na C-10 i C-13, osim aldosterona kojemu je metilna skupina na C-13 zamijenjena aldehidnom skupinom.[10]

Različiti kortikostreoidi, iako su strukturno vrlo slični, imaju različito fiziološko djelovanje. Te razlike u biološkoj aktivnosti uvjetovane su supstituentima na C-3, C-11 i C-17, odnosno kod aldosterona na C-18.[10]

Kortikosteroidi reguliraju metabolizam ugljikohidrata (glukokortikoidi), soli i vode (mineralokoritkoidi).[10]

1.2.1.1.1. Glukokortikoidni hormoni

Fiziološko djelovanje glukokortikoida na metabolizam ugljikohidrata uključuje stimulaciju glukoneogeneze povećanom razgradnjom proteina, odlaganje glikogena iz jetre i smanjenje iskorištenja glukoze. Posljedica je toga povećanje koncentracije glukoze u krvi. Zbog povećane potrebe za aminokiselinama pod djelovanjem kortizola pojačano se razgrađuju proteini, pa se to odražava u kataboličkom djelovanju na mišiće i koštani matriks, dok se u jetri stimulira sinteza proteina. Dugotrajno uzimanje glukokortikoida može prouzročiti

osteoporozu porastom resopcije kostiju i gubitkom koštanog matriksa. Smanjuju crijevnu apsorpciju kalcija i bubrežnu reapsorpciju kalcija i fosfora. Njihov višak inhibira linearni rast i sazrijevanje skeleta u djece. Inhibiraju lučenje hormona rasta, ali su potrebni za normalan rast i razvoj. Stimuliraju lipolizu i time povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina. Protuupalno i imunosupresivno djelovanje glukokortikoida u reumatskim bolestima temelji se na poticanju stvaranja citokina. Povećavaju glomerularnu filtraciju (GFR) i protok krvi kroz bubrege. Djeluju i na metabolizam u mozgu, te na raspoloženje i ponašanje. Povećanje koncentracije kortizola i poremećen dnevni ritam nalaze se još i kod nekih oblika depresije.[10]

Neki važniji glukokortikoidi:

- kortizol (snažnog djelovanja, obuhvaća oko 95% ukupne glukokortikoidne aktivnosti),
- kortikosteron (osigurava oko 4% ukupne glukokortikoidne aktivnosti, ali znatno slabiji od kortizola),
- kortizon (sintetički spoj, gotovo jednako jak kao kortizol),
- prednizon (sintetički spoj, četiri puta jači od kortizola),
- metilprednizon (sintetički spoj, pet puta jači od kortizola),
- deksametazon (sintetički spoj, trideset puta jači od kortizola).[12]

1.2.1.1.2. Mineralokortikoidni hormoni

Najjači mineralokortikoid je aldosteron koji se sitetizira u glomeruloznoj zoni kore nadbubrežne žlijezde. Aldosteron kontrolira promet vode i soli, djelujući na prolazak natrija i kalija kroz stanične membrane, na resorpciju natrija i izlučivanje kalija, magnezija i vodikovih iona bubrezima. Djelovanje aldosterona objašnjava se indukcijom sinteze proteina koji sudjeluje u resorpciji natrija u tubulima. Sintezu aldosterona ne kontrolira samo ACTH nego i reninsko-angiotenzinski sustavi kalij. Renin je osjetljiv na koncentraciju natrija u plazmi i oslobađa se u cirkulaciju smanjenjem njegove koncentracije, a njegovo otpuštanje stimulira i pad tlaka perfuzije u jukstaglomerularnom bubrežnom aparatu. Na reninsko-angiotenzinski sustav utječu i promjene u adrenergičkom i

dopaminergičkom sustavu, promjene volumena krvi i protoka krvi kroz glomerule.[10]

Od navedenih kortikosteroida samo koncentracija kortizola djeluje s pomoću mehanizma negativne povratne sprege na lučenje ACTH.[10]

Neki važniji mineralokortikoidi:

- aldosteron (vrlo jak, obuhvaća oko 90% ukupne mineralokortikoidne aktivnosti),
- deoksikortikosteron (1/30 jakosti aldosterona, luči se u vrlo malim količinama),
- kortikosteron (slaba mineralokortikoidna aktivnost),
- 9*α*-fluorokortizol (sintetski spoj, nešto jači od aldosterona),
- kortizol (vrlo slaba mineralokortikoidna aktivnost, ali se luči u velikim količinama),
- kortizon (sintetički spoj, slaba mineralokortikoidna aktivnost).[12]

1.2.1.1.3. Androgeni hormoni nadbubrežne žlijezde

Androgeni hormoni nadbubrežne žlijezde jesu androstendion, testosteron, 11*β*-hidroksiandrostendion, dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEA-S). Luče ih zona fasciculata i zona reticularis, a u najvećim količinama luči DHEA-S. Nemaju postranog lanca na C-17, pa sadržavaju samo 19 C-atoma.[10]

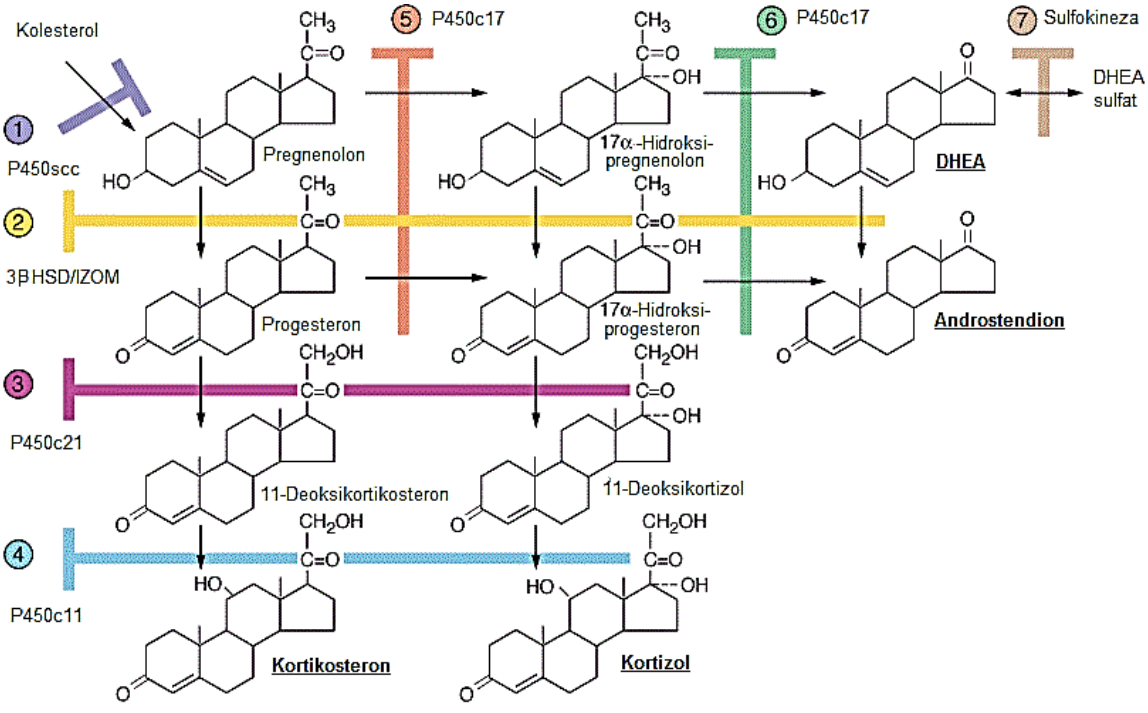
1.2.1.2. Biosinteza hormona kore nabubrežne žlijezde

Kolesterol, prekursor steroida u svim biosintetskim putevima, preveden je u različite steroidne molekule u seriji reakcija kataliziranih s nekoliko enzima sustava citokrom P450.[11] Steroidni akutni regulatorni protein (StAR) prenosi kolesterol s unutarnje na vanjsku stranu mitohondrija, gdje nastaje pregnenolon uz pomoć ezima citokrom P_{450}scc, koji ima aktivnost 20*α* i 22-hidroksilaze, te 20,22-liaze. Pregnenolon uz enzim citokrom P_{450}c17 (17*α*-hidroksilaza) prelazi u

17-hidroksipregnenolon. Isti enzim ima i aktivnost 17,20-liaze, koja katalizira stvaranje DHEA. Djelovanjem sulfokinaze iz DHEA nastaje DHEA-S.[10]

Pregnenolon i 17-hidroksipregnenolon uz enzime 3β-hidroksisteroid-dehidrogenazu i izomerazu prelaze u progesteron, odnosno 17-hidroksiprogesteron (17-OHP). Djelovanjem enzima citokroma P_{450}c21 (21-hidroksilaze) progesteron i 17-OHP prelaze u deoksikortikosteron, odnosno 11-deoksikortizol, a dalje djelovanjem citokroma P_{450}c11 (11*β*-hidroksilaza), 11-deoksikortizol prelazi u kortizol. Uz enzim 11*β*-hidroksisteroid-dehidrogenazu kortizol prelazi u kortizon. Samo u glomeruloznoj zoni kore nadbubrežne žlijezde dolazi do sinteze aldosterona u tri stupnja djelovanjem istog enzima citokroma P_{450}aldo (aldosteron-sintetaze), koji ima aktivnosti 11*β*-hidroksilaze, 18-hidroksilaze i 18-hidroksisteroid-dehidrogenaze.[10]

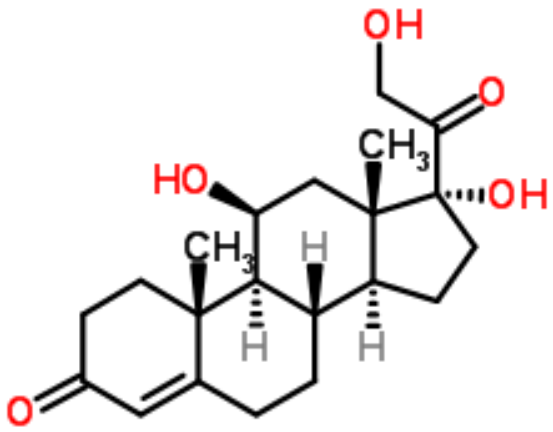
Biosinteza androgena obavlja se u testisima, kori nadbubrežne žlijezde, a manjim dijelom u jajnicima i posteljici. Postoje dva biosintetička puta za sintezu androgena, tzv. Δ^4 i Δ^5 put. U nadbubrežnoj su žlijezdi zastupljena oba puta. U kori nabubrežne žlijezde stvara se i mala količina estrogena. Djelovanjem enzima aromataze iz androstendiona nastaje estron, a iz testostreona estradiol.[10]



Slika 4. Biosinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde.[13]

1.2.1.3. Kortizol

Najmanje 95% glukokortikoidne aktivnosti hormona kore nabubrežnih žlijezda pripada kortizolu, poznatom kao i hidrokortizon, čija je struktura prikazana na slici 5.[12]



Slika 5. Osnovna struktura kortizola.[14]

1. Učinci kortizola na metabolizam ugljikohidrata

Od svih djelovanja kortizola i drugih glukokortikoida na metabolizam najbolje je poznata njihova sposobnost poticanja glukoneogeneze (stvaranja ugljikohidrata iz proteina i nekih drugih tvari) u jetri. Glukoneogeneza se često može povećati 6 do 10 puta zbog dvaju različitih djelovanja kortizola.

