Varijabilnost CYR2 gena kod pacijenata s infarktom miokarda

Zdravčević, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:515510

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Matea Zdravčević

VARIJABILNOST *CRY2* GENA KOD PACIJENATA S INFARKTOM MIOKARDA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Matea Zdravčević

VARIJABILNOST *CRY2* GENA KOD PACIJENATA S INFARKTOM MIOKARDA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 34 lista, 9 tablica i 2 slike.

SADRŽAJ

1. Uvod ... 1

1.1. Infarkt miokarda ... 1

1.1.1. Klasifikacija srčanog infarkta ... 1

1.1.2. Kriteriji određivanja srčanog infarkta ... 2

1.2. Cirkadijalni ritam ... 3

1.2.1. Anatomija cirkadijalnog sustava sisavaca ... 4

1.2.2. Geni cirkadijalnog ritma ... 5

1.3. *CRY2* gen ... 5

1.3.1. Kriptokromi ... 6

1.4. Utjecaj varijacija *CRY2* gena na nastanak infarkta miokarda ... 6

2. Cilj istraživanja ... 8

3. Ispitanici i metode ... 9

3.1. Ustroj studije ... 9

3.2. Ispitanici ... 9

3.3. Metode ... 10

3.4. Statističke metode ... 13

4. Rezultati ... 14

4.1. Rezultati anamnestičkog upitnika ... 14

4.2. Analiza genetičkih varijacija *CRY2* gena ... 15

5. Rasprava ... 21

6. Zaključak ... 24

7. Sažetak ... 25

8. Summary ... 26

9. Literatura ... 27

10. Životopis ... 30

1. Uvod

1.1.Infarkt miokarda

Definicija i klasifikacija infarkta miokarda godinama je subjekt rasprava među znanstvenicima (1). Unatoč tome što se učestalost progresivno smanjuje, u posljednjem desetljeću kardiovaskularni poremećaji i dalje su vodeći uzrok smrti i invalidnosti diljem svijeta (2). Drugim riječima, jedan od tri pacijenta koji dožive koronarni incident u narednoj godini će umrijeti, što dovodi do zaključka da je srčani infarkt osnovni razlog jedne od sedam smrti (3). Infarkt miokarda definiran je kao odumiranje stanica miokarda uslijed dugotrajne srčane ishemije (1).

1.1.1. Klasifikacija srčanog infarkta

Patogeneza pojedinih tipova srčanog infarkta jest različita, stoga je točna i pravovremena diferencijalna dijagnoza neophodna za prilagodbu liječenja u skladu s uzročnim mehanizmima (2). S obzirom na mehanizam nastanka samog oštećenja provodi se klasifikacija srčanog infarkta. Podjela u pet kategorija potvrda je široke heterogenosti patofioziologije i samog uzročnika bolesti (1). Tip 1 definira se kao nekroza miocita uzrokovana redukcijom opskrbe miokarda krvlju i intraluminarne tromboze zbog rupture, ulceracije, puknuća, erozije ili disekcije aterosklerotičnog plaka. Neravnoteža između zahtjeva miokarda za kisikom i dotoka krvi, to jest sekundarna ishemija karakteristika je srčanog udara tipa 2. Nastaje kao posljedica akutne i teške anemije, koronarnog vazospazma, endotelijalne disfunkcije, toksičnog efekta endogenih ili egzogenih kateholamina, stanja šoka, koronarne embolije, respiratornog ili srčanog zatajenja te hipertenzije ili hipotenzije (4). Iako je razina srčanog troponina viša kod razvitka srčanog infarkta tipa 1, veću smrtnost ima tip 2 upravo zbog multifaktorijalnog uzroka koji ima veću prevalenciju kod starijeg stanovništva (5). Infarkt miokarda tipa 3 predstavlja dijagnostički izazov kliničarima zbog iznenadne kardiološke smrti prilikom koje nije moguće dokazati porast biokemijskih markera, ali su prisutni simptomi koji ukazuju na miokardijalnu ishemiju poput promjena na EKG-u ili

novonastalog bloka lijeve grane (1, 6). Prilikom postupka mehaničke revaskularizacije perkutane koronarne intervencije može doći do infarkta miokarda tipa 4, dok je uzrok tipa 5 komplikacija prilikom ugradnje premosnice (7).

1.1.2. Kriteriji određivanja srčanog infarkta

Povećanjem saznanja o patogenezi srčanog infarkta, te otkrićem preciznijih i osjetljivijih seroloških biomarkera u kombinaciji s točnijim slikovnim tehnikama, omogućeno je razumijevanje mehanizama koji vode do srčane ishemije te posljedično srčanog udara. Time se znatno doprinosi unapređenju dijagnoze i poboljšanju ishoda bolesti (8). Prepoznavanje simptoma srčane ishemije početni je korak u otkrivanju infarkta miokarda, a rezultat je neravnoteže potražnje i opskrbljenosti kisikom. Simptomi uključuju bol u donjoj čeljusti i prsima sa širenjem u gornjim udovima te epigastriju koja traje duže od 20 minuta. Posljedično, pacijenti su uznemireni, anksiozni i općeg lošeg stanja koje uključuje znojenje, bljedilo i osjećaj hladnoće. Kod pacijenata s dijabetesom infarkt miokarda najčešće se javlja s atipičnim simptomima, a može biti i sasvim asimptomatski. Nekoliko je osnovnih kriterija po kojima se postavlja dijagnoza infarkta miokarda, a to su: jaka i specifična bol, porast troponina i kreatin kinaze CK/CK MB kao biokemijskih markera, patološki Q zubac na EKG-u kao znak nekroze, novonastali blok lijeve grane (LBBB) i elevacija ST segmenta kao znak lezije. Točno područje zahvaćeno infarktom može se otkriti EKG-om. Oštećenje miokarda detektira se povećanom koncentracijom osjetljivih i specifičnih biomarkera u krvi, najznačajniji su srčani troponin i izoenzim kreatin-kinaze CK-MB. Srčani troponin I i T su komponente kontraktilnog organa miokardijalnih stanica i eksprimirani su isključivo u srcu, također imaju visoku specifičnost kao i kliničku osjetljivost (9). Iako povećanje ovih biomarkera u krvi ukazuje na nekrozu srčanih stanica, ono ne indicira mehanizam nastanka infarkta. Različite su mogućnosti zbog kojih može doći do otpuštanja strukturalnih proteina miokarda, uključujući normalnu razgradnju stanica miokarda, apoptozu, stanično otpuštanje produkata razgradnje troponina te povećanje propusnosti staničnog zida. Upravo iz tog razloga vrlo je bitno razlikovati povećanje ili pad razine troponina od njegovog kroničnog povećanja koje nema tendeciju razviti infarkt. Povećanje koncentracije troponina definirano je kao vrijednost koja premašuje 99 percentila od referentne vrijednosti populacije. Vrijednosti se iskazuju kao nanogrami po litri ili pikogrami po mililitru kako bi se prikazao cijeli broj.

