

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tena Lovrić**

**Povezanost polimorfizma gena za  
angiotenzin II receptor tip 1 s  
pojavnosti moždanog udara u ranijoj  
odrasloj dobi**

**DIPLOMSKI RAD**



**ZAGREB, 2014.**

Ovaj diplomski rad izrađen na odjelu Neurologije III, KBC Zagreb, te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Zdravke Poljaković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013/2014.

## POPIS KRATICA

ACA	prednja moždana arterija (prema engl. <i>anterior cerebral artery</i> )
ACE	angiotenzin konvertirajući enzim (prema engl. <i>angiotensin-converting enzyme</i> )
ACM	srednja moždana arterija (prema engl. <i>middle cerebral artery</i> )
ACP	stražnja moždana arterija (prema engl. <i>posterior cerebral artery</i> )
AT1	angiotenzin 1
AT1R	angiotenzinski receptor 1
AT2	angiotenzin 2
BMI	indeks tjelesne mase (prema engl. <i>body mass index</i> )
CT	kompjutorizirana tomografija (prema engl. <i>computed tomography</i> )
CVI	cerebrovaskularni inzult
DFI	indeks smjera protoka (prema engl. <i>direction of flow index</i> )
DM	šećerna bolest ( <i>Diabetes Mellitus</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. <i>deoxiribonucleic acid</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EKG	elektrokardiografija
FA	fibrilacija atriya (prema engl. <i>fibrillatio atriorum</i> )
HNL	hormonsko nadomjesno liječenje
ICH	hemoragijski moždani udar (prema engl. <i>intracerebral hemorrhage</i> )
IMU	ishemijski moždani udar
MRS	modificirana skala rangiranja (prema engl. <i>Modified Rankin Scale</i> )

MU	moždani udar
PFO	otvoreni foramen ovale (prema engl. <i>persistent foramen ovale</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (prema engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RAS	renin angiotenzin sustav (prema engl. <i>renin–angiotensin system</i> )
RFLP	polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (prema engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SAD	Sjedinjene Američke Države
SAH	subarahnoidalno krvarenje (prema engl. <i>subarachnoid hemorrhage</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (prema engl. <i>single-nucleotide polymorphism</i> )
TIA	tranzitorna ishemijska ataka
UZV	ultrazvuk
VB	vertebrobazilarno
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. <i>World Health Organisation</i> )

## SADRŽAJ RADA

1. SAŽETAK	
2. SUMMARY	
3. UVOD	1
4. HIPOTEZA	6
5. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	7
6. ISPITANICI I METODE	7
6.1. Ispitanici	7
6.2. Metode	8
6.2.1. Genotipizacija AT1R	9
6.2.2. Kompjuterizirana tomografija (CT)	11
6.2.3. Statistička obrada podataka	12
7. REZULTATI	12
8. RASPRAVA	17
9. ZAKLJUČCI	18
10. ZAHVALE	19
11. POPIS LITERATURE	20
12. ŽIVOTOPIS	22

## 1. SAŽETAK

Tena Lovrić

# **Povezanost polimorfizma gena za angiotenzin II receptor tip 1 s pojavnosti moždanog udara u ranijoj odrasloj dobi**

Moždani udar (MU) je prvi uzrok invaliditeta u Hrvatskoj. Prema mehanizmu nastanka može se podijeliti na ishemijski i hemoragijski. MU možemo smatrati poligenim aterotrombotskim poremećajem. Pri tome sustav renin-angiotenzin (RAS) ima važnu ulogu. Angiotenzin II, dio RAS-a koji je snažan vazokonstriktor, svoje djelovanje vrši preko receptora AT1 i AT2. Gen koji kodira AT1 receptor (AT1R) ima više polimorfni oblika. Fiziološko značenje polimorfizma AT1R A1166C nije sasvim jasno.

Hipoteza ovog rada je da varijante gena *AT1R* mogu biti rizični čimbenik za MU u ranijoj odrasloj dobi. Stoga je ispitivana povezanost polimorfizma AT1R A1166C s pojavnosti ishemijskog moždanog udara (IMU) u ispitanika u dobi do 55. godine života. Ispitivanjem je obuhvaćena 301 osoba od kojih je 114 s akutnim IMU. Genotip AT1R A1166C, određen iz venske krvi, analiziran je metodom PCR/RFLP, a lokalizacija ishemije CT snimkama mozga. Statističkom analizom potvrđena je povezanost IMU s varijantama gena *AT1R* A1166C ( $p=0,004$ ). Također je ustanovljena statistički značajna povezanost genotipova AT1R A1166C s lokalizacijom IMU. Rezultati ovog rada pokazuju značajnu povezanost genetičkih čimbenika s pojavnošću IMU i njegovim smještajem te upućuju na potrebu dodatnih ispitivanja.

Ključne riječi: ishemijski moždani udar, RAS, AT1R

## **2. SUMMARY**

Tena Lovrić

### **Linkage polymorphism of angiotensin II receptor type 1 with the incidence of stroke in early adulthood**

Stroke is the most common cause of severe long-term disability in Croatia. Two main types of stroke include ischemic stroke (IS) and hemorrhagic stroke. Stroke can also be considered as atherothrombotic polygenic disorder where the renin-angiotensin system (RAS) plays an important role. The angiotensin II, a part of the RAS, acts through AT1 and AT2 receptors. The gene encoding for the AT1 receptor (AT1R) has several polymorphic forms. The physiological significance of AT1R A1166C polymorphism is not entirely clear.

The hypothesis of this study was that the variant at the AT1R gene may be a risk factor for the incidence of stroke in early adulthood. The connection of AT1R A1166C polymorphism with the incidence of IS in patients under the age of 55 was examined. 301 persons were included in the study, among them 114 with acute IS. The AT1R A1166C genotype, determined from venous blood, was analyzed by PCR/RFLP, while localization of stroke was determined from brain CT scans. Statistical analysis confirmed the connection of IS with the variants of gene AT1R A1166C ( $p=0.004$ ). Also significant connection of genotypes AT1R A1166C with the localization of stroke was found. The results of this study support the assumption of influence of genetic factors on stroke incidence and localization.

Key words: ischemic stroke, RAS, AT1R

### **3. UVOD**

#### *Moždani udar*

Moždani udar je prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) naglo nastali žarišni ili, rjeđe globalni gubitak moždane funkcije/funkcija sa simptomima koji traju duže od 24 sata ili dovode do smrti, a može se objasniti samo poremećajem moždane cirkulacije odnosno perfuzije. Nastaje zbog ishemije (nedostatak protoka krvi) ili krvarenja (istjecanja krvi), pa se prema mehanizmu nastanka dijeli na infarkt mozga (ili ishemijski moždani udar (IMU)), intracerebralno krvarenje (ili hemoragijski moždani udar (ICH)) i subarahnoidalno krvarenje (SAH). Također se može podijeliti i prema dužini trajanja simptoma na tranzitornu ishemijsku ataku (TIA), moždani udar u razvoju i završeni moždani udar (Brinar i sur., 2009).