- Kortizol u jetrenim stanicama povećava količinu enzima potrebnih za pretvorbu aminokiselina u glukozu.
- Kortizol mobilizira aminokiseline iz ekstrahepatičnih tkiva, uglavnom iz mišića.[12]

2. Učinci kortizola na metabolizam proteina

Jedan od glavnih učinaka kortizola na metaboličke sustave u tijelu je smanjivanje zaliha proteina gotovo u svim stanicama u tijelu, osim u stanicama jetre. Uzroci su tome i smanjena sinteza proteina i povećan katabolizam proteina koji se nalaze u stanicama. Oba učinka možda nastaju zato što je smanjen prijenos aminokiselina u ekstrahepatična tkiva, ali to vjerojatno nije glavni razlog. U isto vrijeme dok se količina proteina posvuda u tijelu smanjuje,

povećava se njihov sadržaj u jetri. Povećava se i količina plazmatskih proteina (koje se stvaraju u jetri i zatim oslobađaju u krv). Vjeruje se da ta razlika nastaje zato što kortizol potiče prijenos aminokiselina u stanice jetre (a ne i u većinu ostalih stanica) i aktivnost jetrenih enzima nužnih za sintezu proteina.[12]

3. Učinci kortizola na metabolizam masti

Gotovo jednako kao što pospješuje mobilizaciju aminokiselina iz mišića, kortizol pospješuje i mobilizaciju masnih kiselina iz masnog tkiva. To uzrokuje povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi, pa se povećava i njihovo energijsko iskorištavanje. Čini se da kortizol izravno pospješuje i oksidaciju masnih kiselina u stanicama.[12]

4. Učinci kortizola pri obrani od stresa i upale

Gotovo svaka vrsta stresa, bio on fizički ili neurogeni, uzokuje trenutno i snažno pojačano lučenje ACTH iz adenohipofize, nakon čega se za nekoliko minuta naglo poveća lučenje kortizola iz kore nabubrežnih žlijezda.[12]

Neke vrste stresa koje pojačavaju oslobađanje kortizola:

- gotovo svaka vrsta traume,
- infekcija,
- velika toplina ili hladnoća,
- injekcija noradrenalina i drugih simpatomimetičkih lijekova,
- kirurški zahvati,
- potkožna injekcija tvari koje izazivaju nekrozu,
- gotovo svaka iscrpljujuća bolest.[12]

Premda se lučenje kortizola često izrazito povećava u stresnim stanjima, još nije sasvim razjašnjeno koje je njihovo korisno djelovanje.[12]

1.2.1.3.1. Unutarstanično djelovanje kortizola

Koncentracije kortizola prate čvrsti dnevni obrazac, gdje su visoke odmah nakon buđenja i postižu najveću koncentraciju aproksimativno pola sata nakon, zatim lagano opadaju tijekom ostatka dana. Osim toga, koncentracije kortizola

se povećavaju kao odgovor na stresore. Kada je tijelo izloženo stresoru, aktivira svoj simpatički živčani sustav i HPA os. Jednom aktivirana, HPA os povećava prozvodnju hormona stresa, uključujući kortizol, koji se oslobađaju iz kore nabubrežne žlijezde. Nakon opuštanja iz kore nabubrežne žlijezde, kortizol je kao ligand preuzet od strane receptora u mozgu (negativna povratna petlja).[1]

U moždanom tkivu, kortizol se veže za dva tipa receptora, mineralokortikoidne receptore i glukokortikoidne receptore. Mineralokortikoidni receptori su zauzeti pod bazalnim uvjetima cirkadijalnog ritma. S druge strane glukokortikoidni receptori su zauzeti samo kada su koncentracije kortizola visoke (npr. odgovor na stresor), zbog nižeg afiniteta tih receptora. Polimorfizmi u oba gena za mineralokortikoidni i glukokortikoidni receptor su povezani s odgovorom na stres.[1]

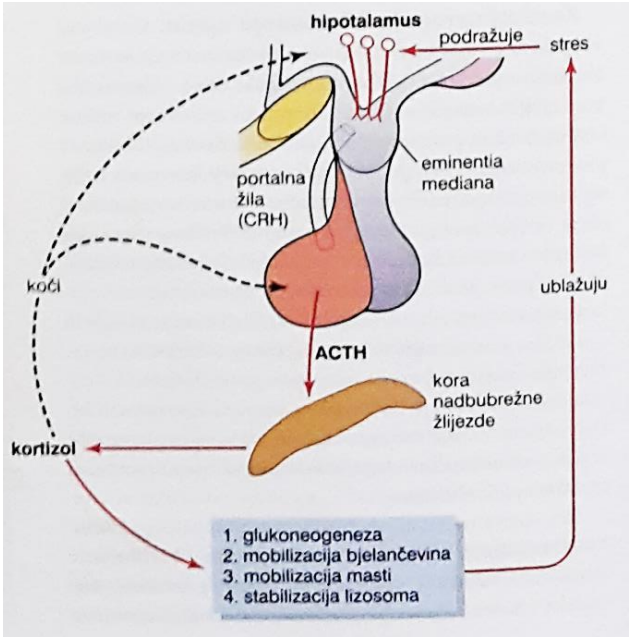
1.2.1.3.2. Regulacija sinteze kortizola i ostalih glukokortikoida

Lučenje kortizola gotovo potpuno nadzire adrenokortikotropni hormon (ACTH) što ga izlučuje adenohipofiza. Taj hormon, nazvan još i kortikotropin ili adrenokortikotropin, pospješuje i stvaranje adrenalnih androgena. ACTH je izoliran iz adenohipofize u čistom obliku. To je polipeptid koji sadrži 39 aminokiselina u lancu. Jedan manji polipeptid, koji je razgradni proizvod ACTH i čiji lanac sadrži 24 aminokiseline ima jednaku aktivnost kao i molekula ACTH. Lučenje ACTH nadzire hipotalamični hormon koji oslobađa kortikotropin (CRH). Ako nema CRH, adenohipofiza može lučiti samo neznatne količine ACTH.[12]

ACTH potiče stanice kore nadbubrežnih žlijezda na lučenje steroida tako što povećava stvaranje cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP). U nadzoru nad lučenjem hormona kore nadbubrežnih žlijezda najvažniji je korak aktivacija enzima protein-kinaze A. Taj enzim uzrokuje početnu pretvorbu kolesterola u pregnenolon. To objašnjava zašto je ACTH prijeko potreban za sintezu svih hormona kore. Dugotrajna stimulacija kore nadbubrežnih žlijezda ACTH-om ne povećava samo sekrecijsku aktivnost, već dovodi do hipertrofije i proliferacije stanica kore, osobito u fascikulatnoj i retikularnoj zoni, tj. ondje gdje se luče kortizol i androgeni.[12]

Gotovo pri svakoj vrsti fizičkog ili psihičkog stresa već za nekoliko minuta dolazi do povećanog lučenja ACTH, a zbog toga i kortizola; lučenje kortizola često se poveća i do 20 puta. Bolni podražaji uzrokovani fizičkim stresom ili oštećenjem tkiva najprije se prenose prema gore kroz moždano deblo, a zatim u eminenciju medijana hipotalamusa. Ondje se CRH luči u hipofizni portalni sustav. Taj slijed u nekoliko minuta uzrokuje pojavu velikih količina kortizola u krvi, psihički stres može gotovo jednako brzo povećati lučenje ACTH. Vjeruje se da to nastaje zbog povećane aktivnosti limbičkog sustava, osobito u području amigdale i hipokampusa, iz kojih se onda signali prenose u stražnji medijalni dio hipotalamusa.[12]

Kortizol negativnom povratnom spregom izravno djeluje na hipotalamus (gdje dolazi do smanjenog stvaranja CRH) i na adenohipofizu (gdje se smanjuje stvaranje ACTH). Obje povratne sprege sudjeluju u regulaciji koncentracije kortizola u plazmi. Prema tome, kada koncentracija kortizola postane prevelika, povratne sprege automatski smanjuju koncentraciju ACTH prema normalnoj, kontrolnoj razini (Slika 6.).[12]



Slika 6. Mehanizam nadzora nad lučenjem glukokortikoida. ACTH (adrenokortikotropni hormon); CRH (hipotalamični hormon koji oslobađa kortikotropin).[12]