Optimalna preciznost određivanja troponina opisana je pomoću koeficijenta varijacije za svaki test koji iznosi ≤10%. Ako test troponina nije moguće provesti, najbolja alternativa je izoenzim kreatin kinaze (10). Od pojave simptoma do porasta troponina u krvi treba proći 2 – 4 sata, dok do porasta CK-MB izoenzima treba pričekati do 6 sati (9, 11).

1.2.Cirkadijalni ritam

Sposobnost prilagodbe okolišu esencijalni je element svakodnevnog ljudskog preživljavanja. Cirkadijalni ritam predstavlja oscilacije biokemijskih, fizioloških te funkcija ponašanja organizma s periodom od 24 sata, kontrolirane djelovanjem suprahijazmatske jezgre locirane u prednjem dijelu hipotalamusa (12). Upravo zbog toga što je većina organizama izložena dnevnoj izmjeni svjetla i mraka, cirkadijalni ritam najčešće je uočen biološki ritam u prirodi, on je sinkroniziran sa Zemljinom rotacijom. Za sva živa bića izazov je sinkronizirati svoje fiziološke i tjelesne potrebe u skladu s cirkadijalnim ritmom. Uočen je u rasponu organizama od cijanobakterije do ljudske populacije, a njegovo prisustvo sačuvano tijekom godina evolucije sugerira da posjeduje selektivne sposobnosti. Promjene su regulirane dnevnim ciklusima hormonske aktivnosti, endokrinog pravovremenog utjecaja na kardiovaskularnu aktivnost, rastom stanica, renalnom filtracijom i mobilizacijom nutrijenata uz kontrolu autonomnog živčanog sustava (13, 14). Cirkadijalni ritam ima tri osnovna obilježja. Prvo obilježje je urođena sposobnost organizma koja je ostala očuvana unatoč raznim okolišnim zahtjevima. Dužina cirkadijalnog perioda varira ovisno o vrsti, ali se zadržava okvirno između 22 i 25 sati. Drugo, dužina ciklusa jest kompenzirana temperaturom koja je očuvana na konstantnoj vrijednosti unatoč fiziološkom utjecaju vanjske temperature. I treće, cirkadijalni ritam sinkroniziran je s vanjskim svijetom pomoću direktne svjetlosti putem očne retine te je dominantan čimbenik i jedini relevantan fiziološki znak okoline unatoč visini temperature kao i drugim okolišnim čimbenicima. Podražaji koji signaliziraju SCN-i (engl. *Suprachiasmatic nucleus*) koje je doba dana nazivaju se Zeitgebers.

Centralni sat cirkadijalnog ritma jest suprahijazmatska jezgra koja ima ulogu uskladiti unutrašnji ciklus organizma s vanjskim ciklusom. SCN prima svjetlosni signal direktno s retine pomoću fotoreceptora koji se nazivaju unutarnje fotoreceptivne retinalne ganglijske stanice (ipRGCs). One izražavaju neobičan fotopigment nazvan melanopsin koji je selektivno

senzitivan na svjetlost kratkih valnih duljina. Fotoreceptori ipRGC dugo prenose informaciju te zbog toga nisu osjetljivi na prolaznu svjetlost koja nije povezana s dnevnom svjetlošću što ih čini idealnim. SCN kontrolira endokrine cikluse u detaljnijem i širem metaboličkom ritmu pomoću dva načina; pomoću anatomske povezanosti s centrima koji kontroliraju spavanje i budnost, SCN određuje vrijeme spavanja i sukladno s tim o spavanju ovisne događaje poput sekrecije prolaktina i hormona rasta. Te također zahvaljujući povezanosti s neuroendokrinim i autonomnim sustavom, SCN može kontrolirati hormonalne i druge cikluse neovisno o spavanju poput ciklusa melatonina i kortizola (14, 15).

Cirkadijalni ritam ograniziran je na način da SCN kontrolira i usklađuje periferne satove koje sadrži gotovo svaka stanica. Način na koji SCN djeluje su kombinacija autonomne inervacije perifernih tkiva, endokrinološko signaliziranje, temperaturni podražaji te lokalni signali. SCN kontrolira periferne oscilatore pomoću simpatičkog i parasimpatičkog puta. Od velikog broja hormona koji imaju utjecaj na organizaciju cirkadijalnog ritma, najznačajniji je glukokortikoid upravo zbog svoje uloge u metabolizmu lipida, održavanju razine glukoze u krvi te u procesima upale. Zbog karakteristike dnevne varijacije izlučivanja u održavanju ravnoteže cirkadijalnog ritma, bitnu ulogu imaju i hormoni melatonin, angiotenzin II, aldosteron, renin, katekolamin te hormon rasta (14).

1.2.1. Anatomija cirkadijalnog sustava sisavaca

Sami cirkadijalni sustav sastavljen je od tri komponente: fotoreceptora kod dovoditelja signala, oscilatora ili sata te izlaza. Sinkronizacija dnevnog ciklusa i cirkadijalnog sata toliko je bitna da mnogi organizmi imaju razne fotosenzitivne sisteme kako bi osigurali cijeli taj proces. Biljke posjeduju crveni i plavi fotoreceptor, reptili i ptice imaju tri do četiri fotoreceptorska organa, dok svi dokazi ukazuju da sisavci fotoreceptore i cirkadijalni sat imaju smještene u oku. Međutim najnovija istraživanja ukazuju na cirkadijalnu fotorecepciju putem kože, no takvi navodi još uvijek čekaju potvrdu (16, 17). Iako se nalaze u istom organu, fotoreceptori sustava za vid i cirkadijalnog sustava imaju različite histološke lokacije unutar retine, također centri za obradu slike i cirkadijalnog svjetlosnog signala imaju različit smještaj unutar mozga (13). Svjetlo za sinkronizaciju cirkadijalnog sata apsorbira se pomoću kriptokroma u ganglijskim stanicama, intraneuronima, Müllerovim i amakrinim stanicama

koje se nalaze na prednjem dijelu retine (18). Aksoni cirkadijalnog sustava pružaju se od optičkog živca do optičke hijazme i idu prema gore sve do nakupine neurona u prednjem hipotalamusu koji se naziva suprahijazmatskom jezgrom i glavni je stimulator cirkadijalnog ritma (17).

1.2.2. Geni cirkadijalnog ritma

Osnovni princip funkcioniranja bazira se na modelu autoreguliranja negativne povratne sprege u kojoj protein kao produkt pojedinog gena cirkadijalnog sata regulira svoju vlastitu transkripciju. Otkriveno je osam ljudskih gena koji se definiraju kao geni cirkadijalnog sata: *Clock, BMal1, Per1, Per2, Per3, Tim, Cry1 i Cry2*. Središnji faktori ovog modela su dvije obitelji gena: Period i Kriptokrom, koje djeluju kao transkripcijski represori, dok su *Clock i BMal1* transkripcijski aktivatori. Transkripcija ovih gena aktivirana je na početku cirkadijalnog dana pomoću kompleksa heteromera koji sadržavaju *Clock* i *Bmal1* proteine koji djeluju putem regulatornih sekvenca gena (14).