#### *Epidemiologija*

Moždani udar je vodeći uzrok invaliditeta u odrasloj dobi u SAD-u, treći je uzrok smrtnosti u zemljama zapadne Europe, drugi vodeći uzrok smrti širom svijeta, a ono što je nama najbitnije, treći uzrok morbiditeta i prvi uzrok mortaliteta i invaliditeta u Hrvatskoj (Demarin, 2005). Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) godišnje u svijetu od MU umre oko 5 550 000 ljudi, a u Europi 1 280 000, odnosno svaka šesta žena i svaki deseti muškarac (Carandang i sur., 2006). Rizik ponovljenog moždanog udara, koji je po definiciji WHO, novi neurološki deficit koji zadovoljava kriterije MU, a javlja se nakon 24 sata od inicijalnog MU i nije posljedica prethodnog MU, iznimno je visok u prvom tjednu nakon pretrpljenog MU i iznosi 2-7 %. Na kraju prve godine on iznosi 17-30 %, rastući svake godine za dodatnih 5 % (Petty i sur., 2000).

#### ***Klasifikacija moždanog udara***

##### *Hemoragijski MU*

Oštećenje moždanog parenhima kod hemoragijskog MU nastaje zbog prsnuća arterije i kompresije nastalog hematoma na zdravo moždano tkivo, te izravnog toksičnog učinka raspadnih produkata krvi. Primarno intracerebralno krvarenje je životno ugrožavajuće stanje sa incidencijom 10-17 % svih moždanih udara. Prevalencija raste sa dobi tako da u bolesnika mlađih od 40 godina iznosi 2/100 000/god, a u bolesnika iznad 80 godina 350/100 000/god



(Asplund i sur., 1998). Stopa mortaliteta je, također, visoka pri čemu polovina bolesnika umire u prvih 48 sati od početka krvarenja.

Glavni čimbenici za nastanak ICH su arterijska hipertenzija, cerebralna venska tromboza i amiloidna angiopatija, ruptura intrakranijskih krvožilnih malformacija, disekcija intrakranijskih arterija, hematološke bolesti te zlouporaba droga (Brinar i sur., 2009).

### *Ishemijski moždani udar*

U ishemijskom moždanom udaru dolazi do prekida ili otežane opskrbe krvlju dijela mozga što dovodi do disfunkcije moždanog tkiva u toj regiji. Uzroci moždane ishemije dijele se u makroangiopatske promjene (aterotromboemboliju), mikroangiopatske promjene (lakunarne infarkte) i kardioembolijske promjene. Oni su uzrok 95 % ishemijskih MU ili TIA-e. Kao ostali mogući uzroci navode se arteritisi, hematološki, kongenitalni te metabolički poremećaji, traume, infekcije, tumori, trudnoća, vazospazam te postradijacijske promjene (Brinar i sur., 2009).

### *Makroangiopatija*

Ateroskleroza uzrokuje oko 50 % ishemija, pri čemu zahvaća velike i srednje velike arterije. Predilekcijska mjesta ekstrakranijalno su unutarnje karotide i ishodišta vertebralnih arterija, dok su intrakranijalno zahvaćene arterije Willisijevog kruga i bazilarna arterija.

Low-flow fenomen ili hipoperfuzija nastaje kada je stupanj stenoze veći od 75 % što povećava rizik nastanka ulceracija na plaku, stvaranja tromba i moguće rupture.

### *Mikroangiopatija*

Bolest malih krvnih žila najčešće je uzrokovana lipohijalinozom koja je gotovo uobičajena pri starenju. Krvne žile postaju tortuozne i gube elastičnost što je preduvjet za nastajanje lakunarnih infarkta.

### *Kardioembolija*

Fibrilacija atriya navodi se kao najčešći uzrok kardioembolijskog MU. Uslijed usporenja protoka krvi nastaje intramuralni ugrušak, a otkidanjem dijela ugruška nastaje embolus koji nošen strujom krvi može okludirati krvnu žilu čiji je lumen manji od njegovog promjera. Čak 10 % bolesnika s infarktom miokarda razvija ishemijski MU i to najčešće u prvih 30 dana. Od

ostalih rizičnih čimbenika navode se umjetni zalisci te perzistentni foramen ovale kao mogući izvori embolusa (Brinar i sur., 2009).

### *Patofiziologija*

Moždana cirkulacija dijeli se na prednju (karotidnu) i stražnju (vertebrobazilarnu). One se spajaju preko circulus arteriosus Willisi pomoću prednjih i stražnjih komunikantnih arterija i ujedinjuju opskrbu mozga.

Normalna moždana perfuzija iznosi otprilike 60 mL/100 g mozga/min. Neuron i glija stanice kao funkcijske jedinice mozga zahtijevaju konstantan moždani protok te opskrbu energijom (glukozom) i kisikom. Prvi znakovi ishemije javljaju se kada perfuzija padne ispod 22 mL/100 g/min, pri čemu neuron gube svoju funkciju i strukturno se oštećuju. Moždane stanice mogu preživjeti svega 5-10 minuta potpunog prekida cirkulacije, no već i djelomično smanjenje može uzrokovati ireverzibilne promjene (Brinar i sur., 2009). Područje u kojem nastanu ireverzibilne promjene koje dovode do nekroze neurona i potpornih stanica naziva se zona infarkta. Zahvaljujući razvoju anastomoza u području oko infarkta može postojati zona penumbre, tj. lokalne hipoperfuzije. Mozak se protiv poremećaja perfuzije bori autoregulacijom, koja omogućuje stalan protok unatoč oscilacijama sistemnog krvnog tlaka. Ona je učinkovita sve do pada tlaka ispod 70 mmHg. Kada je autoregulacija oštećena, cerebralna perfuzija prvenstveno ovisi o razlici sistemnog i intrakranijalnog tlaka.