1.3. GENSKA REGULACIJA DJELOVANJA GLUKOKORTIKOIDA I MINERALOKORTIKOIDA

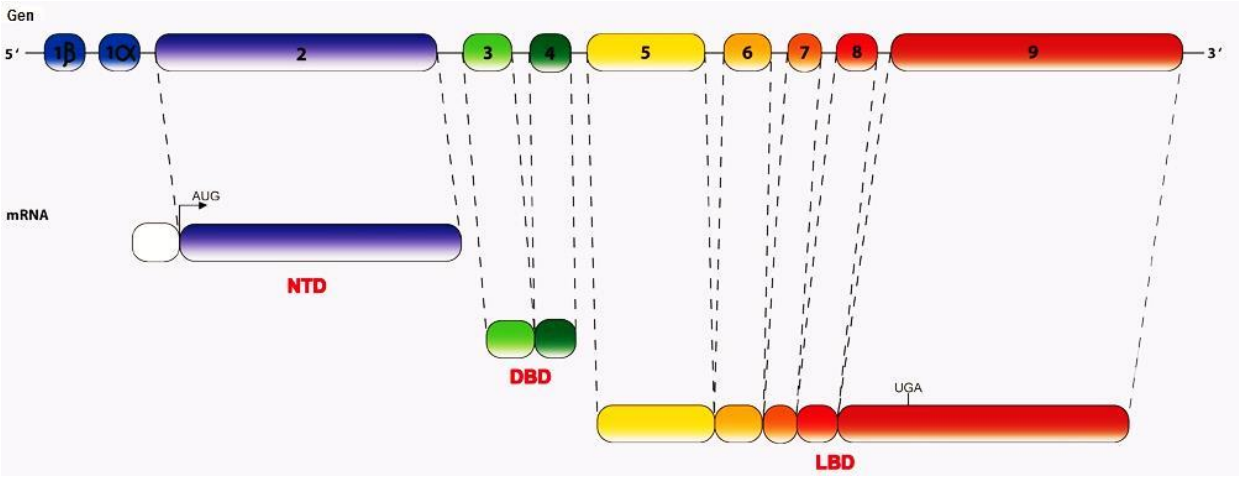
Glukokortikoid kortizol je glavni efektor HPA osi i glavni hormon odgovoran za odziv na stresor. Njegova aktivnost započinje vezivanjem na glukokortikoidne (GR) i mineralokortikoidne (MR) receptore. Dok su GR prisutni u skoro svakoj stanici u tijelu, MR se javljaju uglavnom u područjima mozga, i to limbičkog sustava i hipokampusa. Afinitet kortizola za MR je puno veći nego za GR i vezivanje kortizola za MR održano je na bazalnim nivoima dok se GR aktiviraju kao odgovor na stresor.[4] Oba tipa receptora zajedno zajedno utječu na razinu kortizola.[1] Smatra se da mineralokortikoidni receptori uglavnom reguliraju početak aktivacije HPA osi, dok glukokortikoidni receptori reguliraju terminaciju aktivnosti.[4] Važan regulator glukokortikoidnog receptora je FK506-vezujući protein 5 (FKBP5).[15] Aktivacija GR rezultira brzom indukcijom FKBP5 koji se veže za GR i smanjuje njegovo sposobnost da veže kortizol i da se translocira u jezgru. FKBP5 smanjuje sistemsku osjetljivost na kortizol i smanjuje GR-posredovanu negativnu povratnu spregu HPA osi. Postoji više razina regulacije i kontrole koje mogu pomoći u određivanju funkcije HPA osi u odgovoru na stres. Te razine uključuju genetičke varijante kao što su polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (SNP-ovi), koji utječu na razinu ekspresije gena kao i na epigenetičku regulaciju gena uključenih u HPA os.[16]

1.3.1. Mineralokortikoidni receptori

Gen *NR3C2* sadrži upute za stvaranje mineralokortikoidnog receptora. Ovaj receptorski protein je važan za regulaciju metabolizma natrija u tijelu, a ujedino je i receptor je za mineralokortikoid aldosteron, kao i za glukokortikoide kao što su kortikosteron i kortizol.[17,18] Aktivirani MR djeluje kao transkripcijski faktor koji se veže za specifične regije DNA i pomaže u kontroli aktivnosti (prijepisa) određenih gena.[17]

1.3.1.1. Struktura i djelovanje mineralokortikoidnog receptora

Ljudski gen za mineralokortikoidni receptor nalazi se na 4. kromosomu (4q31.2) i sadrži osam translatiranih eksona (2-9) i dva netranslatirana prva eksona, MR*α* i MR*β*.[19] Alternativni prijepis tih eksona može dovesti do stvaranja dviju izoformi RNA. Slijedećih 8 eksona (2-9) kodira cijeli MR protein. MR/*NR3C2* ima tri glavne funkcionalne domene: modulirajuća N-terminalna domena (NTD), središnja DNA-vezujuća domena (DBD) i C-terminalnualna ligand-vezujuća domena (LBD). Ekson 2 većim dijelom kodira NTD, eksoni 3 i 4 kodiraju oba cinkova prsta DBD, a preostalih 5 eksona kodiraju LBD (Slika 7.).[20]

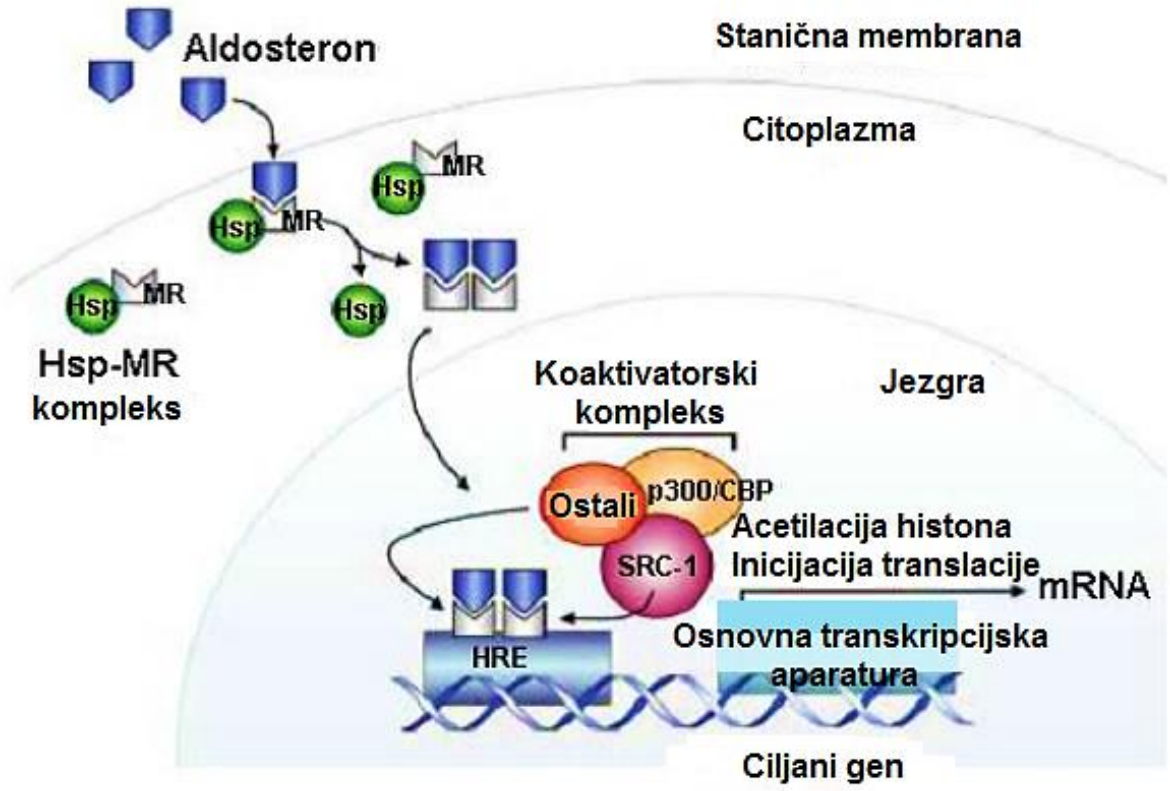


Slika 7. Shematski prikaz strukture ljudskog mineralokortikoidnog receptora (MR/*NR3C2*).[20]

N-terminalna domena vrlo je promjenjiva u veličini i sekvenci između različitih nuklearnih receptora. Ova domena pokazuje promotorsku i stanično-specifičnu aktivnost i može igrati ulogu u tkivno specifičnoj ekspresiji. DBD najviše je očuvana domena te je u mogućnosti prepoznati specifične DNA sekvence u ciljanim genima i potreban joj je visok afinitet vezivanja DNA. LBD potrebna je za vezivanje liganda i posreduje pri homo- i heterodimerizaciji.[19]

Mineralokortikoidni receptor je ligand-aktivirani transkripcijski faktor. U odsutnosti liganda, MR je lokaliziran u citoplazmi u kompleksu s nekoliko šaperona kao 90 kDa protein toplinskog šoka (hsp90). Nakon vezanja liganda, MR homodimerizira i premješta se u jezgru gdje djeluje na ekspresiju ciljanih gena. LBD MR-a sadrži AF-2 regiju koja uključuje konzerviranu poddomenu

nuklearnog receptora koja sadrži barem jedan LXXLL motiv (L označava leucin, X bilo koju amino kiselinu). Otkriveno je nekoliko koaktivatora MR koji se mogu vezati za ovaj motiv te pojačati ili prigušiti transaktivaciju. SRC-1a i SRC-1e, članice P160 koaktivatorske obitelji, i drugi koaktivatori kao SRC-2 i p300/CBP (Slika 8.).[19]



Slika 8. Shematski prikaz signalizacije MR-a.[19]

Mineralokortikoidni receptori vežu mineralokortikoide i glukokortikoide s istim visokim afinitetom i nalaze se i u epitelnim tkivima za transport Na^+ (npr. bubregu, debelom crijevu) i u ne-epitelnim tkivima (npr. srcu, mozgu). U epitelnim tkivima enzim 11*β*-hidroksisteroid dehidrogenaza tip 2 (11*β*-HSD2) omogućava aldosteronu da selektivno aktivira MR, pretvaranjem kortizola u kortizon i NAD u NADH. 11*β*-HSD2 uklanja unutarstanični kortizol za 90%, do razina približno 10 puta onih od aldosterona, tako da kada enzim djeluje većina epitelnih MR-a je zauzeta ali ne i aktivirana kortizolom. Kada je unutarstanično redoks stanje promijenjeno inhibicijom 11*β*-HSD2, generacijom reaktivnih kisikovih metabolita ili unutarstaničnim uvođenjem oksidiranog glutationa (GSSG), kortizol se mijenja iz MR antagonista u MR agonista. Čini se da je ta

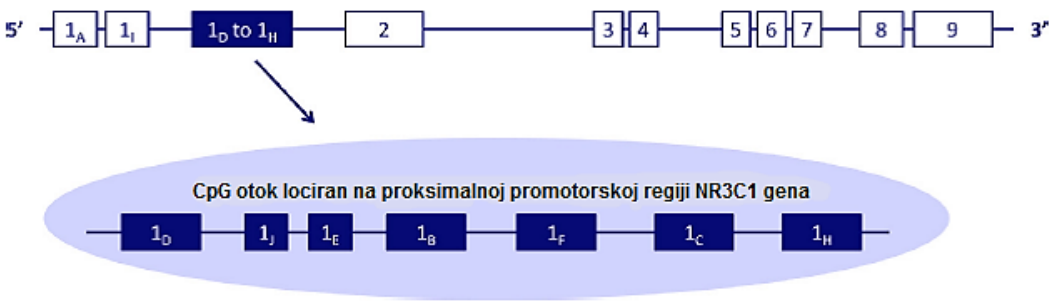
dvovalentna aktivnost kortizola temelj terapijske učinkovitosti blokade MR pri zatajenju srca i hipertenziji.[21]