1.3.*CRY2* gen

Ljudski *CRY2* gen mapiran je na p kraku 11. kromosoma. U sisavaca proteini Period (*PER1* i *PER2*) i Kriptokrom (*CRY1* i *CRY2*) stvaraju veliki nuklearni kompleks (*PER* kompleks) i potiskuju vlastitu transkripciju. Kružna negativna povratna sprega predstavlja izravnu kontrolu završetka transkripcije (19).

1.3.1. Kriptokromi

Kriptokromi su cirkadijalni fotoreceptori sisavaca i centralne komponente molekularnog sata. Apsorbiraju svjetlost i prenose elektromagnetni signal molekularnom satu koristeći kofaktore kromofore pterin i flavin adenin dinukleotid. Miševi i ljudi imaju dva gena kriptokroma koji su različito eksprimirani na očnoj retini. Općenito, fotoreceptori su apoproteini koji sadrže jedan ili više fotoaktivnih pigmenata koji prevode svjetlosnu u kemijsku energiju ili informaciju poput intracelularnog signala. Iako se fotoreceptori i fotoaktivni pigmenti često koriste kao sinonimi, fotoaktivni pigment zapravo je kromofor fotoreceptora (13). Prvi kriptokrom izoliran je iz gorušice kao homologna sekvenca fotolipaze. Kratko nakon otkrića dodijeljena mu je funkcija u regulaciji elongacije hipokotile kao odgovor na plavu svjetlost te naziv *CRY1*. Drugi gen otkriven u genomu biljke Arabidopsis, također homologan fotolipazi, dobio je naziv *CRY2*. U usporedbi s biljkama, kod kojih svaki aspekt razvoja i obitavanja ovisi o svjetlu, fiziološki procesi u ljudskom organizmu ovisni o svjetlosti određeni su cirkadijalnim satom, stoga je pretpostavljeno da bi *CRY1* i *CRY2* mogli biti cirkadijalni fotoreceptori (20). Kriptokromi imaju 20 – 25% identičnih sekvenci s mikrobiološkom fotolazom, te 40 – 60% s fotolazom. Ljudski *CRY1* protein sastoji se od 586 aminokiselina i kodira protein od 66 kDa, dok protein *CRY2* sadrži 593 aminokiseline i kodira za protein veličine 67 kDa.

1.4.Utjecaj varijacija *CRY2* gena na nastanak infarkta miokarda

Iako još nije dokazana povezanost nijedne genetske bolesti s mutacijama gena kriptokroma, biokemijska i fotokemijska svojstva kriptokroma kao i funkcija fotoreceptora naznaka su uključenosti u funkciju cirkadijalnog sustava, a samim time i u poremećaje izazvane njegovom disfunkcijom (20). Mutacije koje imaju utjecaj na transkripciju *Per* ili *Cry*

gena ili postojanost *Per* ili *Cry* proteina mijenjaju brzinu sata (15). Cirkadijalni ritam povezan je s kardiovaskularnim sustavom što se očituje većom incidencijom određenih kardiovaskularnih stanja ovisno o dobu dana. Istraživanja su potvrdila da se stanja poput nestabilne angine, angine bez Q zupca, infarkta miokarda i srčane smrti najčešće javljaju u vremenu od šest do dvanaest sati prijepodne (21). Uzrok navedenim pojavama može se pronaći u nagloj aktivaciji simpatikusa, hiperkoagulabilnosti te povećanom izlučivanju kortizola i angiotenzina II koji su snažni vazokonstriktori. Više vrijednosti krvnog tlaka u jutarnjim satima uzrokuje aktivacija simpatikusa buđenjem, a porast krvnog tlaka rezultira porastom potražnje miokarda za kisikom. Otežavajuća je okolnost porast tonusa krvnih žila zbog otpuštanja katekolamina te dolazi do neravnoteže između potražnje i opskrbe kisikom (22).

2. Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja jest utvrditi ulogu polimorfizma *CRY2* gena kao mogućeg čimbenika podložnosti za nastanak infarkta miokarda.

Nadalje su specifični ciljevi bili:

- odrediti raspodjelu alela i modela genotipova polimorfizama gena *CRY2*
- ispitati učestalost i raspodjelu genotipova istraživanih polimorfizama gena *CRY2*
- prikazati učestalost i raspodjelu mogućih haplotipova kod ispitanika s infarktom miokarda i kontrolne skupine
- odrediti povezanost čimbenika rizika za KVB i polimorfizama gena *CRY2*

3. Ispitanici i metode

3.1.Ustroj studije

Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstvenog projekta IZIP-2014-150 „Varijabilnost gena cirkadijanog ritma u osoba s infarktom miokarda“ na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Provedena vrsta studija jest istraživanje slučajeva i kontrola. Istraživanje slučajeva i kontrola podrazumijeva usporedbu skupine ispitanika s infarktom miokarda sa skupinom ispitanika bez navedenog poremećaja, također su obje skupine strukturno izjednačene po karakteristikama koje imaju utjecaj na pojavu poremećaja.

3.2.Ispitanici

Istraživanje je provedeno na dvije skupine: ispitanici s infarktom miokarda i ispitanici kontrolne skupine. Skupina ispitanika s infarktom miokarda obuhvaća grupu od 200 pacijenata hospitaliziranih na Kliničkom odjelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem u KBC Osijek u razdoblju od svibnja 2015. do prosinca 2016. godine.

Zadani kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje: pacijenti koji su oboljeli od infarkta miokarda tipa 1 te s minimalno dva od tri uvjeta prema Thygesen i sur. Zadani uvjeti su: povećana vrijednost biokemijskog markera troponina T (veći od 0,05; iznad 99. percentile), bol u prsištu duža od 30 minuta te promjene elektrokardiograma.

Također pacijenti koji imaju dijagnozu bolesti koja je mogući uzrok infarkta miokarda nisu obuhvaćeni istraživanjem, tako su primjerice hipertenzija, dekompenzacija, valvularne greške te ugrađeni električni uređaj poput *pacemakera* bili kriteriji za isključivanje pacijenata iz ispitivane grupe.

Ispitanici iz kontrolne skupine, 200 kontrola, podudarnih po spolu i dobi, prikupljeni su u ordinacijama liječnika opće medicine u razdoblju od svibnja 2015. do prosinca 2016. godine. Kontrolnoj skupini pripadaju osobe s troponinom T manjim od 0,05; koje nisu imale infarkt miokarda, nemaju dijabetes tipa 2 te osobe koje nemaju medicinsku dokumentaciju o potvrđenoj težoj kardiovaskularnoj bolesti. Zbog složenosti nasljeđivanja čimbenika rizika za

kardiovaskularne bolesti, iz kontrolne skupine isključeni su rođaci osoba oboljelih od srčanog infarkta iz prve skupine.