### *Rizični čimbenici*

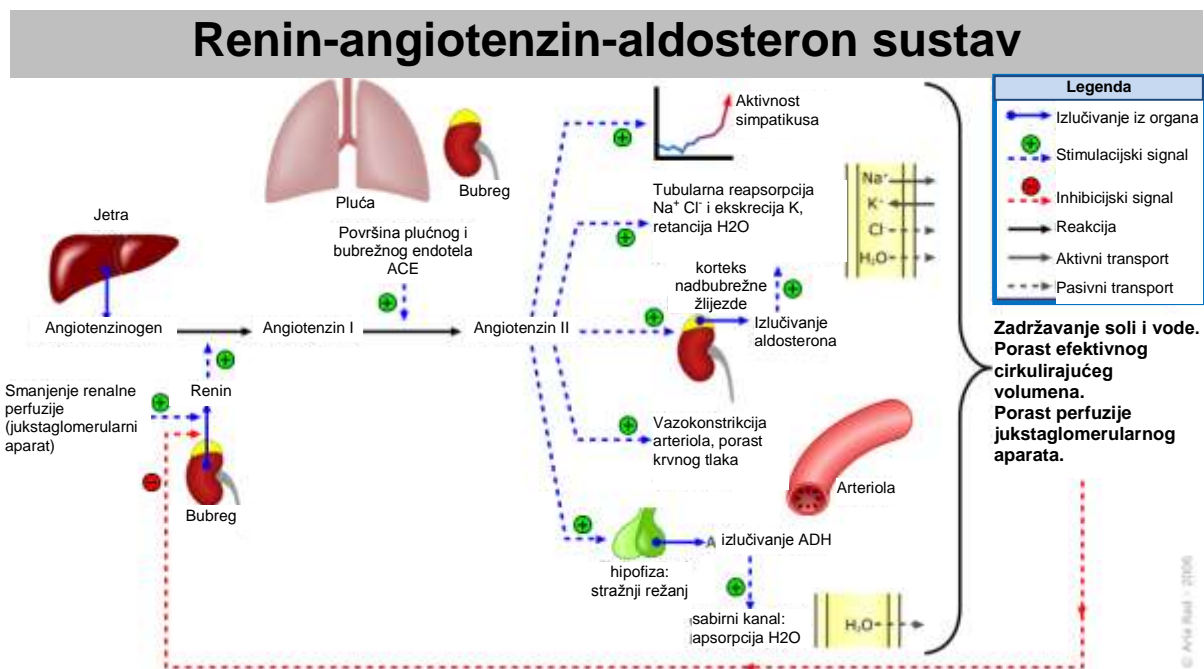
Brojni su čimbenici rizika za nastanak moždanog udara koji se dijele na promjenjive i one na koje se ne može utjecati. Promjenjivi čimbenici rizika su hipertenzija, dijabetes, visoka koncentracija kolesterola i fibrilacija atrijska, te oni povezani uz životne navike kao što su pušenje, alkoholizam, zlouporaba droga, korištenje oralnih kontraceptiva ili HNL, stres i manjak fizičke aktivnosti. U kategoriju nepromjenjivih čimbenika rizika ubrajamo stariju životnu dob, spol, rasu i preboljeli moždani udar ili TIA-u. Smatra se da je visoki krvni tlak najvažniji promjenjivi čimbenik rizika za razvoj moždanog udara (Endres i sur., 2011).

Nakon moždanog udara trećina se oboljelih oporavi do potpune samostalnosti s lakšim posljedicama, kod trećine oboljelih je posljedica trajna invalidnost i ovisnost o drugima, a trećina pacijenata odmah umire. Svaki je moždani udar zaseban, ovisi o mnogo toga, počevši

od toga koja je strana mozga pogođena, koliko su jaka oštećenja, ali i o općem stanju bolesnika.

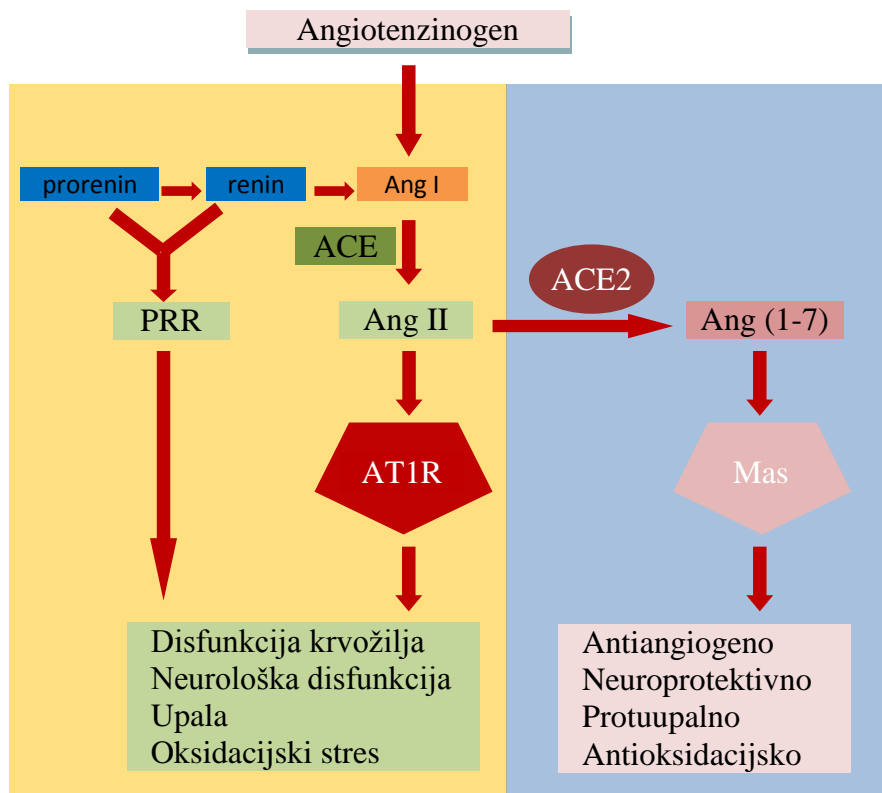
## RAS

RAS je kompleksni hormonski sustav koji regulira promet tekućina i elektrolita i arterijski tlak (Reudelhuber i sur., 2005). Kada volumen krvi u organizmu padne ispod kritične vrijednosti, jukstaglomerularne stanice bubrega počinju lučiti u cirkulaciju enzim renin gdje on djeluje na angiotenzin, glikoprotein sintetiziran u jetri. Djelovanjem renina, angiotenzin prelazi u inaktivni prohormon angiotenzin I koji nošen cirkulacijom dolazi do pluća i pretvara se u aktivni angiotenzin II s vazokonstriktornim djelovanjem. Za tu pretvorbu ključan je angiotenzin I konvertirajući enzim (ACE), koji djeluje i na bradikinin inhibirajući njegovo vazodilatacijsko djelovanje (slika 1.).



**Slika 1. Renin angiotenzinski sustav i ciljni organi djelovanja**

(slika preuzeta s commons.wikimedia.org)



**Slika 2. Djelovanje RAS sustava**

### *AT1R*

Angiotenzinski receptori pripadaju skupini G-proteinskih receptora spojenih s angiotenzinom II kao njihovim ligandima. Oni su važan dio renin-angiotenzinskog sustava. Odgovorni su za prijenos signala angiotenzina II, glavnog efektornog hormona vazokonstrikcije. AT1 i AT2 receptori dijele sekvence identiteta ~ 30 %, ali imaju sličan afinitet za angiotenzin II, koji je njihov glavni ligand. Angiotenzinski receptori su rasprostranjeni po cijelom organizmu. AT1 se nalazi u srcu, krvnim žilama, bubregu, korteksu nadbubrežne žlijezde, plućima i mozgu, te posreduje vazokonstriktorski učinak. AT2R izaziva vazokonstriktorski učinak i inhibira rast (Zhuo i sur., 2011). Angiotenzin II aktivira vazokonstriktorni (AT1) angiotenzinski receptor. Aktivirani receptor aktivira fosfolipazu C i povećava citosolnu koncentraciju  $Ca^{2+}$ , što zauzvrat aktivira stanične odgovore, između ostalog stimulira protein-kinazu C. Također inhibira adenilat-ciklazu i aktivira razne tirozin-kinaze. Učinci posredovani AT1 receptorom uključuju vazokonstrikciju, sintezu i izlučivanje aldosterona, žeđ, povećano lučenje

vazopresina, hipertrofiju srca, povećanje periferne noradrenergične aktivnosti, proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica, smanjen bubrežni protok krvi, inhibiciju bubrežnog renina, reapsorpciju natrija u tubulima bubrega, te modulaciju simpatičke aktivnosti središnjeg živčanog sustava (slika 2.).