1.3.2. Glukokortikoidni receptori

Sintezu glukokortikoidnog receptorskog proteina, koji može funkcionirati kao transkripcijski faktor i kao regulator drugih transkripcijskih faktora, kodira gen *NR3C1*.[22] U ljudi, glukokortikoid kortizol raspoređuje se sistemski i izvršava širok spektar funkcija. Kao lipofilna molekula, kortizol prolazi staničnu membranu pasivnom difuzijom i veže se i za MR i za GR. Iako MR ima veći afinitet za glukokortikoide, aktivacija GR je ključ za odgovor svake osobe na stres.[23]

1.3.2.1. Struktura i djelovanje glukokortikoidnog receptora

Ljudski gen za glukokortikoidni receptor lociran je na 5. kromosomu (5q31-Q32) i sadrži 8 translatiranih eksona (2-9) i 9 netranslatiranih alternativnih prvih eksona (Slika 9.). Svi od navedenih identificiranih alternativnih prvih eksona locirani su na jednoj od dvije promotorske regije: proksimalnoj ili distalnaj promotorskoj regiji, koje se nalaze 5 kb i 30 kb uzvodno od translatacijskog startnog mjesta. Alternativni prvi eksoni 1A i 1I su pod kontrolom promotora koji se nalaze u distalnoj promotorskoj regiji, dok se promotori eksona 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C (C1-3), 1H nalaze u proksimalnoj promotorskoj regiji. Eksoni 1D i 1H pronađeni su u uzvodnom CpG otočiću.[19]



Slika 9. Shematski prikaz strukture ljudskog glukokortikoidnog receptora (GR/*NR3C1*).[23]

GR je modularni protein koji sadrži N-terminalnu transaktivacijsku domenu (NTD), središnja DNA-vezujuću domenu (DBD), C-terminalnu ligand-vezujuću domenu (LBD) i fleksibilnu "zglobnu regiju" koja odvaja DBD i LBD. NTD ima snažnu aktivacijsku transkripcijsku funkciju (AF1), koja dopušta regrutiranje koregulatora i transkripcijske mašinerije. Između svih 48 članova superobitelji nuklearnih receptora, DBD je najočuvanija regija. Motivi dva cinkova prsta prisutni u DBD, prepoznaju i vežu specifične sekvence DNA na ciljnim genima. Nakon vezivanja liganda, druga aktivacijska funkcija (AF2), koja se nalazi u LBD-u, udruženo djeluje s koregulatorima.[24]

Alternativno srastanje GR-a stvara izoforme hGR*α* i hGR*β*, koje su identične do aminokiseline 727, ali se razlikuju njihovom C-terminalu. Izoforma hGR*α* veže se za glukokortikoide, translocira u jezgru te regrutira koregulatore da izvrše transkripcijske učinke. Izoforma hGR*β* konstitutivno se nalazi u jezgri i djeluje kao prirodno dominantni negativni inhibitor izoforme hGR*α*, koja može izravno regulirati gene koji nisu regulirani izoformom hGR*α*. Iako nije poznato da hGR*β* izoforma veže glukokortikoidne agoniste, dokazano je da se jedan agonist RU486 (mifepriston) veže za hGR*β* izoformu i regulira transkripcijsku aktvnost. GRγ, GR-A and GR-P su ostale manje okarakterizirane izoforme koje su povezane s neosjetljivosti na glukokortikoide.[24]

U odsutnosti glukokortikoida, GR nalazi se u citoplazmi vezan za protein šaperon kao što je protein toplinskog šoka (hsp90). Nakon vezivanja glukokortikoida, citoplazmatski GR podvrgnut je konfirmacijskoj promjeni, postaje hiperfosforiliran, odvoji se od pomoćnih proteina i premješta se u jezgru gdje može vršiti svoje djelovanje putem genomskih mehanizama. Poznato je da aktivirani citoplazmatski GR pokazuje svoje djelovanje putem negenomskih mehanizama. U jezgri, GR pojačava ili potiskuje transkripciju ciljanih gena izravnim vezanjem za jednostavne ili negativne elemente genskog odgovora (GRE), djeljenjem na druge transkripcijske faktore ili na kompozitni način direktnim vezanjem za GRE i interakcijom s drugim transkripcijskim faktorima.[24]

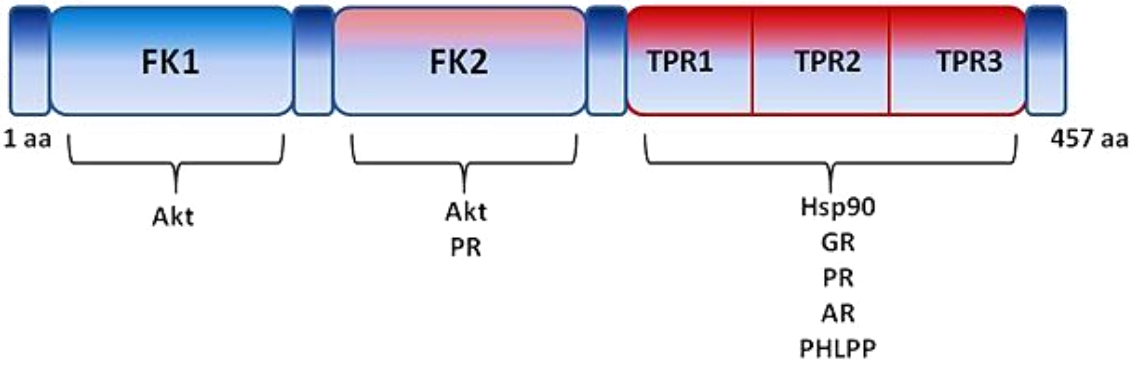
1.3.3. FK506-vezujući protein 5 (FKBP5)

Protein kodiran ovim genom član je imunofilinske obitelji i igra važnu ulogu u imunoregulaciji i osnovnih staničnih procesa uključujući smatanje proteina i izmjenu istih.[25] Također je značajan i kao regulator glukokortikoidnog receptora. Veže se za GR i mijenja njegovu sposobnost da reagira na naznaku stresa.[16]

1.3.3.1. Struktura i djelovanje gena *FKBP5*

Gen *FKBP5* lociran je na kromosomu 6p21.31. Transkripcijom ovog gena stvaraju se četiri različite transkripcijske varijante zbog alternativnog povezivanja (Slika 10.). FKBP5 član je imunofilinske obitelji proteina, koje karakterizira sposobnost da se vežu za imunosupresivne lijekove. Osim toga, imunofilini su peptidil-prolil izomeraze (PPIaza) koje kataliziraju cis-trans pretvorbu peptidilprolil veza, reacija iznimno važna za smatanje proteina.[15]

N-terminalna domena, FK1, aktivna je rotamaze domena (peptidil-prolil izomeraza, PPIaza), koja je potrebna za vezivanje imunosupresivnih lijekova, kao što je FK506 (takrolimus). Osim toga, odgovorna je i za vezivanje na kinazu Akt. FK2 domena, potrebna je za interakciju s nekim veznim partnerima, te ne pokazuje mjerljivu PPIaznu aktivnost. TPR domena sastoji se od 3 TPR ponavljanja po visoko degenerirane 34 aminokiseline, te je odgovorna za višestruke protein-protein interakcije.[15]

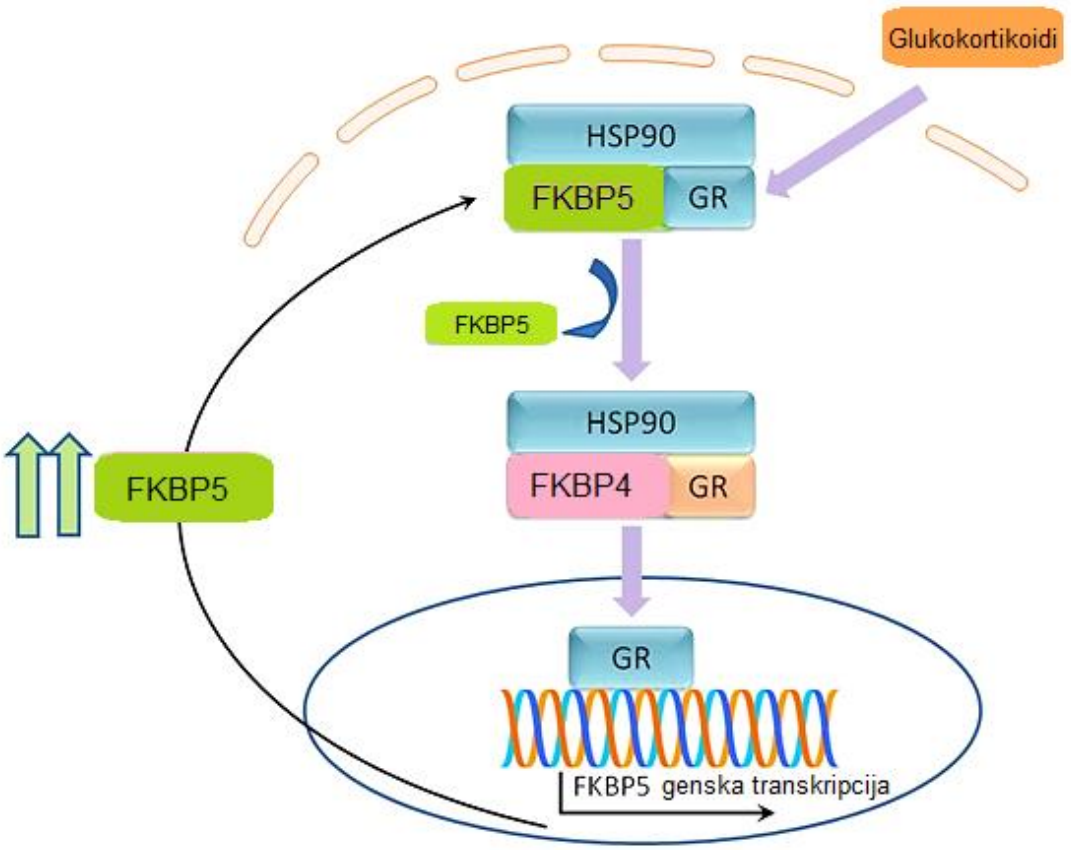


Slika 10. Funkcionalne domene FKBP5.[15]

Do sada je utvrđeno da je ekspresija gena *FKBP5* regulirana glukokortikoidima, progestinima i androgenima. FKBP5 ima višestruke uloge u staničnom procesu. Budući da ima peptidil-prolil izomeraznu aktivnost, regulira smatanje proteina. Osim toga, FKBP5 može se povezati sa šaperonima te na taj način igraju ulogu u izmjeni stanica. Također ima utjecaja na prijenos signala steroidnog receptora, NF-*κ*B put, kao i na put Akt te ima važnu ulogu u regululaciji odgovora na lijekove.[15]