3.3.Metode

Prije samog početka istraživanja neophodno je zatražiti pristanak obaviještene osobe za sudjelovanje. Istraživanje je obuhvatilo anamnestički upitnik za prikupljanje podataka o pacijentima, vađenje krvi za određivanje genetičkih varijanti gena, koju je vadilo kvalificirano medicinsko osoblje. Izvađena krv proslijeđena je u Laboratorij za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku gdje se prema standardnom protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) izolirala genomska DNA te napravila genotipizacija varijanti gena *CRY2* primjenom Taqman proba metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*).

U cilju prikupljanja općih i medicinskih podataka o svim ispitanicima, ispunjen je anamnestički upitnik. Opći podaci od interesa su životna dob, spol, radni status te povijest pušenja. Od medicinskih podataka bitni su kardiovaskularni čimbenici rizika poput hipertenzije, dislipidemije, dijabetesa tipa 1, bolesti štitne žlijezde te pozitivna obiteljska anamneza kardiovaskularnih bolesti koja je određena prisutnošću bolesti koronarnih arterija rođaka prvog koljena prije 60. godine života.

Venska krv ispitanika uzorkovana je u epruvetu od 3 ml s podtlakom (Vacutainer, Becton Dickinson) koje sadrže antikoagulans EDTA, etilendiamintetraoctenu kiselinu koja stvara komplekse s ionima kalcija te na taj način sprječava koagulaciju krvi. Izolacija genomske DNA napravljena je prema standardnom protokolu proizvođača (QIAamp, DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Procedura započinje postupkom same izolacije, za koji su potrebni QIAGEN proteaza i 100%-tni etanol. Tako obrađen uzorak pipetira se u QIAamp Mini spin column nakon čega slijede koraci pročišćavanja. Nakon centrifugiranja kolona na čiju se membranu vezala DNA, prenosi se u novu tubicu, dok se tubica s filtratom baca. Ponavlja se prethodni korak pročišćavajući izoliranu DNA prvo s puferom AW1, zatim AW2. Zadnji korak je pipetiranje AE pufera te se tako pripremljen uzorak može čuvati na temperaturi od -30 do -15 °C do daljnje analize (23).

Laboratorijska metoda lančane reakcije polimerazom pouzdana je i precizna tehnika umnažanja u velikom broju željenog DNA fragmenta koja se koristi u mnogim područjima biologije i medicine. Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) modifikacija je početne metode sa svrhom optimizacije. Tako *real time PCR* ima prednost u vrlo maloj količini potrebnog uzorka za analiziranje, kao i to što se produkt vizualizira kontinuirano po nastanku. Fluorescentna boja vezana je za prigušivač te emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja, što označava vezanje za novonastalu dvolančanu DNA. Jačina fluorescencije razmjerna je produktu PCR-a tako da mjerenjem fluorescencije mjerimo novonastalu DNA. Metoda je karakteristična zbog upotrebe visoko specifičnih početnica te DNA polimeraze. Nakon denaturacije dvolančane DNA, početnice se vežu na način da ograniče područje DNA od interesa te su upravo zbog toga potrebne dvije specifične oligonukleotidne početnice približne dužine od 20 parova baza. Nakon vezanja početnica, DNA polimeraza produljuje željeni segment DNA (24). Najčešće korištena je Taq polimeraza, izolirana iz bakterije Thermus aquaticus, termostabilna te s najvećom aktivnošću na temperaturi od 70 °C (25). Izmjenom denaturacije i hibridizacije pri određenim temperaturama postiže se elongacija lanaca i umnažanje produkta. Genetičke varijacije gena *CRY2* prikazane u Tablici 1, ispitane su primjenom TaqMan metodologije. Odabir SNP-ova temeljio se na saznanjima o ulozi ispitivanog *CRY2* gena u molekularnom mehanizmu regulacije cirkadijalnog ritma te povezanosti rizičnih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih bolesti s polimorfizmom gena.

Tablica 1. Popis određivanih genetičkih varijacija gena cirkadijalnog ritma

Gen	Polimorfizam	Promjena u DNA	Funkcija
CRY2	rs2292912	C/G	intronska supstitucija
	rs10838524	A/G	intronska supstitucija

TaqMan set sastoji se od neobilježenih početnica i TaqMan probe koja na svom 5' kraju veže fluorescentnu boju VIC™ ili FAM™ dok je na 3' kraju vezan prigušivač te se veže na fragment od interesa. Princip metode temelji se 5-3 egzonuklearnoj aktivnost Taq DNA polimeraze te mogućnosti da razgradi TaqMan probu, što dovodi do razdvajanja fluorescentne boje i prigušivača te nastanka fluorescentnog signala. Protokol PCR reakcije prikazan je u Tablici 2 (26). Sadržaj PCR reakcijske smjese prikazan je u Tablici 3.

Tablica 2. Temperaturni ciklusi korišteni za umnažanje željenog odsječka *CRY2* gena

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Denaturacija	95℃	10 min	1x
Denaturacija	92℃	15 sec	40x
Hibridizacija	60℃	1 min	40x
Elongacija	60℃	1 min	40x

Tablica 3. Sadržaj PCR reakcijske smjese.

Sadržaj	Volumeni
PCR Master Mix 2x	6,25 µl
SNP Taqman probe mix	0,31 µl
H_2O (deionizirana i demineralizirana)	3,44 µl
DNA	2,5 µl
UKUPNO	12,5 µl

3.4.Statističke metode

Za statističku obradu podataka koristio se program Statistica 12.7 (StatSoft Inc. TULSA, OK, USA). Napravljena je deskriptivna statistička obrada podataka te su se razlike numeričkih varijabli između dvije skupine testirale t-testom za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U testom, ovisno o njihovoj distribuciji, dok se Pearsonov $\chi 2$ test koristio za prikaz razlika između kategoričkih varijabli.

Testiranje razlike u distribuciji i frekvenciji javljanja alela proveden je $\chi 2$ testom. Omjeri rizika (OR, engl. *odds ratio*) i 95%-tni intervali pouzdanosti (95% CI, engl. *confidence intervals*) određeni su kako bi se usporedila raspodjela alela i genotipova među ispitivanim pacijentima i kontrolama. Dodatan korak u procjeni kontrole genotipova, zbog mogućeg odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, predstavlja $\chi 2$ test o pretpostavljenom obliku raspodjele genotipova. Pomoću mrežnog alata SHEsis ili SNPStats programa procjenjuju se frekvencije haplotipova te njihova povezanost s infarktom miokarda, kao i razlike učestalosti haplotipova između pacijenata s infarktom miokarda i kontrolne skupine. Razina značajnosti postavlja se na $P<0,05$. Sve dobivene P vrijednosti prilagođene su u skladu s Bonferronijevim testom za višestruko testiranje.