#### *Polimorfizam gena AT1R*

Gen koji kodira AT1 receptor (*AT1R*) smješten je na kromosomu 3 i ima više polimorfnih oblika (Baudin i sur., 2004). Do sada je u epidemiološkim studijama najviše istraživana varijanta A1166C u 3'-UTR. Međutim, fiziološko značenje ovog polimorfizma nije sasvim jasno jer se nalazi u nekodirajućoj regiji gena. Asocijacijske studije između polimorfizma *AT1R* A1166C i različitih pato/fizioloških stanja rezultirale su nekonzistentnim rezultatima. Tako je objavljeno da bolesnici s genotipom *AT1R* CC imaju pojačanu vaskularnu reaktivnost (van Geel i sur., 2000) i povećanu renovaskularnu osjetljivost na Ang II (Spiering i sur., 2005). Alel *AT1R* 1166C se povezuje s esencijalnom hipertenzijom (Niu i sur. 2010), zadebljanjem aorte, infarktom miokarda (Feng i sur., 2012), srčanom hipertrofijom, malignom aritmijom (Blanco i sur., 2012) te povećanom razinom oksidacijskog stresa u bolesnika sa zatajenjem srčane funkcije (Cameron i sur., 2006). Međutim, drugi autori nisu u svojim istraživanjima potvrdili ove nalaze. Slične nekonzistentne rezultate nalazimo i u člancima koji opisuju povezanost varijanti gena *AT1R* s moždanim udarom.

U slučajevima dvosmislenosti i nejasnoća, koje su opisane i za polimorfizam gena *AT1R* preporuka je provesti istraživanje i replicirati rezultate u različitim populacijama zbog moguće razlike u učestalosti polimorfnih alela. Razlike mogu nastati i zbog nepravilnog odabira i fenotipizacije kako bolesnika tako i kontrolnih ispitanika.

Moždani udar predstavlja složene interakcije između genetičkog ustrojstva pojedinca, socijalnih i okolišnih čimbenika, stoga genetički čimbenici mogu imati u pojedinim populacijama različit utjecaj ovisan o drugim negenetičkim čimbenicima rizika za razvoj moždanog udara.

#### **4. HIPOTEZA**

Varijante gena *AT1R* mogu biti rizični čimbenik za pojavnost moždanog udara u ranijoj odrasloj dobi.

## **5. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

### **Opći cilj**

Opći cilj rada je ispitati povezanost polimorfizma AT1R A1166C s pojavnosti moždanog udara u hrvatskoj populaciji u ranijoj odrasloj dobi.

### **Specifični ciljevi**

1. Odrediti učestalost polimorfizma AT1R A1166C u hrvatskoj populaciji.
2. Ispitati povezanost polimorfizma AT1R A1166C s različitim kliničkim parametrima, koji predstavljaju čimbenike rizika za nastanak moždanog udara (dob, spol, BMI, navike pušenja, povišen krvni tlak, obiteljska anamneza, fizička aktivnost).
3. Ispitati povezanost polimorfizma AT1R A1166C s različitim lokalizacijama moždanog udara, DFI, UZV i holter EKG, te ishodom liječenja pri otpustu bolesnika iz bolnice.

## **6. ISPITANICI I METODE**

### **6.1. ISPITANICI**

U ispitivanju je ukupno sudjelovala 301 osoba (144 muškarca, 157 žena), od kojih je bilo 114 bolesnika s akutnim ishemijskim udarom, zaprimljenih kroz hitnu službu Neurološke klinike u KBC Zagreb, u razdoblju od 2008. do 2011. godine. Ciljna skupina bile su osobe rođene između 1950.-1980. godine, jer su osobe te životne dobi kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, relativno često oboljevale od moždanog udara, a koji je ipak najzastupljeniji u starijoj životnoj dobi. Skupina bolesnika je odabrana između pacijenata koji su ispunjavali sljedeće kriterije: 1) dob 30-55 godina, 2) kompjuterizirana tomografija (CT) je dokazala ishemijski moždani udar. Isključni kriteriji su bili sljedeći: 1) *Diabetes mellitus* (DM) u ranoj dobi, 2) indeks tjelesne mase, BMI >30 kg/m<sup>2</sup>, 3) dokazan hemoragijski moždani udar na CT prikazu, 4) dob >55 godina.

U kontrolnu skupinu su odabirani zdravi ispitanici među zaposlenicima KBC Zagreb koji u anamnestičkim podacima nisu navodili kardiovaskularne bolesti i koji su po spolu i dobi odgovarali skupini bolesnika. Obje skupine su pripadale istoj, bjelačkoj populaciji, s istog geografskog područja i bili su sličnog socijalnog statusa.

Bilježeni su sljedeći rizični čimbenici: hipertenzija, indeks tjelesne mase (BMI), pušenje, tjelesna aktivnost. Te su varijable bile definirane kako slijedi: hipertenzija (sistolički tlak  $\geq 140$  mmHg i dijastolički tlak  $\geq 90$  mm Hg, u dva odvojena mjerenja nakon akutne faze, ili uporaba antihipertenziva prije incidenta); povišen BMI  $>25$  kg/m<sup>2</sup> prema American Heart Association; pušenje (aktivni pušač u zadnjih pet godina, uključujući i osobe koje su pušile ranije, a prekinuli su unutar zadnjih šest mjeseci); tjelesna aktivnost: manje od 30 minuta aktivnosti dnevno 3-4 puta tjedno (trčanje, brzo hodanje, vožnja biciklom) (The American Heart Association ili The American College of Sports Medicine). Svakom su bolesniku napravljene sljedeće pretrage: UZV karotidnih arterija i srca i Holter elektrokardiografija (EKG). Na dan otpusta iz bolnice pomoću skale „*Modified Rankin Scale*“ (MRS) procijenjen je ishod bolesti (Bonita R, 1988). Također su od svakog ispitanika prikupljeni podaci o obiteljskoj anamnezi (pojavnost moždanog udara u prvoj liniji rođaka u dobi  $<55$  godina) i podaci o drugim predisponirajućim čimbenicima za ishemijski moždani udar: koronarna srčana bolest, atrijska fibrilacija, intermitentna klaudikacija. BMI je izračunat prema omjeru težina (kg)/visina (m<sup>2</sup>).