1.3.3.2. Uloga FKBP5 u regulaciji GR-a i HPA osi

FK506-vezujući protein 5 je važan regulator glukokortikoidnog receptora. Kao odgovor na stresore, kortizol se oslobađa, putuje sistemtski kroz krv te se premjesti u citoplazmu stanica.[16] Kada je FKBP5 vezan za GR kompleks, receptor ima niži afinitet prema glukokortikoidima, što uzrokuje povećanje količine glukokortikoida u međustaničnom okruženju. S druge strane, jednom kada je glukokortikoid vezan za receptor, FKBP5 odvaja se od kompleksa i zamjenjuje se s FKBP4.[15] Kortizol vezanjem na GR u citosolu inducira translokaciju GR u jezgru gdje se veže na specifične regije genoma nazvane glukokortikoidni elementi odgovora. Vezani GR služi kao faktor transkripcije kod kortizol-reaktivnih gena, a time aktivira sustave potrebne da se nose sa stresorima. GR također šalje negativnu povratnu informaciju u mozak da ugasi odgovor HPA na stres. FKBP5 posreduje i u dodatnoj negativnoj povratnoj sprezi, kao odgovoru na glukokortikoide. Aktivacija GR stvara brzu indukciju FKBP5, koji se veže za GR i smanjuje njegovu sposobnost vezivanja i translociranja kortizola u jezgru. FKBP5 smanjuje sistematsku osjetljivost na kortizol i smanjuje GR-posredovanu negativnu povratnu spregu HPA osi.[16]



Slika 11. Negativna povratna sprega na GR osjetljivost.[15]

Budući da GR ima ulogu u regulaciji odgovora na stres, a ako je ekspresija FKBP5 promijenjena, to može potencijalno doprinijeti razvoju poremećaja raspoloženja, kao što je depresija ili posttraumatski stresni poremećaj.[15]

1.3.4. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP)

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida definiran je kao jedna varijacija u sekvenci nukleotida DNA, koja može, ali i ne mora utjecati na fenotipske karakteristike organizma. SNP-ovi mogu se kategorizirati prema svom mjestu u genomu, ovisno o tome javljaju li se u kodirajućim regijama gena, u nekodirajućim regijama gena ili u međugenskim regijama. Većina SNP-ova javlja se u nekodirajućim regijama. Međutim, SNP-ovi koji se javljaju u kodirajućim regijama važni su jer oni mogu utjecati na niz važnih bioloških i molekularnih aktivnosti kao što su stabilnost, razina ekspresije i funkciju proteina.[26]

U klasifikaciji SNP-ova, uzeti su u obzir samo oni lokalizirani u 5' netranslatirajućim regijama gena (5' UTR), u kodirajućoj sekvenci, u intronimaa i u 3' netranslatirajućim regijama gena (3' UTR). SNP-ovi lokalizirani blizu regija gena nisu uključeni.[27]

Imena SNP-ova navedena su u NCBI rs formatu (npr. *rs5522*), dok je položaj SNP-ova unutar genske sekvence prikazan nomenklaturom prema preporukama *Human Genome Variation Society* (HGVS) za opis varijanti DNA sekvence v2.0. Prema ovoj nomenklaturi, nukleotid +1 prvi je u kodirajućoj sekvenci (prvi nukleotid eksona). SNP-ovi u netranslatiranim regijama na 5' kraju gena (5' UTR) numerirani su u odnosu na ovaj prvi kodirajući nukleotid, npr. supstitucija 12-tog G u A, prije prvog kodirajućeg nukleotida, na sljedeći način: c.-12G>A. Isto tako, SNP-ovi u kodirajućoj regiji (npr. supstitucija C u G trećeg nukleotida), označeni su kao što slijedi: c.3G>C. Intronski SNP-ovi određeni su u odnosu na svoj 5' ili 3' kraj, dajući prednost bližem kraju. Na primjer, supstitucija T u G drugog nukleotida u intronu (88 + 2) smješten između kodirajuća DNA nukleotida 88 i 89, označena je kako slijedi: c.88+2T>G. Varijante u 3' netranslatiranoj regiji gena označene su u odnosu na stop-kodon, npr. supstitucija T u A 70 nukleotida nizvodno od stop-kodona: c.*70T>A.[27]

1.3.4.1. Utjecaj SNP-ova na funkciju proteina

Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida najčešći su izvor varijacija u ljudskom genomu. S obzirom na njihov položaj, SNP-ovi se mogu podijeliti na SNP-ove kodirajuće i nekodirajuće regije.[27]

SNP-ovi u kodirajućoj regiji mogu utjecati na stvaranje aminokiselina na dva različita načina:

a) Nesinonimni SNP-ovi (nsSNP) dovode do promjene kodiranih aminokiselina, bilo da su posljedica mutacija s pogrešnim smislom očitavanja (engl. *missense*) ili mutacija bez smisla (engl. *nonsense*). Mutacija s pogrešnim smislom mijenja jedan kodon u drugi, čime uzrokuje promjenu u rezultirajućoj aminokiselini, dok mutacija bez smisla dovodi do stvaranja stop-kodona. NsSNP-ovi imaju značajan utjecaj na

strukturu i finkciju kodiranog proteina. Funkcionalni učinci uzrokovani nsSNP-ovima mogu se podijeliti u nekoliko kategorija: SNP-ovi koji utječu na a) strukturu proteina (agregacija proteina, stabilnost, fleksibilnost, funkcionalne stranice i smatanje proteina); b) reakcijsku kinetiku i njezinu ovisnost o okolišnim parametrima; c) substaničnu lokalizaciju proteina; d) stabilnost mRNA i ekspresiju proteina; i konačno, e) interakciju s drugim molekulama.[27]

b) S obzirom na suvišnu prirodu RNA genetičkog koda, u mnogim kodirajućim regijama SNP-ovi neće uzrokovati promjenu aminokiselina kodiranog proteina. Takvi SNP-ovi se nazivaju sinonimni ili tihi, ali ne može se sa sigurnošću reći da nemaju učinka. Čini se da sinonimni polimorfizmi utječu na kinetiku translacije i proteinskog smatanja (moguće preko translacijskog pauziranja tijekom angažiranja rijetkih tRNA). Sinonimni polimorfizmi također utječu na strukturu i stabilnost mRNA. Osim toga, SNP-ovi u kodiranju kao i u regijama introna imaju ulogu u alternativnom spajanju.[27]

SNP-ovi pronađeni u promotorima i u drugim regulatornim regijama utječu na količinu ili vrijeme proizvodnje proteina.[27]

1.3.4.2. Polimorfizmi gena *NR3C1*, *NR3C2* i *FKBP5*

Istraživanja genskih biljega u genima za glukokortikoidne i mineralokortikoidne receptore mogla bi pridonijeti potpunijem razumijevanju fiziologije odgovora na psihološke i socijalne stresne poticaje. Novija istraživanja pokazuju da se individualne razlike u fiziološkom odgovoru na stres mogu dovesti u vezu s polimorfizmima gena HPA osi.[5,6,7]

U genu za MR istražit će se učestalost alela za polimorfizam jednog nukleotida I180V (rs5522), a u genu za GR SNP ER22/23EK (rs6189 i rs6190) stoga što ovi polimorfizmi pokazuju zajednički učinak na kognitivne funkcije.[28] Budući je djelovanje kortizola kompleksno i uključuje niz ko-regulacijskih proteina, također će se istražiti polimorfizam rs1360780 gena za FK506 vezujući protein 5 (FKBP5), koji regulira aktivnost glukokortikodinog receptora.[29]

Polimorfizam rs5522 gena *NR3C2* uključuje supstituciju izoleucina u valin [izo(A)/val(G)]. *In vitro* podaci pokazuju da je alel G povezan sa smanjenom transaktivacijom povezanom s kortizolom.[30] Polimorfizmi gena *NR3C2* povezani su i s varijabilnošću funkcije MR. Istraživanja ukazuju da polimorfizam rs5522 može utjecati na srčanu pregradnju i na razinu aldosterona u pacijenata s hipertenzijom otpornom na lijekove, također utječe na odaziv krvnog tlaka na tretman s enalaprilom kod pacijenata s primarnom hipertenzijom.[31,32] Nositelji alela G mogu biti osjetljivi na različite stresne životne događaje te imaju povećavan rizik za razvoj depresije, deficita pažnje i kognitivnog deficita.[33,34]

Polimorfizmi gena *NR3C1* ER22/23EK (rs1689 i rs6190) predstavljaju dvije povezane promjene nukleotida u kodonima 22 i 23. Smanjenje ekspresije glukokortikoidnih receptora i odgovora na glukokortikoide može rezultirati povećanjem upalnog djelovanja, zabilježenog u depresiji.[35] Prisutnost ER22/23EK rijeđeg alela povezana je s relativnim otporom glukokortikoida, povećanjem osjetljivosti na inzulin i smanjenjem ukupne i LDL razine kolesterola.[36] Pokazalo se da genetski polimorfizmi kod GR utječu na reaktivnost HPA osi, i da je kronična disregulacija HPA osi povezana s razvojem nekoliko psihijatrijskih poremećaja. Istraživanje ukazuje na povezanost funkcionalnih polimorfizama u *NR3C1* i ADHD-a, pružajući genetički dokaz uključenosti HPA osi kod poremećaja.[37]

Polimorfizam rs1360780 gena *FKBP5* (zamjena C/T) je jedini SNP među polimorfizmima FKBP5 koji je pokazao funkcionalne učinke. Potvrđena je povezanost rs1360780 s promjenom odgovora HPA osi i s razvojem psihijatrijskih poremećaja povezanih sa stresom, kao što je posttraumatski stresni poremećaj.[38] Polimorfizam rs1360780 povezan je i s odgovorom na liječenje s antidepresivima tako što pacijenti koji su nositelji alela C imaju korist od standardiziranog liječenja.[39.] Gen *FKBP5* uključen je u regulaciju osjetljivost GR. Pronađeno da je navedeni polimorfizam povezan s velikim depresivnim poremećajem.[40]

1.4. HARDY-WEINBERGOV ZAKON RAVNOTEŽE

Hardy-Weinbergov princip, poznat i kao Hardy-Weinbergov zakon genetičke ravnoteže (HWE), kaže da populacija ne evoluira ako se frekvencije gena (alela) i genotipova ne mijenjaju u nizu sukcesivnih generacija. To je temeljni postulat svih istraživanja populacija u genetičkoj ravnoteži, odnosno tzv. Mendelskih populacija.[41]