4. Rezultati

4.1.Rezultati anamnestičkog upitnika

U Tablici 4 prikazani su opći demografski podaci svih 400 ispitanika. Srednja vrijednost životne dobi je 64 godine sa standardnom devijacijom od 13 godina, 44,5% ispitanika čine žene, dok je udio muške populacije 54,5%. Također je učestalost kardiovaskularnih čimbenika rizika unutar skupina ispitanika koji su preboljeli infarkt miokarda i ispitanika kontrola prikazana u Tablici 5.

Tablica 4. Opći demografski podaci ispitanika uključenih u istraživanje

	Pacijenti (n=200)	Kontrole (n=200)
Dob, srednja vrijednost (SD)	67 (12)	62 (13)
Pušenje	n (%)	n (%)
Nepušači	66 (49,5)	151 (75,5)
Pušači	41 (20,5)	39 (19,5)
Bivši pušači	60 (30)	10 (5)
Radni status		
Zaposlen	32 (16)	30 (28,5)
Nezaposlen	23 (11,5)	13 (6,5)
Umirovljen	145 (82,5)	130 (65)

Numerički podaci prikazani su kao srednja vrijednost i pridružena standardna devijacija (SD), dok su kategorički podaci prikazani kao broj i postotak.

Tablica 5. Učestalost kardiovaskularnih čimbenika rizika među ispitanicima.

KVB čimbenici rizika	Pacijenti (n=200)	Kontrole (n=200)	P vrijednost
	n (%)	n (%)	
Hipertenzija	107 (53,5)	59 (29,5)	0,892
Dislipidemija	26 (13)	23 (11,5)	**0,048**
Diabetes mellitus I	1 (1)	2 (1,9)	0,886
Bolesti štitne žlijezde	8 (4)	6 (6,3)	0,612
Pozitivna obiteljska anamneza KVB*	47 (23,5)	27 (13,5)	0,754

*Obiteljska anamneza KVB određena je postojanjem bolesti koronarnih arterija u rođaka prvog koljena prije 60. godine života.

4.2.Analiza genetičkih varijacija *CRY2* gena

Srednja vrijednost koncentracije DNA uzoraka iznosila je 58,5 μl/ml sa standardnom devijacijom od 13,4 μl/ml. Učestalost genotipova ispitivanih polimorfizama u skupini oboljelih i kontrolnoj skupini u skladu je s predviđenim učestalostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi ($P<0,05$).

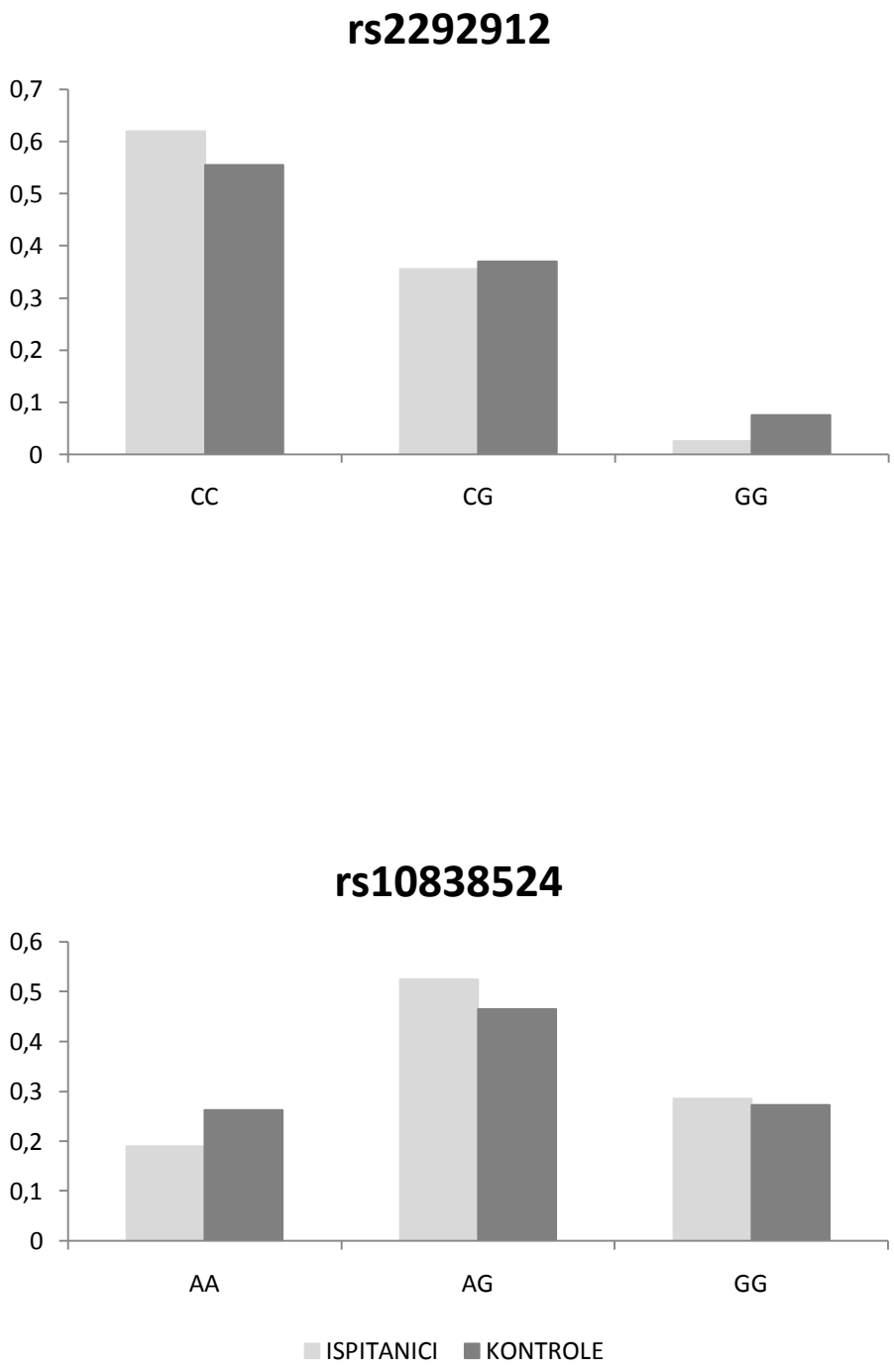
Raspodjela učestalosti alela polimorfizama gena *CRY2* te raspodjela dominantnih i recesivnih modela genotipova opisana je u Tablici 6. Slika 1 te Tablica 7 prikazuju učestalost genotipova istraživanog *CRY2* gena cirkadijalnog ritma.

Tablica 6. Raspodjela alela i modela genotipova polimorfizama gena *CRY2*

	Učestalost alela				Učestalost genotipova					
	Rjeđi alel	MAF* ispitanici	MAF* kontrole	P	Dominantni model			Recesivni model		
					P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
CRY2										
rs2292912	G	0,203	0,260	0,054	0,187	0,76	0,51-1,14	**0,028**	0,32	0,11-0,89
rs10838524	A	0,453	0,495	0,230	0,785	0,94	0,61-1,46	0,084	0,66	0,41-1,06

*MAF- engl. *minor allele frequency*

Povezanost polimorfizama gena *CRY2* rs2292912 i rs10838524 s infarktom miokarda nije utvrđena. Nakon korekcije za višestruko testiranje prema Bonferroniju razlike u učestalosti alela i genotipova nisu dosegnule zadani prag značajnosti. Međutim postoji iznimka kod SNP-a rs2292912 gdje je pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova (P=0,028; OR=0,32; 95% CI=0,11-0,89).