Svaki ispitanik je bio upoznat s tematikom i ciljevima istraživanja te je potpisao informirani pristanak za sudjelovanje u znanstvenom istraživanju koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kao materijal u ovom istraživanju korišteni su uzorci venske krvi (5 mL krvi s EDTA antikoagulansom) i CT snimke.

## 6.2. METODE

Za genotipizaciju AT1R koristili su se uzorci venske krvi ispitanika pohranjeni u epruvete s antikoagulansom Na – EDTA.

### 6.2.1. Genotipizacija AT1R

Genotipizacija AT1R provodila se metodom PCR/RFLP i elektroforezom u gelu agaroze (Hilgers i sur., 1999).

Očitavanjem prisutnosti/odsutnosti restrikcijskih ulomaka DNA određuje se pojedini genotip AT1R.

Predanalitička faza sastoji se od izolacije DNA metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988).

Umnažanje ulomaka gena *AT1R* duljine 428 parova baza provodi se u tubicama za PCR u ukupnom volumenu od 25 µL. Reakcijska smjesa sadrži:

- 14,5 µL sterilne destilirane vode
- 2,5 µL pufera (Roche<sup>®</sup>),
- 0,5 µL dNTP mix 5µM (Roche<sup>®</sup>),
- 1,5 µL 1U Taq polimeraze (Roche<sup>®</sup>)
- 1 µL svake početnice (TibMolBiol<sup>®</sup>):
  - AT1R uzvodna: 5'- TTC CCC CAA AAG CCA AAT CCC AC-3' (20 mM)
  - AT1R nizvodna: 5'- CAG GCT AGG GAG ATT GCA TTT CTG TCA G-3' (20 mM)
- 4 µL DNA

Umnažanje ulomaka DNA provodi se u termobloku prema specifičnim uvjetima za PCR:

početna denaturacija: 94 °C 5 min ;

amplifikacija: 35 ciklusa: 40 s 94 °C, 1 min 64 °C, 1 min 72 °C;

elongacija: 10 min na 72 °C.

### Elektroforeza

Analiza umnožaka PCR provodi se elektroforezom u agaroznom gelu.

Za elektroforezu treba pripremiti 50 mL 2 % agaroznog gela Agarosa GellyPhor LE (EuroClone<sup>®</sup>). U svaku jažicu se nanosi po 3,5 µL umnoška PCR pomiješanog s 1 µL „loading buffera“. U jednu jažicu nanosi se 1 µL molekularnog markera XII (Roche<sup>®</sup>) s 1 µL „loading buffera“ i 8 µL destilirane vode. Elektroforeza traje oko 40 minuta pri naponu od 110 V.

Provjera uspješnog umnažanja ulomaka DNA vrši se u uređaju *G-box* koji služi za vizualizaciju i snimanje gelova.



Nakon potvrde uspješnog umnažanja ulomaka DNA, provodi se digestija dobivenih produkata.

### Digestija

Digestija PCR produkta izvodi se u volumenu od 5  $\mu$ L u kojem se izmiješaju:

- 4  $\mu$ L PCR produkta
- 0,5  $\mu$ L pufera H (BioLabs<sup>®</sup>)
- 0,5  $\mu$ L DdeI (BioLabs<sup>®</sup>)

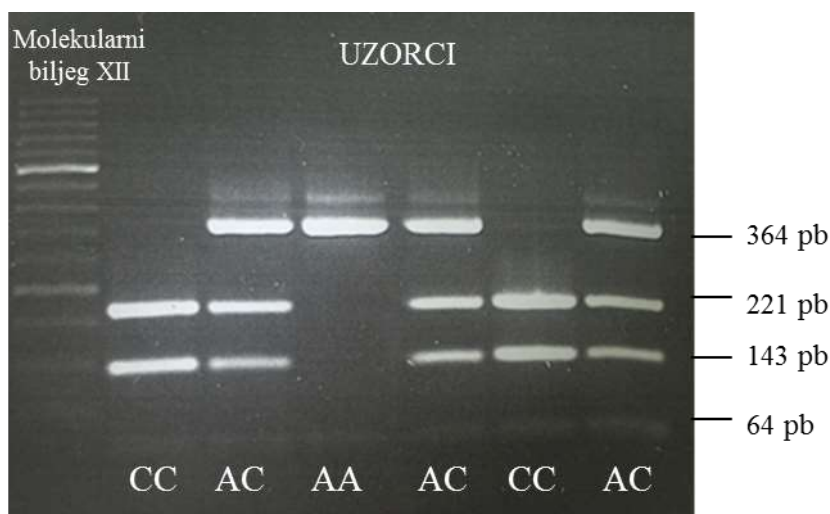
Digestija se obavlja na 37 °C 1 sat.

Analiza duljine dobivenih ulomaka DNA nakon provedene digestije provodi se na način kako je opisano u odlomku *Elektroforeza*.

Interpretacija dobivenih ulomaka DNA i određivanje pojedinog genotipa za polimorfizam AT1R A1166C provodi se u uređaju za snimanje i analizu gelova (G-box). Pomoću specijaliziranog kompjutorskog programa (*Gene Tools*) dobivene elektroforetske trake se uspoređuju s odgovarajućim molekularnim markerom. Očitavamo prisutnost fragmenata od 364, 221, 143 i 64 parova baza i njihove kombinacije, te prema tome zaključujemo o kojem se genotipu AT1R radi (Slika 3.). Pripadnost genotipu se određuje prema shemi:

**Tablica 5.** Određivanje genotipa za AT1R A1166C prema pripadajućim restrikcijskim ulomcima

Genotip	Broj parova baza
AA	364 i 64
AC	364, 221, 143 i 64
CC	221, 143 i 64



**Slika 3.** Izgled elektroforetskog gela nakon provedene elektroforeze: AA = zdravi homozigot, AC = heterozigot, CC = bolesni homozigot

### 6.2.2. Kompjuterizirana tomografija (CT)

Kompjuterizirana tomografija je slikovna dijagnostička metoda koja omogućuje prikaz anatomskih detalja u unutrašnjosti ljudskog tijela pomoću posebnog načina snimanja prolaznih intenziteta rendgenskih zraka kroz tanke slojeve tijela i računalne obrade podataka za rekonstrukciju slike. Elektronički detektori, koji su smješteni nasuprot rendgenskoj cijevi s druge strane tijela pacijenta, konvertiraju rendgenske zrake u električne impulse, koji se potom u računalu, na temelju apsorpcijskih koeficijenata rendgenskih zraka, prikazuju kao slika.

Snimanje glave obično se koristi za otkrivanje moždanog udara, tumora, kalcifikacija, krvarenja i koštane traume. Svježe krvarenje se prezentira kao hiperdenzna (svijetla) lezija.