Ovaj su koncept, neovisno jedan o drugom, postulirali engleski matematičar Godfrey H. Hardy i njemački liječnik Wilhelm Weinberg (Hardy–Weinbergov zakon, 1908.), uočivši da se pod odgovarajućim uvjetima karakteristična genetička struktura populacije održava nepromjenjenom sukladno određenim matematičkim relacijama.[41]

Model je definirao uvjete pod kojim se održava genetička ravnoteža u populaciji:

- svaka jedinka u populaciji ima podjednaku šansu da se spari s bilo kojom jedinkom (suprotnog spola) u pripadajućoj populaciji;
- prilikom tog sparivanja svaka gameta jedne jedinke ima podjednaku šansu da se spoji sa bilo kojom gametom jedinke suprotnog spola;
- iz dva prethodna uvjeta, proizlazi da svaka gameta u populaciji ima podjednaku šansu da se spoji sa bilo kojom gametom u istoj populaciji;

- pored toga, za održavanje genetičke ravnoteže u populaciji neophodno je pretpostaviti izostanak evolucijskih faktora koji je remete (selekcija, mutacije, izolacija i genetički drift).[41]

Model genetičkog ravnoteže predstavlja teorijsku osnovu suvremene populacijske genetike, a polazi od pretpostavke da se (u odsutnosti faktora koji ga remete) relativna frekvencija promatranih gena (genotipova i fenotipova) ne mijenja iz jedne u drugu generacije.[41]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. ISPITANICI

Ovaj diplomski rad dio je velike studije salivarnih biljega stresa u hrvatskih adolescenata.[3]

U istraživanje su uključeni uzorci sline maturanata iz 26 gimnazija i strukovnih škola iz 4 najveća hrvatska grada: Zagreba, Splita, Rijeke i Osijeka. Genske analize provedene su na pod-uzorku od 400 ispitanika tako što su se metodom slučajnog odabira izdvojli uzorci sline 50 maturanata i 50 maturantica iz svakog od četiri istraživana grada.

2.2. ISPITIVANI POLIMORFIZMI

Tablica 2.1. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), geni, lokalizacija na kromosomu, aleli i učestalost rjeđeg alela prikazani su u tablici kako slijedi.

Gen	SNP	Lokalizacija na kromosomu	Aleli	Učestalost rjeđeg alela (MAF)
NR3C2	rs5522	4: 148436323	A/G	0,1175
NR3C1	rs6190	5: 143400772	A/G	0,01331
NR3C1	rs6189	5: 143278056	A/G	0,09229
FKBP5	rs1360780	6: 35639794	C/T	0,2994

Kriterij uključivanja pojedinih lokusa u studiju bili su:

a) učestalost rijeđeg alela ≥ 5% (podaci dobiveni dbSNP database)[42]
b) klinički dokazana vrijednost pojedinog polimorfizma u različitim studijama povezanosti s odgovorom na stres.

2.3. METODE ISPITIVANJA

2.3.1. Izolacija DNA iz uzorka sline

Izolacija DNA iz sline je napravljena, prema uputama proizvođača, pomoću komercijalno dostupnog kita Danagen saliva kit (Barcelona, Španjolska).

I. PRELIMINARNA PRIPREMA REAGENSA

a) Priprema reagensa
   - Ukoliko Lysis Solution sadrži precipitat, nastao zbog niske temperature, potrebno je inkubirati otopinu na 37º C i izmiješati je kako bi se precipitat otopio.
   - Otopiti Proteinase K u 6,5 mL dd vode i pohraniti na -20º C. Preporuča se napraviti nekoliko alikvota (8 tubica po 815 µL ili 10 tubica po 650 µL), kako bi se izbjegla višestruka smrzavanja/odmrzavanja. Na ovoj temperaturi PK je stabilna 1 godinu (PK se može staviti u hladnjak na 4º C ukoliko će se iskoristiti u roku od mjesec dana).
   - Otopiti RNase u 815 µL dd vode i pohraniti na -20º C. Također se preporuča napraviti nekoliko alikvota, kako bi se izbjegla višestruka smrzavanja/odmrzavanja.

II. PROTOKOL ZA IZOLACIJU DNA IZ 2 mL UZORKA SLINE

a) Liziranje stanica
   - U falkon tubu od 15 mL dodati 2 mL uzorka sline.
   - Centrifugirati tubu na 4000 o/min, 2 minute. Pažljivo ukloniti supernatant pomoću pipete, izbjegavajući oštećenje taloga (peleta).
   - Dodati 2 mL Lysis Solution + 15 µL Proteinase K + 15 µL RNase, izmiješati (resuspendirati) uzorak pipetom kako bi se stanice bolje lizirale. Važno je naglasiti da dobro suspendirana otopina ne smije sadržavati nakupine stanica.

- Inkubirati tubu na 37º C, 30-60 minuta. Tubice povremeno snažno izmiješati.

b) Precipitacija proteina
    - Dodati 750 µL Protein Precipitation Solution u lizat stanica.
    - Snažno vorteksirati na maksimalnoj brzini, 20-30 sekundi.
    - Centrifugirati na 5000 o/min, 5 minuta, nakon čega bi se trebao stvoriti bijeli precipitat. Ukoliko se u supernatantu nalaze plutajući fragmenti, nakon što se prethodno inkubirao na ledu 5 minuta, uzorak ponovno centrifugirati.

c) Precipitacija DNA
    - Prenijeti supernatant, koji sadrži DNA, u novu falkon tubu od 15 mL u koju je prethodno dodano 2 mL izopropanola.
    - Izmiješati uzorak okretanjem tubice gore-dolje, 50-ak puta.
    - Centrifugirati tubice na 4500 o/min, 3 minute. DNA će postati vidljiva kao bijeli talog.
    - Ukloniti supernatant i osušiti tubicu na čistom papiru, koji dobro upija. Dodati 2 mL hladnog 70%-tnog etanola kako bi isprali DNA.
    - Centrifugirati tubice na 4500 o/min, 2 minute. Pažljivo ukloniti supernatant, izbjegavajući dodirivanje taloga DNA. Može se još jednom kratko centrifugirati kako bi se nakon toga mikropipetom pokupile kapljice ostatnog etanola.
    - Okrenuti tubice te ih ostaviti da se suše na upijajućem papiru, otprilike 5-10 minuta.

d) Otapanje DNA
    - Dodati 500-750 µL DNA Hydratation Solution i uzorak dobro izmiješati pipetom.
    - Inkubirati na 55º C, 1 sat kako bi se pospješilo otapanje DNA ili inkubirati preko noći na sobnoj temperaturi, povremeno lagano miješajući.

- Za kratkotrajnu pohranu spremiti uzorak na 2-8º C. Za dugotrajnu pohranu spremiti uzorak na -20º C/-80º C.

Dobivena količina DNA bila je prosječno oko 90 ng/µl.

2.3.2. Genotipizacija polimorfizama DNA

Genotipizacija polimorfizma rs5522 gena *NR3C2*, rs6190 i rs6189 gena *NR3C1* i rs1360780 gena *FKBP5* provedena je metodom PCR u realnom vremenu, na instrumentu ABI Prism 7500 (Life Sciences, Carlsbad, SAD).

Amplifikacija je napravljena u finalnom volumenu od 10 µL reakcijske smjese, koji je sadržavao 20 ng DNA, 5 µL Taqman Genotyping Master mix-a i 0,25 µL Taqman SNP assaya, sa specifičnim početnicama za svaki polimorfizam. Svi reagensi koji su se koristili su od proizvođača Life Technologies (Carlsbad, SAD).

Uvjeti amplifikacije bili su slijedeći: 50 °C, 60 sekundi i 95 °C, 10 minuta; PCR reakcija 95 °C, 15 sekundi i 60 °C, 60 sekundi, ukupno 40 ciklusa.

Dobiveni rezultati analizirani su pomoću pripadajućeg sofware-a v2.3. za inastrument ABI Prism 7500 (Life Sciences, Carlsbad, SAD).

2.3.3. Statistička obrada rezultata

Nakon provedene genotipizacije očitani su aleli i genotipovi za pojedinačne SNP-ove. Izračunata su odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), pomoću χ^2 testa, uz jedan stupanj slobode, za svaki polimorfizam, za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada (Osijek, Rijeka, Split i Zagreb) te za sva tri SNP-a, u cjelokupnom uzorku svih ispitanika, pomoću online kalkulatora.[43]

3. REZULTATI

3.1. UČESTALOST GENOTIPOVA I ALELA ZA ISPITANE POLIMORFIZME

a) Polimorfizam rs5522

Tablica 3.1. Učestalost genotipova i alela za polimorfizam rs5522 za svaku skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima.

	GG	GA	AA	G	A
Osijek	2 (2,00%)	16 (16,00%)	82 (82,00%)	20 (10,00%)	180 (90,00%)
Zagreb	4 (4,00%)	14 (14,00%)	82 (82,00%)	22 (11,00%)	178 (89,00%)
Rijeka	0 (0,00%)	19 (19,00%)	81 (81,00%)	19 (9,50%)	181 (90,50%)
Split	0 (0,00%)	11 (11,00%)	89 (89,00%)	11 (5,50%)	189 (94,50%)
Ukupno	6 (1,50%)	60 (15,00%)	334 (83,50%)	72 (9,00%)	728 (91,00%)

b) Dvojni polimorfizam rs6189/rs6190

Tablica 3.2. Učestalost genotipova i alela za dvojni polimorfizam rs6189/6190 za svaku skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima.

	GG	GA	AA	G	A
Osijek	0 (0,00%)	8 (8,00%)	92 (92,00%)	8 (4,00%)	192 (96,00%)
Zagreb	0 (0,00%)	7 (7,00%)	93 (93,00%)	7 (3,50%)	193 (96,50%)
Rijeka	1 (1,00%)	3 (3,00%)	96 (96,00%)	5 (2,50%)	195 (97,50%)
Split	0 (0,00%)	4 (4,00%)	96 (96,00%)	4 (2,00%)	196 (98,00%)
Ukupno	1 (0,25%)	22 (5,50%)	377 (94,25%)	24 (3,00%)	776 (97,00%)

c) Polimorfizam rs1360780

Tablica 3.3. Učestalost genotipova i alela za polimorfizam rs1360780 za svaku skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima.