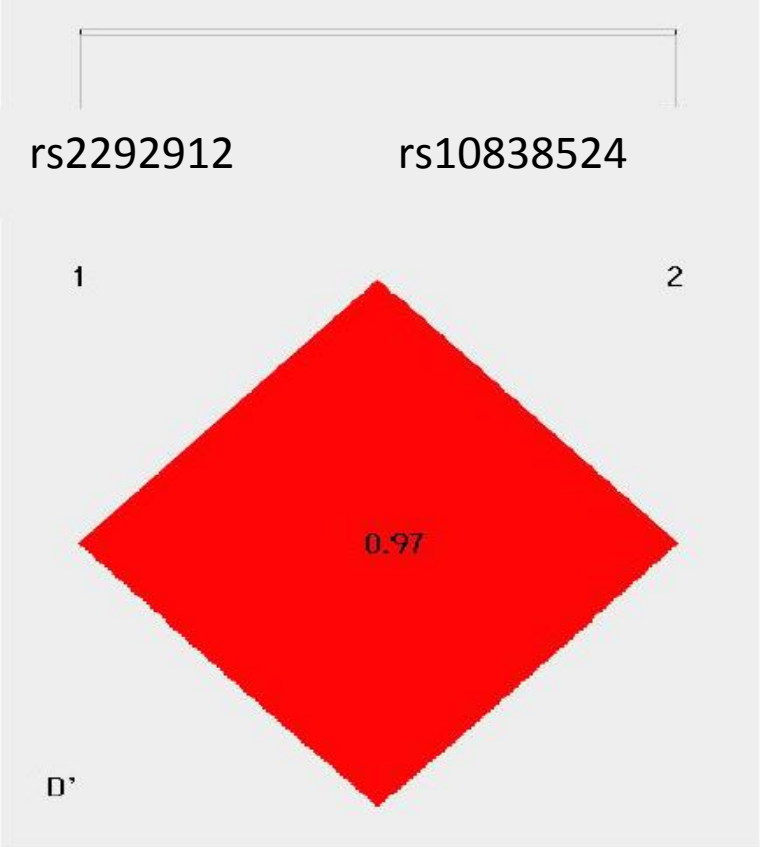


Slika 1. Učestalost genotipova istraživanog *CRY2* gena cirkadijalnog ritma

Tablica 7. Učestalost genotipova istraživanih polimorfizama gena *CRY2*.

		Aleli		Genotipovi (%)							
Gen	SNP	1	2	Ispitanici s MI			Kontrole			P vrijednost	X^2
				11	12	22	11	12	22		
CRY2	rs2292912	C	G	124 (62%)	71 (35,5%)	5 (2,5%)	111 (55,5%)	74 (37%)	15 (7,5%)	0,056	5,78
CRY2	rs10838524	A	G	38 (19%)	105 (52,5%)	57 (28,5%)	52 (26,3%)	92 (46,5%)	54 (27,3%)	0,212	3,11

Slika 2 prikazuje rezultate analize neravnoteže povezanosti istraživanih polimorfizama gena *CRY2* cirkadijalnog ritma. Povezanost ispitivanih polimorfizama je veća što je vrijednost relativnog koeficijenta vezane ravnoteže (D') bliže jedan.



Slika 2. Neravnoteža povezanosti polimorfizama gena *CRY2* cirkadijalnog ritma i relativni koeficijent vezane neravnoteže (D').

Također su analizirani haplotipovi gena *CRY2*. U Tablici 8 prikazane su učestalosti predviđenih haplotipova. Statistički značajna razlika nije pronađena kod tri najčešća haplotipa za dva polimorfizma gena *CRY2*.

Tablica 8. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova kod ispitanika s infarktom miokarda i kontrolne skupine.

	Gen *CRY2*				
	rs2292912	rs10838524	Učestalost (pacijenti)	Učestalost (kontrole)	P vrijednost
1	C	A	0,254	0,238	0,616
2	C	G	0,544	0,502	0,232
3	G	A	0,199	0,257	0,052

Otkrivena je povezanost polimorfizma rs10838524 *CRY2* gena s hipertenzijom u skupini ispitanika oboljelih od srčanog infarkta (P=0,041; $\chi 2$=6,40; df=2), međutim ne i u kontrolnoj skupini. Nadalje polimorfizam rs2292912 gena *CRY2* povezan je s dislipidemijom u muških ispitanika (P=0,019; $\chi 2$=7,85; df=2), dok je u kontrolnoj skupini povezan s pušenjem kod muškaraca (P=0,029; $\chi 2$=10,73; df=4).

Povezanost polimorfizama *CRY2* gena i čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti u pojedinoj skupini ispitanika prikazan je u Tablici 9 te predstavlja Mann-Whitney U test.

Tablica 9. Povezanosti čimbenika rizika za KVB i polimorfizama gena *CRY2*

	rs2292912		rs10838524	
	Pacijenti	Kontrole	Pacijenti	Kontrole
Pušenje	0,518	0,608	0,94	**0,035**
Hipertenzija	0,747	0,682	0,585	0,736
Dislipidemija	0,23	0,803	0,47	0,819
Dijabetes mellitus I	0,27	0,961	0,402	0,434
Bolesti štitne žlijezde	0,933	0,157	**0,046**	0,596
Pozitivna obiteljska anamneza KVB	0,8	**0,009**	0,47	0,091

5. Rasprava

U ovom diplomskom radu istražila se povezanost polimorfizama gena *CRY2* cirkadijalnog ritma s nastankom infarkta miokarda. Istraživanje je provedeno kao analiziranje slučajeva i kontrola, čime je obuhvaćeno 200 osoba s preboljenim infarktom miokarda tipa 1 i 200 kontrolnih ispitanika prikupljenih u razdoblju od svibnja 2015. do prosinca 2016. godine. Ispitanici skupine slučajeva odabrani su prema kriterijima za uključivanje u istraživanje, a to su pacijenti koji su oboljeli od infarkta miokarda tipa 1, te sa minimalno dva od tri kriterija: povećana vrijednost biokemijskog markera troponina T (veći od 0,05; iznad 99. percentile), bol u prsištu duža od 30 minuta ili promjene elektrokardiograma. Pacijenti koji imaju dijagnozu bolesti koja je mogući uzrok infarkta miokarda poput hipertenzije, dekompenzacije, valvularne greške te ugrađenog električnog uređaja poput *pacemakera* nisu obuhvaćeni u istraživanju. Kontrolnu skupinu činile su osobe s troponinom T manjim od 0,05, bez preživljenog infarkta miokarda, kao i dijagnoze dijabetesa tipa 2 te osobe koje nemaju medicinsku dokumentaciju o težoj kardiovaskularnoj bolesti.