Hemoragijski moždani udar odmah pokazuje hiperdenzitet u moždanom parenhimu, ako se radi o intracerebralnom hematomu. Ishemijske lezije na CT-u mozga vidljive su najranije 6-8 sati nakon pojave simptomatologije, a u svom punom opsegu odnosno kao jasno, demarkirano oštećenje moždanog parenhima, vidljive su nakon 24 - 48 sati od pojave simptomatologije.

### 6.2.3. Statistička obrada podataka

Statističke analize su provedene pomoću programa SPSS for Windows version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

U statističkoj obradi podataka koristio se Kolmogorov Smirnov i Mann – Whitney test, kojima se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između dvije skupine u pojavnosti i/ili iznosu ispitivanog parametra. Rezultat je izražen kao vrijednost standardne pogreške (p), koja mora udovoljavati kriteriju  $p < 0,05$  kako bi statistička razlika bila značajna.

## 7. REZULTATI

**Tablica 1.** Klinički parametri ispitanika

	n(%)	Skupina		P	C
		pacijenti	kontrolna		
Spol					
muško	74 (64,9)	70 (37,4)	<0,001	0,27	
žensko	40 (35,1)	117 (62,6)			
ukupno	114 (100,0)	187 (100,0)			
Dob; median (IQR)	57 (52-60)	55 (50-61)	0,466*		
Indeks tjelesne mase					
prekomjerna (>25 kg/m <sup>2</sup> )	71 (62,3)	69 (36,9)	<0,001	0,25	
ne prekomjerna	43 (37,7)	118 (63,1)			
ukupno	114 (100,0)	187 (100,0)			
Obiteljska povijest					
bez	78 (68,4)	169 (90,4)	<0,001	0,27	
CVI	18 (15,8)	7 (3,7)			
druge srčane bolesti	18 (15,8)	11 (5,9)			
ukupno	114 (100,0)	187 (100,0)			
Pušenje					
da	38 (33,3)	38 (28,4)	0,397		
ne	76 (66,7)	96 (71,6)			
ukupno	114 (100,0)	134 (100,0)			

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, egzaktna razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alfa); C = Cramerov V koeficijent asocijacije, standardizirana veličina povezanosti između pacijenata i kontrolne grupe; IQR = interkvartilni raspon

\*Mann-Whitney U test

Bolesnici s IMU i kontrolni ispitanici nisu se razlikovali po dobi (Mann-Whitney U test  $p=0,466$ ). Uočena je statistički značajna razlika u indeksu tjelesne mase (BMI). Ispitanici s  $BMI >25 \text{ kg/m}^2$  bili su češće zastupljeni u skupini s IMU (62,3 %) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p<0,001$ ).

Razlika u učestalosti opterećene obiteljske anamneze (CVI, druge srčane bolesti) također je bila statistički značajna. Učestalost je bila veća u skupini s IMU (31,6 %) u odnosu na zdrave ispitanike (9,6 %) ( $p<0,001$ ). Razlika u zastupljenosti pušača između dvije ispitivane skupine nije bila statistički značajna ( $p=0,397$ ).

**Tablica 2.** Raspodjela genotipova AT1R u skupini bolesnika s IMU i kontrolnih ispitanika

	n(%)	Skupina		P	C
		pacijenti	kontrolna		
AT1					
AC ili CC	45 (39,5)	106 (56,7)	<b>0,004</b>	0,167	
AA	69 (60,5)	81 (43,3)			
ukupno	114 (100,0)	187 (100,0)			

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, egzaktna razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alfa); C = Cramerov V koeficijent asocijacije, standardizirana veličina povezanosti između pacijenata i kontrolne skupine

Statistički značajna razlika postoji u prevalenciji pojedinih genotipova AT1R ( $\chi^2=8,39$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ;  $C=0,167$ ) pri čemu je genotip AA bio više zastupljen u skupini pacijenata s IMU, a genotip AC i CC u skupini zdravih kontrolnih ispitanika bez IMU.

**Tablica 3.** Genotip AT1R kao prediktori IMU

	n(%)	Skupina		Ukupno	OR <sub>UNW</sub> (95 % CI)
		pacijenti	kontrolna		
AT1					
AC ili CC	45 (29,8)	106 (70,2)	151 (100,0)	1	
AA	69 (46,0)	81 (54,0)	150 (100,0)	2,0 (1,2 – 3,2)	

KRATICE: OR<sub>UNW</sub> = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Ispitanici s genotipom AT1R 1166AA imaju dva puta veći izgled za razvoj IMU u odnosu na nosioce genotipa AC ili CC (OR 2,0 95 % CI 1,2-3,2).

## Povezanosti AT1R s kliničkim parametrima

**Tablica 4.** Klinički parametri s obzirom na AT1R u skupini ispitanika s IMU (n=114)

	n(%)	AT1		P	C
		AC ili CC	AA		
<b>Spol</b>					
muško		32 (71,1)	42 (60,9)	0,263	
žensko		13 (28,9)	27 (39,1)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		
Dob; median (IQR)		56 (53-60)	57 (52-60)	0,973*	
<b>Indeks tjelesne mase</b>					
prekomjerna (>25 kg/m <sup>2</sup> )		30 (66,7)	41 (59,4)	0,554	
ne prekomjerna		15 (33,3)	28 (40,6)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>Obiteljska povijest</b>					
bez		33 (73,3)	45 (65,2)	0,572	
CVI		5 (11,1)	13 (18,8)		
druge srčane bolesti		7 (15,6)	11 (15,9)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>Pušenje</b>					
da		16 (35,6)	22 (31,9)	0,839	
ne		29 (64,4)	47 (68,1)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>Fizičke aktivnost</b>					
da		29 (64,4)	42 (60,9)	0,844	
ne		16 (35,6)	27 (39,1)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>Hipertenzija</b>					
da		25 (55,6)	33 (47,8)	0,449	
ne		20 (44,4)	36 (52,2)		
ukupno		45 (100,0)	69 (100,0)		

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, egzaktna razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alfa); C = Cramerov V koeficijent asocijacije, standardizirana veličina statistički značajne razlike; IQR = interkvartilni raspon

\*Mann Whitney U Test

Nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli pojedinih genotipova AT1R A1166C u odnosu na spol (p=0,26), dob (p=0,973), BMI (p=0,554), obiteljsku anamnezu (p=0,572), pušenje (p=0,839), fizičku aktivnost (p=0,844), hipertenziju (p=0,449), DFI (p=0,795), UZV

srca (p=0,816), holter EKG (p=0,296) i ishod liječenja pri otpustu iz bolnice (p=0,264). Rezultati su prikazani u **tablici 5 i 6**.