	CC	CT	TT	C	T
Osijek	52 (52,00%)	33 (33,00%)	15 (15,00%)	137 (68,50%)	63 (31,50%)
Zagreb	47 (47,00%)	44 (44,00%)	9 (9,00%)	138 (69,00%)	62 (31,00%)
Rijeka	50 (50,00%)	37 (37,00%)	13 (13,00%)	137 (68,50%)	63 (31,50%)
Split	48 (48,00%)	40 (40,00%)	12 (12,00%)	136 (68,00%)	64 (32,00%)
Ukupno	197 (49,25%)	154 (38,50%)	49 (12,25%)	548 (68,50%)	252 (31,50%)

3.2. PROVJERA ODSTUPANJA OD HARDY-WEINBERGOVOG ZAKONA RAVNOTEŽE (HWE) ZA ANALIZIRANE POLIMORFIZME

a) Polimorfizam rs5522

Tablica 3.4. Provjera odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za izračunate učestalosti genotipova u rs5522 za svaku skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima (N=100 za svaki grad).

	Osijek		Zagreb		Rijeka		Split	
Genotipovi	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**
Homozigotni referentni	82	81,0	82	79,2	81	81,9	89	89,3
Heterozigoti	16	18,0	14	19,6	19	17,2	11	10,4
Homozigotna varijanta	2	1,0	4	1,2	0	0,9	0	0,3
Varijanca frekvencije alela	0,10		0,11		0,10		0,06	
χ^2=	1,234567901		8,121626683		1,101919966		0,338736318	
P =	0,266521 s 1 stupnjem slobode		0,004374 s 1 stupnjem slobode		0,293845 s 1 stupnjem slobode		0,560560 s 1 stupnjem slobode	

b) Dvojni polimorfizam rs6189/rs6190

Tablica 3.5. Provjera odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za izračunate učestalosti genotipova u rs6189/rs6190 za skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima (N=100 za svaki grad).

	Osijek		Zagreb		Rijeka		Split	
Genotipovi	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**
Homozigotni referentni	92	92,2	93	93,1	96	95,1	96	96,0
Heterozigoti	8	7,7	7	6,8	3	4,9	4	3,9
Homozigotna varijanta	0	0,2	0	0,1	1	0,1	0	0,0
Varijanca frekvencije alela	0,04		0,04		0,03		0,02	
χ^2 =	0,173611111		0,131547156		14,79289941		0,041649313	
P =	0,676922 s 1 stupnjem slobode		0,716833 s 1 stupnjem slobode		0,000120 s 1 stupnjem slobode		0,838290 s 1 stupnjem slobode	

.

c) Polimorfizam rs1360780

Tablica 3.6. Provjera odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za izračunate učestalosti genotipova u rs1360780 za skupinu ispitanika podijeljenih prema gradovima (N=100 za svaki grad).

	Osijek		Zagreb		Rijeka		Split	
Genotipovi	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**
Homozigotni referentni	52	46,9	47	47,6	51	47,6	48	46,2
Heterozigoti	33	43,2	44	42,8	36	42,8	40	43,5
Homozigotna varijanta	15	9,9	9	9,6	13	9,6	12	10,2
Varijanca frekvencije alela	0,32		0,31		0,31		0,32	
χ^2=	5,537294393		0,081327627		2,511758191		0,654195502	
P =	0,018615 s 1 stupnjem slobode		0,775506 s 1 stupnjem slobode		0,113000 s 1 stupnjem slobode		0,418617 s 1 stupnjem slobode	

d) Polimorfizmi rs5522, rs6189/rs6190 i rs1360780

Tablica 3.7. Provjera odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za izračunate učestalosti genotipova za sva tri polimorfizma (rs5522, rs6189/rs6190 i rs1360780) na ukupnom uzorku ispitanika iz Hrvatske (N=400).

	rs5522		rs6189/rs6190		rs1360780	
Genotipovi	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**	**Uočeni**	**Očekivani**
Homozigotni referentni	334	331,2	377	376,4	198	188,4
Heterozigoti	60	65,5	22	23,3	153	172,2
Homozigotna varijanta	6	3,2	1	0,4	49	39,4
Varijanca frekvencije alela	0,09		0,03		0,31	
χ^2=	2,839163279		1,209244104		4,995200185	
P =	0,091992 s 1 stupnjem slobode		0,271482 s 1 stupnjem slobode		0,025418 s 1 stupnjem slobode	

4. RASPRAVA

U ovom radu analizirana je učestalost alela i genotipova za polimorfizam pojedinačnog nukleotida I180V (rs5522) u genu za mineralokortikoidni receptor (MR), te učestalost alela i genotipova dvojnog polimorfizma rs6189/rs6190 u genu za glukokortikoidni receptor (GR). Također se istražila učestalost alela za polimorfizam rs1360780 gena za FK506 vezujući protein 5 (FKBP5), koji regulira aktivnost GR-a.[29] Ispitivani uzorak činili su adolescenti iz četiri najveća hrvatska grada (po 100 ispitanika iz Osijeka, Rijeke, Splita i Zagreba), a ovaj je diplomski rad dio velike studije salivarnih biljega stresa u populaciji hrvatskih adolescenata.[3]

Stres na ljude najčešće djeluje vrlo negativno i pridonosi razvoju mnogih bolesti, kako tjelesnih, tako i psiholoških, a svaka životna promjena, bila ona pozitivna ili negativna, uzrokuje određenu dozu stresa. Adolescencija je razvojno razdoblje karakterizirano brojnim promjenama u gotovo svakom aspektu života pojedinca te poziva na nove psihološke prilagodbe.[8] Gotovo svaka vrsta stresa, bio on fizički ili neurogeni, uzokuje trenutno i snažno pojačano lučenje ACTH iz adenohipofize, nakon čega se za nekoliko minuta naglo poveća lučenje glukokortikoida kortizola iz kore nabubrežnih žlijezda, glavnog efektora HPA osi i glavnog hormona odgovornog za odaziv na stresor.[4,12] Istraživanja genskih biljega u genima za glukokortikoidne i mineralokortikoidne receptore mogla bi pridonijeti potpunijem razumijevanju fiziologije odgovora na psihološke i socijalne stresne poticaje, a za polimorfizme analizirane u ovom radu već je, u radovima drugih autora, pokazan njihov zajednički učinak na kognitivne funkcije.[28] Novija istraživanja pokazuju da se individualne razlike u fiziološkom odgovoru na stres mogu dovesti u vezu s polimorfizmima gena HPA osi.[5-7]

Nakon određivanja alela i genotipova za polimorfizme rs5522, rs6189/rs6190 i rs1360780, analizirana su i odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE), za svaki polimorfizam pojedinačno, za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada (Osijek, Rijeka, Split i Zagreb) te za sva tri SNP-a u cjelokupnom uzorku svih ispitanika.

Polimorfizam rs5522 povezuje se s varijabilnošću funkcije MR. Istraživanja ukazuju da polimorfizam rs5522 može utjecati na srčanu pregradnju i na razinu aldosterona u pacijenata s hipertenzijom otpornom na lijekove, također utječe na odaziv krvnog tlaka na tretman s enalaprilom kod pacijenata s primarnom hipertenzijom.[31,32] Nositelji alela G mogu biti osjetljivi na različite stresne životne događaje te imaju povećavan rizik za razvoj depresije, deficita pažnje i kognitivnog deficita.[33,34]

Analiza učestalosti alela i genotipova (Tablica 3.1.) za polimorfizam rs5522 provedena je na uzorku ispitanika iz četiri najveća hrvatska grada (N=100 za svaki grad). U uzorku ispitanika iz Osijeka utvrđeno je 90% ispitanika s alelom A i 10% s alelom G, Zagreba (učestalost alela G je 11%, alela A 89%), Rijeke (učestalost alela G je 9,5%, dok alela A 90,5%) i Splita (učestalost alela G je 5,5%, a alela A 94,5%). Analiza rezultata χ^2 testom pokazala je da se broj uočenih i očekivanih genotipova statistički značajno ne razlikuje među ispitanicima iz Osijeka, Rijeke i Splita, dok je uočena statistički značajna razlika u ispitanika s područja grada Zagreba (P=0,0043) (Tablica 3.4.). S obzirom na navedene reultate, bilo bi preporučljivo u daljnjim istraživanjima ovog polimorfizma povećati broj ispitanika svim gradovima, budući je rjeđa homozigotna varijanta genotipa (GG) pronađena u manje od 5% ispitanika.

Polimorfizam rs6189/rs6190 povezuje se s relativnom rezistencijom na glukokortikoide, povećanjem osjetljivosti na inzulin i sa smanjenjem ukupne razine kolesterola i LDL.[36] Pokazano je da određeni genski polimorfizmi za GR utječu na reaktivnost HPA osi, kao i da je kronična disregulacija HPA osi povezana s razvojem nekoliko psihijatrijskih poremećaja. Istraživanja ukazuju i na moguću povezanost funkcionalnih polimorfizama u genu *NR3C1* i poremećaja pažnje (ADHD), pružajući tako genetički dokaz o uključenosti HPA osi u poremećaje.[37]

U tablici 3.2. prikazana je učestalost pojedinih genotipova i alela za dvojni polimorfizam rs6189/rs6190. Učestalost rjeđeg alela G u uzorku ispitanika s područja grada Osijeka bila je 4%, u uzorku maturanata iz Zagreba 3,5%, Rijeke 2,5%, dok a Splita 2%. Analiza odstupanja dobivenih rezultata od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže pokazala je da nema statistički

značajnih razlika, osim u uzorku ispitanika iz Rijeke (P=0,00012) (Tablica 3.5.). Sličan zaključak, kao i za polimorfizam rs5522, može se izvesti iz dobivenih rezultata za ovaj polimorfizam. Naime, potrebno je povećati broj ispitanika u svim gradovima budući je učestalost rjeđeg alela i genotipa potvrđena u manje od 5 ispitanika.

Nešto drugačiji rezultati dobiveni su u analizi polimorfizma rs1360780 i prikazani su u tablici 3.3. Genotipizacija je provedena na uzorku ispitanika. Više od polovice ispitanika iz Osijeka (52%) imalo je genotip CC, 33% genotip CT, dok ih je 15% imalo rjeđi genotip TT, a slični su rezultati dobiveni i u uzorcima iz ostalih gradova: iz Zagreba (47% ih je imalo genotip CC, 44% genotip CT, dok ih je 9% imalo genotip TT), Rijeke (50% ih je imalo genotip CC, 37% genotip CT, dok ih je 13% imalo genotip TT) kao i Splita (48% ih je imalo genotip CC, 40% genotip CT, dok ih je 12% imalo genotip TT). Analiza ovih rezultata χ^2 testom pokazala je da nema statističkih značajnih razlika između uočenog i očekivanog broja genotipova u ispitanika s područja Rijeke, Splita i Zagreba, dok je statistički značajna razlika uočena u ispitanika iz Osijeka (P=0,0186) (Tablica 3.6.).