Polimorfizme gena *CRY2* istražili smo kao čimbenike podložnosti za infarkt miokarda zbog uloge cirkadijalnog ritma u funkciji kardiovaskularnog sustava na što nas upućuje veća učestalost javljanja infarkta miokarda u jutarnjim satima. Mutacije koje imaju utjecaj na transkripciju *Per* ili *Cry* gena ili postojanost *Per* ili *Cry* proteina mogu promijeniti brzinu cirkadijalnog ritma. Povećana incidencija infarkta miokarda može se povezati s nekoliko čimbenika, prvi od njih porast je aktivnosti simpatikusa uzrokovan buđenjem što dovodi do povećanih vrijednosti krvnog tlaka. Na vrijednost krvnog tlaka, kao i razinu glukoze u krvi, utječe hormon kortizol koji vršne vrijednosti doseže u jutarnjim satima. Nadalje dolazi do povišenja vrijednosti katekolamina i angitenzina II, jakih vazokonstriktora. Utjecajem navedenih čimbenika dolazi do narušavanja ravnoteže potrebe i opskrbljenosti miokarda kisikom. Također cirkadijalni ritam ima utjecaj i na koagulacijski sustav; smanjena fibrinolitička aktivnost, a povećana agregacija trombocita u jutarnjim satima predispozicija su za nastanak tromba (15, 21, 22).

Provedena je analiza dva polimorfizma gena *CRY2*: rs2292912 i rs10838524. Nije utvrđena povezanost polimorfizama s infarktom miokarda, uz izuzetak polimorfizma rs2292912 gdje je pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova. Također su analizirani haplotipovi gena *CRY2* te nije pronađena statistički značajna razlika kod tri

najčešća haplotipa za dva polimorfizma gena *CRY2*. Otkrivena je povezanost polimorfizma rs10838524 s hipertenzijom u ispitanika. Polimorfizam rs2292912 povezan je s dislipidemijom u ispitanika muškog spola, dok je u skupini kontrola povezan s pušenjem također kod kontrola muškog spola. Uočena povezanost polimorfizama *CRY2* gena upućuje na moguće postojanje drugih čimbenika čija kombinacija može imati značaj za podložnost nastanku infarkta miokarda.

Navedeni polimorfizmi istraživani su kao čimbenici podložnosti različitim poremećajima. Polimorfizam rs2292912 istraživan je u sklopu analize polimorfizama gena cirkadijalnog sustava upravo zbog povećane pojave dijabetesa tipa 2 kod osoba s poremećajem u cirkadijalnom sustavu. Tek provođenjem metaanalize određena je uvjetna statistička povezanost polimorfizma *CRY2* gena i pojave dijabetesa (27). Polimorfizam je pokazao statistički značajnu povezanost u istraživanju varijacija gena cirkadijalnog ritma s učestalošću pojave raka prostate. Geni cirkadijalnog ritma istraživani su zbog raznolikog utjecaja na biološke puteve povezane s mehanizmom oboljenja, ponajviše na regulaciju razine spolnih hormona (28). Polimorfizam rs10838524 istraživan je kao mogući čimbenik podložnosti poremećajima raspoloženja kao što su kronična depresija i bipolarni poremećaj tipa 1 (29).

Lamia i suradnici zaključili su da rezultati njihovog istraživanja otkrivaju specifični mehanizam kojim kriptokromi djeluju na centralni sat i kompleksne genomske sklopove cirkadijalnog ritma koji podupiru metaboličku homeostazu. Prikazali su da dva cirkadijska regulatora, *Cry1* i *Cry2*, djeluju u interakciji s glukokortikoidnim receptorom i mijenjaju transkripcijski odgovor glukokortikoidima u mišjim embrijskim fibroblastima; nedostatak kriptokroma znatno smanjuje represiju gena i približno udvostručuje broj dexamethason-induciranih gena, što upućuje na to da kriptokromi sprječavaju aktivaciju glukokortikoidnog receptora i potiču represiju (30).

Današnji način života u kojem produktivnost zahtijeva cjelodnevnu aktivnost ugrožava biološki sustav koji regulira naše unutarnje ritmove. Loše navike spavanja i užurbani način života štetni su za skladne fiziološke i metaboličke tjelesne sustave te imaju veliki utjecaj na zdravlje ljudske populacije. Preko tri milijuna perifernih staničnih satova koje nadzire SCN upravljaju većinom aspekata fiziologije i ponašanja ljudskog organizma. Važnost biološkog sata za zdravlje dokazana je u istraživanju čiji su rezultati pokazali da miševi kojima nedostaju *Cry*1 i *Cry2* gen pate od hipertenzije. U tim miševima novi 3β-hidroksil-steroid dehidrogenaza (3β-Hsd) gen pod kontrolom sata prekomjerno je izražen specifično u stanicama koje proizvode aldosteron, što dovodi do hiperaldosteronizma i hipertenzije ovisne

o unosu soli. Humani homolog tog enzima specifičnog za proizvodnju aldosterona predstavlja novu mogućnost u patogenezi hipertenzije (31). Upravo zbog tih saznanja, ali i činjenice da infarkt miokarda unatoč razvoju dijagnostike i unapređenju liječenja i dalje zauzima visoko mjesto među uzrocima smrtnosti u svijetu, geni cirkadijalnog ritma i dalje znanstvenicima ostaju područje od velikog interesa.

6. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da povezanost polimorfizma *CRY2* gena i infarkta miokarda nije dokazana:

- Nije utvrđena povezanost polimorfizama rs2292912 i rs10838524 gena *CRY2* s infarktom miokarda. Statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova pronađena je kod polimorfizma rs2292912 gena *CRY2* (recesivan model nasljeđivanja).
- Nije pronađena statistički značajna razlika kod tri najčešća haplotipa za dva istraživana polimorfizma *CRY2* gena.
- Pronađena je povezanost polimorfizma rs10838524 gena *CRY2* s hipertenzijom u skupini ispitanika koji su preboljeli infarkt miokarda.
- Polimorfizam rs2292912 gena *CRY2* povezan je s dislipidemijom u muških ispitanika, dok je u kontrolnoj skupini povezan s pušenjem kod muškaraca.

7. Sažetak

Varijabilnost *CYR2* gena kod pacijenata s infarktom miokarda

Cilj istraživanja. Cilj istraživanja bio je utvrditi ulogu polimorfizma *CYR2* gena kao mogućeg čimbenika podložnosti za nastanak infarkta miokarda.

Nacrt studije. Istraživanje slučajeva i kontrola.