**Tablica 5.** Klinički parametri s obzirom na AT1R u skupini ispitanika s IMU (n=114)

	AT1		P	C
	n(%)	AC ili CC AA		
<b>Moždani udar</b>				
bez akutne ishemije	4 (8,9)	11 (15,9)	0,047	0,310
opskrbno područje ACA i ACM	18 (40,0)	17 (24,6)		
<b>desno</b>				
opskrbno područje ACA i ACM	14 (31,1)	12 (17,4)		
<b>lijevo</b>				
opskrbno područje ACP desno	2 (4,4)	14 (20,3)		
opskrbno područje ACP lijevo	4 (8,9)	7 (10,1)		
opskrbno područje VB sliva	3 (6,7)	8 (11,6)		
ukupno	45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>DFI</b>				
normalan	12 (26,7)	21 (30,4)	0,795	
beznačajna stenoza	8 (17,8)	9 (13,0)		
značajna stenoza	7 (15,6)	8 (11,6)		
aterosklerotske promjene	18 (40,0)	31 (44,9)		
ukupno	45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>UZV</b>				
nije obavljen	21 (46,7)	27 (39,1)	0,816	
normalan	16 (35,6)	31 (44,9)		
otvoren foramen ovale (PFO)	2 (4,4)	3 (4,3)		
ostalo	6 (13,3)	8 (11,6)		
ukupno	45 (100,0)	69 (100,0)		
<b>Holter EKG</b>				
nije obavljen	6 (13,3)	12 (17,4)	0,296	
sinus ritam	38 (84,4)	51 (73,9)		
fibrilacija atriya (FA)	1 (2,2)	6 (8,7)		
ukupno	45 (100,0)	69 (100,0)		
mRS-AT otpust; median (IQR)	1 (1-3)	1 (0-2)	0,264*	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, egzaktna razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alfa); C = Cramerov V koeficijent asocijacije, standardizirana veličina statistički značajne razlike; IQR = interkvartilni raspon

\*Mann Whitney U Test

Ustanovljena je statistički značajna povezanost genotipova AT1R A1166C s lokalizacijom moždanog udara ( $\chi^2= 10,974$ ;  $df=5$ ;  $p=0,046$ ;  $C=0,310$ ). Moždani udar u opskrbnom području ACA i ACM bio je nešto češći kod ispitanika s AC ili CC genotipom, dok je moždani udar u opskrbnom području ACP bio učestaliji u ispitanika s AA genotipom.

**Tablica 6.** Klinički parametri s obzirom na genotip AT1R u kontrolnoj skupini (n=187)

	n(%)	AT1		P	C
		AC ili CC	AA		
<b>Spol</b>					
muško	45 (42,5)	25 (30,9)	0,128		
žensko	61 (57,5)	56 (69,1)			
ukupno	106 (100,0)	81 (100,0)			
Dob; median (IQR)	55 (51-61)	54 (49-59)	0,253*		
<b>Indeks tjelesne mase</b>					
prekomjerna (>25 kg/m <sup>2</sup> )	40 (37,7)	29 (35,8)	0,879		
ne prekomjerna	66 (62,3)	52 (64,2)			
ukupno	106 (100,0)	81 (100,0)			
<b>Obiteljska povijest</b>					
bez	96 (90,6)	73 (90,1)	0,989		
CVI	4 (3,8)	3 (3,7)			
druge srčane bolesti	6 (5,7)	5 (6,2)			
ukupno	106 (100,0)	81 (100,0)			
<b>Pušenje</b>					
da	21 (28,0)	17 (28,8)	0,917		
ne	54 (72,0)	42 (71,2)			
ukupno	75 (100,0)	59 (100,0)			

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, egzaktna razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alfa); C = Cramerov V koeficijent asocijacije, standardizirana veličina povezanosti između pacijenata i kontrolne grupe; IQR = interkvartilni raspon

\*Mann-Whitney U test

U kontrolnoj skupini ispitanika nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova AT1R A1166C s obzirom na spol, dob, BMI, obiteljsku anamnezu i pušenje.

## **8. RASPRAVA**

U prikazanom radu potvrdili smo povezanost ishemijskog moždanog udara u ranijoj odrasloj dobi, tj. do 55. godine života s varijantama gena AT1R A1166C.

U dosadašnjim radovima objavljenima u literaturi iz ove problematike nailazimo na različite zaključke. Neke studije navode da je AT1R 1166C alel rizični faktor. Druge studije to nisu mogle potvrditi ili iznose suprotne podatke. U našem ispitivanju genotip AT1R 1166AA se pokazao kao čimbenik rizika za razvoj ranog ishemijskog moždanog udara. Nosioци ovog genotipa su imali dva puta veći rizik za razvoj IMU u odnosu na ispitanike koji nisu imali ovaj genotip. Ovaj nalaz se podudara s istraživanjem koje su proveli švedski znanstvenici koji u svojim zaključcima navode da „osobe s genotipom AA gena AT1R imaju povećani rizik za ishemijski moždani udar (OR=1,60; p=0,005) u odnosu na osobe s AC i CC genotipom” (Moellsten i sur., 2008).

Mehanizam pomoću kojeg genotip AT1R A1166C AA može povećati rizik od IMU nije sasvim jasan. U ranijim istraživanjima alel A se povezivao s arterijskom neelastičnošću, ali ne i hipertenzijom (Gardier i sur., 2004), a pokazano je da neelastičnost arterija prethodi hipertenziji (Demellis i sur., 2005). Neke studije navode da je među osobama s hipertenzijom češće zastupljen alel C (Niu i sur., 2010), premda ima i radova koji iznose da je niži krvni tlak zabilježen u nosioца genotipa CC (Castellano i sur., 1996, Abdollahi i sur., 2005).

Mi nismo našli povezanost bilo kojeg alela s hipertenzijom u našoj ispitivanoj populaciji.

Važno je naglasiti da je ispitivani polimorfizam AT1R A1166C lociran u 3'-netranslatiranoj regiji (3'-UTR) gena. Premda postoje izvještaji koji upućuju na funkcionalnu ulogu polimorfizma A1166C (Thekkumkara i sur 1998, Abdollahi i sur., 2007), on se ipak još uvijek treba definirati kao nefunkcionalan SNP. Ne može se isključiti mogućnost da nalaz polimorfizma A1166C nije u ravnoteži s do sada još neopisanim funkcionalnim polimorfizmom koji utječe na rizik od moždanog udara. Ipak naš rezultat o povećanom riziku za IMU među nosioцима genotipa AA ima statistički značajnu vrijednost, p=0,004.

U općoj je populaciji značajno češći nalaz moždanog udara u području ACA i ACM, dok su moždani udari u području ACP i VB klinički značajno rjeđi. U svjetlu navedenog, zanimljiv je rezultat da u ispitivanoj dobnoj skupini (a to je, gledajući epidemiološki, mlađa dobna skupina za ovu bolest) AT1R i 1166AA ukazuju na veći rizik za razvoj MU, ali su pri tome značajniji za skupinu s MU u području ACP, dok nalaz AC i CC ukazuje na manji rizik za razvoj MU, dok se u ispitivanoj skupini češće nalazi kod MU u području ACA i ACM.