Polimorfizam rs1360780 povezuje se s promjenom odgovora HPA osi i s razvojem psihijatrijskih poremećaja povezanih sa stresom, kao što je posttraumatski stresni poremećaj.[38] Polimorfizam rs1360780 povezan je i s odgovorom na liječenje antidepresivima, a pacijenti koji su nositelji alela C pokazuju veći uspjeh u liječenju.[39]

Odstupanje od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za sva tri polimorfizma (rs5522, rs6189/6190 i rs1360780) provjereno je i na cjelokupnom broju ispitanika iz Hrvatske (N=400). Odstupanje od HWE nije uočeno za polimorfizame rs5522, i rs6189/6190, dok je odstupanje uočeno samo za polimorfizam rs1360780 (P=0,025) (Tablica 3.7.).

Iako ovaj rad predstavlja tek inicijalni dio istraživanja gena povezanih sa stresom u populaciji hrvatskih maturanata, dobiveni rezultati potvrđuju da bi se polimorfizam rs1360780 mogao dobro iskoristiti u populacijskim studijama i onima povezanim sa stresom. Može se, također, pretpostaviti da bi,

povećanjem broja ispitanika, najvjerojatnije, nestalo odstupanje od HWE te bi se dobili rezultati sličniji nekim drugim populacijskim istraživanjima.[38,40]

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno na uzorku od 400 maturanata iz četiri najveća hrvatska grada (po 100 ispitanika iz Osijeka, Rijeke, Splita i Zagreba). Analizirana je učestalost alela i genotipova za polimorfizme rs5522, rs6189/rs6190 i rs1360780 te su izračunata i odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže (HWE) za svaku skupinu ispitanika iz četiri hrvatska grada kao i u cjelokupnom uzorku svih ispitanika, te se može zaključiti slijedeće:

- Statistička značajna razlika uočena je u broju učestalosti genotipova u ispitanika s područja Zagreba za polimorfizam rs5522 (P=0,00437), Rijeke za dvojni polimorfizam rs6189/rs6190 (P=0,00012) te Osijeka za polimorfizam rs1360780 (P=0,0186).

- Analizom cjelokupnog broja ispitanika iz Hrvatske (N=400), odstupanje od HWE uočeno je za polimorfizam rs1360780 (P=0,025), dok za polimorfizame rs5522, i rs6189/6190 nije uočeno odstupanje.

- Dobiveni rezultati potvrđuju da bi se polimorfizam rs1360780 mogao dobro iskoristiti u populacijskim studijama te da bi povećanjem broja ispitanika, najvjerojatnije, nestalo odstupanje od HWE i rezultati bi bili sličniji nekim drugim populacijskim istraživanjima.

6. LITERATURA

1. E. K. Payne, Genetic studies of salivary cortisol profiles and their influence on chronic disease risk factors, doctoral thesis, University of Michigan, Michigan, 2013.

2. U. K. Moksnes, Stress and health in adolescents: The role of potential protective factors, doctoral thesis, Norwegian University of Science and Technology, Norway, 2011.

3. D. Šupe-Domić, G. Milas, I. Drmić Hofman, L. Rumora and I. Marinković Klarić, *Biochemia Medica* **26** (2016) 408-420.

4. I. Christiaens I., Q. W. Ang, L. N. Gordon, X. Fang, S. M. Williams, C. E. Pennell and D. M. Olso, *BMC Medical Genetics* **16** (2015) 59.

5. P. Mahon Belmonte, P. P. Zandi, J. B. Potash, G. Nestadt and G. S. Wand, *Psychopharmacology (Berl.)* **221** (2013) 231-241.

6. H. I. Sheikh, K. R. Kryski, H. J. Smith, E. P. Hayden and S. M. Singh, *Neuroscience.* **229** (2013) 1-11.

7. J. A. Sumner, K. A. McLaughlin, K. Walsh, M. A. Sheridan and K. C. Koenen, *Psychoneuroendocrinology* **43** (2014) 71-80.

8. B. Kalebić Maglica, *Psihologijske teme* **15** (2006) 7-24.

9. R. S. Lazarus and S. Folkman, *Stress, Appraisal and Coping*, Springer Publishing Company, New York, 1984.

10. D. Čvorišćec and I. Čepelak, *Štrausova medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009.

11. D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast, T. S. Gansler, J. F. Holland and E. Frei, *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, Hamilton, 2003.

12. A. C. Guyton, J. E. Hall, *Medicinska fiziologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2012.

13. Anonymous (2016.), Glucocorticoids and Adrenal Androgens,

http://oncohemakey.com/glucocorticoids-and-adrenal-androgens/

(29. kolovoza 2016.)

14. Royal Society of Chemistry (2015.), ChemSpider,

http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5551.html (16. rujna 2016.)

15. K. A. Ellsworth and L. Wang, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* **18** (2013) 314-320.

16. A. R. Tyrka, K. K. Ridout, S. H. Parade, A. Paquette, C. J. Marsit and R. Seifer, *Development and Psychopathology* **27** (2015) 1637-1645.

17. U.S. Department of Health & Human Services (2016.), National Institutes of Health, National Library of Medicine,

https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NR3C2#normalfunction (7. rujna 2016.)

18. UniProt (2013.),
http://www.uniprot.org/uniprot/P08235 (7. rujna 2016.)

19. S. R. Alt, The glucocorticoid receptor: transcriptional regulation and epigenetic programming, doctorial thesis, University of Trier, Germany, 2011.

20. F. Di Fabio, B. Gottlieb, L. K. Beitel and M. Trifiro, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* **13** (2009) 858-860.

21. J. W. Funder, *Heart Failure Reviws* **10** (2012) 15-22.

22. National Center for Biotechnology Information (2016.), U.S. National Library of Medicine,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2908 (12. rujna 2016.)

23. H. Palma-Gudiel, A. Córdova-Palomera, J. C. Leza and L. Fañanás, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **55** (2015) 520-35.

24. M. Kadmiel and J. A. Cidlowski, *Trends in Pharmacological Sciences* **34** (2013) 518-530.

25. National Center for Biotechnology Information (2016.), U.S. National Library of Medicine,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2289 (13. rujna 2016.)

26. R. Bin Mohamad Razali, Studies on the relationship between single nucleotide polymorphisms and protein interactions, doctorial thesis, Imperial College of London, United Kingdom, 2014.

27. M. Raudenska, J. Gumulec, O. Podlaha, M. Sztalmachova, P. Babula, T. Eckschlager, V. Adam, R. Kizekbd and M. Masarik, *Metallomics*. **6** (2014) 55-68.

28. M. Kuningas M., R. H. de Rijk, R. G. J. Westendorp, J. Jolles, P. E. Slagboom and D. van Heemst, *Neuropsychopharmacology* **32** (2007) 1295-1301.

29. E. B. Binder, D. Salyakina, P. Lichtner, G. M. Wochnik, M. Ising, B. Pütz, S. Papiol, S. Seaman, S. Lucae, M. A. Kohli, T. Nickel, H. E. Künzel, B. Fuchs, M. Majer, A. Pfennig, N. Kern, J. Brunner, S. Modell, T. Baghai, T. Deiml, P. Zill, B. Bondy, R. Rupprecht, T. Messer, O. Köhnlein, H. Dabitz, T. Brückl, N. Müller, H. Pfister, R. Lieb, J. C. Mueller, E. Lõhmussaar, T. M. Strom, T. Bettecken, T. Meitinger, M. Uhr, T. Rein, F. Holsboer and B. Muller-Myhsok, *Nature Genetics* **36** (2004) 1319-1325.

30. R. Bogdan, D. E. Williamson and A. R. Hariri, *The American Journal of Psychiatry* **169** (2012) 515-522,

31. A. M. Ritter, V. Fontana, A. P. Faria, R. Modolo, N. R. Barbaro, A. R. Sabbatini, H. Peres, C. Biagi, P. S. Silva, P. C. Lopes, J. E. Tanus-Santos, E. B. Coelho and H. Moreno, *The American Journal od Hypertension* **29** (2016) 245-250.

32. L. Q. Luo, L. Y. Wang, F. Z. He, N. L. Sun, G. F. Tang, J. G. Wen, Z. Y. Luo, Z. Q. Liu, H. H. Zhou, X. P. Chen and W. Zhang, *Pharmacogenomics* **15** (2014) 201-208.

33. M. C. Slof-Op't Landt, R. H. DeRijk, G. E. van Son, H. E. Suchiman, I. Meulenbelt, P. E. Slagboom and E. F. Van Furth, *European Eating Disorders Review* **22** (2014) 423-429.
34. G. L. Kortmann, V. Contini, G. P. Bertuzzi, N. R. Mota, D. L. Rovaris, V. R. Paixão-Côrtes, L. L. de Lima, E. H. Grevet, C. A. Salgado, E. S. Vitola, L. A. Rohde, P. Belmonte-de-Abreu and C. H. Bau, *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences* **263** (2013) 181-188.

35. E. Galecka, J. Szemraj, M. Bieńkiewicz, I. Majsterek, K. Przybylowska-Sygut, P. Galecki and A. Lewiński, *Molecular Biology Reports* **40** (2013) 1693-1699.

36. M. C. Souza, C. S. Martins, I. M. Silva, R. S. Chriguer, A. C. Bueno, S. R. Antonini, W. A. Silva, M. A. Zago, A. C. Moreira and M. de Castro, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia* **58** (2014)

37. M. È. Fortier, S. M. Sengupta, N. Grizenko, Z. Choudhry, G. Thakur and R. Joober, *Neuromolecular Medicine* **15** (2013) 122-132.

38. T. Fujii, M. Ota, H. Hori, K. Hattori, T. Teraishi, J. Matsuo, Y. Kinoshita, I. Ishida, A. Nagashima and H. Kunugi, *Scientific Reports* **4** (2014) 4696.

39. T. J. Stamm, C. Rampp, K. Wiethoff, J. Stingl, R. Mössner, G. O Malley, R. Ricken, F. Seemüller, M. Keck, R. Fisher, W. Gaebel, W. Maier, H. J. Möller, M. Bauer and M. Adli, *Journal of Psychopharmacology* **30** (2016) 40-47.

40. L. Tozzi, A. Carballedo, F. Wetterling, H. McCarthy, V. O'Keane, M. Gill, D. Morris, C. Fahey, J. Meaney and T. Frodl, *Neuropsychopharmacology* **41** (2016) 487-497.

41. Genetics Society of America (2016.) Hardy-Weinberg law,

http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/hardy-weinberg-law

(3. listopada 2016.)

42. National Center for Biotechnology Information (2016.), Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP),

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ (25. rujna 2016.)

43. Court M.H., Michael H. (2012) Court's (2005–2008) online calculator, https://www.tufts.edu/ (10. listopada 2016.)