Ispitanici i metode. Sudionici istraživanja bili su 200 pacijenata u skupini slučajeva s preboljenim infarktom miokarda, hospitaliziranih u Kliničkom bolničkom centru Osijek i 200 ispitanika kontrola odabranih u ordinaciji obiteljskih liječnika. Napravljena je genotipizacija dva polimorfizma *CRY2* gena, rs2292912 i rs10838524. Istraživanje je obuhvatilo upitnik za prikupljanje anamnestičkih podataka, vađenje krvi, izolaciju genomske DNA iz pune krvi te genotipizaciju varijanti *CRY2* gena primjenom Taqman metodologije za lančanu reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Rezultati. Nije utvrđena povezanost polimorfizama rs2292912 i rs10838524 gena *CRY2* s infarktom miokarda. Iznimka je polimorfizam rs2292912 gdje je pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova. Pronađena je povezanost polimorfizma rs10838524 s hipertenzijom u skupini slučajeva, ali ne i u kontrolnoj skupini. Polimorfizam rs2292912 povezan je s dislipidemijom u muških ispitanika skupine slučajeva, dok je u kontrolnoj skupini povezan s pušenjem kod muškaraca.

Zaključak. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da odabrani polimorfizmi *CRY2* gena nisu čimbenici podložnosti za nastanak infarkta miokarda.

Ključne riječi: cirkadijalni ritam; *CRY2* gen; infarkt miokarda; polimorfizam jednog nukleotida

8. Summary

Polymorphism of *CRY2* gene in patients with myocardial infarction.

Objectives. The aim of the research was to determine the role of polymorphism in *CRY2* genes as possible susceptibility factors for myocardial infarction.

Study design. Case-control study.

Participants and methods. The case group consisted of 200 patients with a history of myocardial infarction, hospitalized in the Clinical Hospital Center Osijek. The control group consisted of 200 subjects recruited at general practitioners. Two polymorphisms in *CRY2* gene were analyzed: rs2292912 and rs10838524. The study included a questionnaire, blood sampling, isolation of genomic DNA, and genotyping a single nucleotide polymorphisms using the Taqman methodology and polymerase chain reaction in real time.

Results. There was no correlation between SNPs rs2292912 and rs10838524 of gene *CRY2* with myocardial infarction. SNP rs10838524 is associated with hypertension in the group of cases, whereas SNP rs2292912 is associated with dyslipidemia within male subjects.

Conclusion. Based on the results it can be concluded that the selected gene *CRY2* polymorphisms do not pose risk of myocardial infarction.

Key words: circadian rhythm; *CRY2* gene, myocardial infarction, single nucleotide polymorphism.

9. Literatura

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. Glob Heart. 2012;7:275–95.
2. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Cardiac troponins and mortality in type 1 and 2 myocardial infarction. Clin Chem Lab Med. 2017;55:181–8.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, i sur.; American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2016;133:447–5.
4. Sandoval Y, Smith SW, Thordsen SE, Apple FS. Supply/demand type 2 myocardial infarction: should we be paying more attention? J Am Coll Cardiol. 2014;63:2079–87.
5. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Chest pain, dyspnea and other symptoms in patients with type 1 and 2 myocardial infarction. A literature review. Int J Cardiol. 2016;215:20–2.
6. Landes U, Bental T, Orvin K, Vaknin-Assa H, Rechavia E, Iakobishvili Z, i sur.; Type 2 myocardial infarction: A descriptive analysis and comparison with type 1 myocardial infarction. J Cardiol. 2016;67:51–6.
7. Harris BM, Nageh T, Marsden JT, Thomas MR, Sherwood RA. Comparison of cardiac troponin T and I and CK-MB for the detection of minor myocardial damage during interventional cardiac procedures. Ann Clin Biochem. 2000;37:764–9.
8. Lippi G, Franchini M, Cervellin G. Diagnosis and management of ischemic heart disease. Semin Thromb Hemost. 2013;39:202–13.
9. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. J Am Coll Cardiol. 2006;48:1–11.
10. Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2007;50:2173–95.

11. Twerenbold R, Jaffe A, Reichlin T, Reiter M, Mueller C. High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges? Eur Heart J. 2012;33:579–86.
12. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. Continuum (Minneap Minn). 2013;19:132–47.
13. Sancar A. Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. Annu Rev Biochem. 2000;69:31–67.
14. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. Annu Rev Neurosci. 2012;35:445–62.
15. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. J Endocrinol. 2007;195:187–98.
16. Ono D, Honma S, Honma K. Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus. Nat Commun.2013;4:1666.
17. Campbell SS, Murphy PJ. Extraocular circadian phototransduction in humans. Science. 1998;279:396–9.
18. Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:6097–102.
19. OMIM Online Mendelian Inheritance in Man-An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Dostupno na stranici:http://omim.org/entry/603732?search=cry2%20&highlight=cry2 . Datum pristupa: 04. 09. 2017.
20. Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T, i sur. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. Biochemistry. 1996;35:13871–7.
21. Virag JA, Lust RM. Circadian influences on myocardial infarction. Front Physiol. 2014;5:422.
22. Martino TA, Sole MJ. Molecular time: an often overlooked dimension to cardiovascular disease. Circ Res. 2009;105:1047–61.

23. QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; Fifth Edition; May 2016 Dostupno na stranici: C:\Users\ZD\Desktop\HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW.pdf. Datum pristupa 05. 09. 2017.
24. Ambriović Ristov A. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2007.
25. Khanacademy. Polymerase chain reaction. Dostupno na adresi: https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr. Datum pristupa: 05.0 9. 2017.
26. Thermo fisher Scientific. Dostupno na adresi: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html. Datum pristupa: 06. 09. 2017.
27. Kelly MA, Rees SD, Hydrie MZ, Shera AS, Bellary S, O'Hare JP, i sur. DIAGRAM Consortium; SAT2D Consortium. Circadian gene variants and susceptibility to type 2 diabetes: a pilot study. PLoS One. 2012;7
28. Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrander EA, i sur. Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. Cancer Res. 2009;69:9315–22.
29. Kovanen L, Kaunisto M, Donner K, Saarikoski ST, Partonen T. CRY2 genetic variants associate with dysthymia. PLoS One. 2013;8
30. Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, Downes M, Evans RM. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. Nature. 2011;480:552–6.
31. Okamura H, Doi M, Yamaguchi Y, Fustin JM. Hypertension due to loss of clock: novel insight from the molecular analysis of Cry1/Cry2-deleted mice. CurrHypertens Rep. 2011;13:103–8.

10. Životopis

MATEA ZDRAVČEVIĆ
Čepinska 1, Beketinci 31403 Vuka
Telefon: (031) 394 043; Mobitel: +385 99 411 6748;
E – mail: matea.zdravcevic@gmail.com

Osobni podaci

Mjesto i datum rođenja	Osijek, 9. rujna 1993. g.
Državljanstvo	hrvatsko

Obrazovanje

rujan 2015. g. –	Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike
2012. – 2015. g.	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet u Rijeci; Fakultet zdravstvenih studija u Rijeci, Preddiplomski Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike
2008. – 2012. g.	1. gimnazija Osijek