Navedeni rezultati upućuju na mogući značajniji dodatni utjecaj stečenih čimbenika, odnosno komorbiditeta u starijoj dobnoj skupini (iznad 65 god.), dok je u mlađoj dobnoj skupini, čini se, značajniji utjecaj genetskih čimbenika. Rezultati ovog rada upućuju na potrebu dodatnih ispitivanja navedenih genetskih čimbenika u svim dobnim skupinama, također u korelaciji s ostalim čimbenicima rizika za razvoj ishemijskog moždanog udara.

Rezultati ovog rada bit će prezentirani u obliku postera na kongresu *XXI World Congress of Neurology* u Beču 21.-26. rujna 2013. godine.

## **9. ZAKLJUČCI**

1. U prikazanom radu potvrdili smo povezanost ishemijskog moždanog udara u ranijoj odrasloj dobi s varijantama gena AT1R A1166C.
2. Ispitanici s genotipom AT1R 1166AA imaju dva puta veći izgled za razvoj IMU u odnosu na nosioce genotipa AC ili CC.
3. Ustanovljena je statistički značajna povezanost genotipova AT1R A1166C s tipom moždanog udara.
4. Genotip AT1R 1166AA je značajniji za skupinu sa MU u području stražnje moždane arterije, dok je genotip AT1R 1166AC i CC češće zastupljen u bolesnika s MU u području prednje i srednje moždane arterije.

## **10. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Zdravki Poljaković na pomoći, usmjeravanju i korisnim savjetima pri pisanju ovog rada, a koja je uvijek, uz sve svoje obaveze, našla vremena i za mene.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Jadranki Sertić i prof. dr. sc. Nadi Božini za pomoć pri eksperimentalnom dijelu rada.

## **11. POPIS LITERATURE**

Abdollahi MR, Gaunt TR, Syddall HE, Cooper C, Phillips DI, Ye S, Day IN. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits. *J Med Genet.* 2005; 42:396-401.

Abdollahi MR, Lewis RM, Gaunt TR, Cumming DV, Rodriguez S, Rose-Zerilli M, et al. Quantitated transcript haplotypes (QTH) of AGTR1, reduced abundance of mRNA haplotypes containing 1166C (rs5186:A>C), and relevance to metabolic syndrome traits. *Hum Mutat.* 2007; 28:365-373.

Asplund K, Tuomilehto J, Stegmayr B. Diagnostic criteria and quality control of the registration of stroke events in the MONICA project. *Acta Med Scand.* 1998; 728(1):26-39.

Baudin B. Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension. *Exp Physiol.* 2004; 90:277-282.

Blanco RR, Austin H, Vest RN 3rd, Valadri R, Li W, Lassegue B, Song Q, London B, Dudley SC, Bloom HL, Searles CD, Zafari AM. Angiotensin receptor type 1 single nucleotide polymorphism 1166A/C is associated with malignant arrhythmias and altered circulating miR-155 levels in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 2012; 18(9):717-23.

Bonita R, Beaglehole R. Recovery of motor function after stroke. *Stroke.* 1988; 19(12):1497-1500.

Brinar V, Hajnšek S, Malojčić B, Habek M, Klepac N, Lušić I, Zadro I. *Neurologija za medicinare.* Zagreb: Medicinska naklada; 2009.

Cameron VA, Mocatta TJ, Pilbrow AP, Frampton CM, Troughton RW, Richards AM, Winterbourn CC. Angiotensin type-1 receptor A1166C gene polymorphism correlates with oxidative stress levels in human heart failure. *Hypertension.* 2006; 47(6):1155-61.

Carandang R, Seshedri S, Beiser A. Trends in incidence, lifetime risk, severity and 30-day mortality of stroke over past 50 years. *JAMA.* 2006; 296:2939-46.

Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, et al. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension.* 1996; 28:1076-1080.

Demarin V. Najnovije spoznaje u prevenciji, dijagnostici i liječenju moždanog udara. *Medikus.* 2005; 14(2):219-228.

Dernellis J, Panaretou M. Aortic stiffness is an independent predictor of progression to hypertension in nonhypertensive subjects. *Hypertension.* 2005; 45:426-431.

Endres M, Heuschmann PU, Laufsand U. Primary prevention of stroke: blood pressure, lipids, and heart failure. *Eur Heart J.* 2011; 32(5):545-552

Feng X, Zheng BS, Shi JJ, Qian J, He W, Zhou HF. A systematic review and meta-analysis of the association between angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism and myocardial infarction susceptibility. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012 Nov 23. System published online 23 November 2012. DOI:10.1177/1470320312466927

Gardier S, Vincent M, Lantelme P, Rial MO, Bricca G, Milon H. A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor, blood pressure and arterial stiffness in hypertension. *J Hypertens.* 2004; 22:2135-2142.

Hilgers KF, Langenfeld MRW, Schlaich M, Veelken R, Schmieder RE. 1166 A/C Polymorphism of the Angiotensin II Type 1 Receptor Gene and the Response to Short-Term Infusion of Angiotensin II. *Circulation.* 1999; 100:1394-1399.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.* 1988; 16:1215.

Möllsten A, Stegmayr B, Wiklund PG. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system confer increased risk of stroke independently of blood pressure: a nested case-control study. *J Hypertens.* 2008; 26(7):1367-72.

Niu W, Qi Y. Association of the angiotensin II type I receptor gene +1166 A>C polymorphism with hypertension risk: evidence from a meta-analysis of 16474 subjects. *Hypertens Res.* 2010; 33(11):1137-43.

Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of functional outcome, survival and recurrence. *Stroke.* 2000; 31:1062-68.

Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system. Peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypert.* 2005; 14:155-159.

Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MJ, de Leeuw PW. Genetic contribution to the acute effects of angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Hypertens.* 2005; 23(4):753-8.

Thekkumkara TJ, Thomas WG, Motel TJ, Baker KM. Functional role for the angiotensin II receptor (AT1A) 30-untranslated region in determining cellular responses to agonist: evidence for recognition by RNA binding proteins. *Biochem J.* 1998; 329 (2):255-264.

van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, van Gilst WH. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension.* 2000 Mar; 35(3):717-21.

Zhuo JL, Li XC. New insight and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides.* 2011; 32:1551-1565.

## **12. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 05.06.1989. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole i prirodoslovno-matematičke gimnazije u Zagrebu upisala sam se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu među 15 % najuspješnijih kandidata. Tijekom studija sam bila demonstratorica iz predmeta Anatomija, Imunologija i Fiziologija, Patologija, Klinička propedeutika koju i ove akademske godine obavljam. U proljeće 2012. godine počela sam se baviti znanstvenim radom kod prof. dr. sc. Zdravke Poljaković, pročelnice Katedre za neurologiju, prof. dr. sc. Jadranke Sertić iz Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, i Antonele Bazine, dr. med, s odjela Neurologije, KBC Zagreb, vezanim za biokemijski i klinički aspekt moždanog udara. Kao rezultat navedene interdisciplinarne suradnje nastao je ovaj rad čiji su rezultati biti prezentirani u rujnu 2013. godine na *XXI World Congress of Neurology* u Beču gdje sam sudjelovala kao koautor rada.