

# Utjecaj genomske heterozigotnosti na kompenzaciju akutnog psihološkog stresa

---

Zgaga, Lina

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:618009>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Zgaga, Lina (2011) *Utjecaj genomske heterozigotnosti na kompenzaciju akutnog psihološkog stresa [The effect of genome heterozygosity on compensation of acute psychological distress].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1017>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Lina Zgaga**

**Utjecaj genomske heterozigotnosti na  
kompenzaciju akutnog psihološkog  
stresa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Lina Zgaga**

**Utjecaj genomske heterozigotnosti na  
kompenzaciju akutnog psihološkog  
stresa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2011.**



Disertacija je izrađena na Školi narodnog zdravlja „Andrija Štampar“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Darko Kaštelan

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Darku Kaštelanu na pomoći i vrijednim komentarima prilikom pisanja ove disertacije. Zahvaljujem se doc. dr. sc. Zrinki Biloglav na brojnim primjedbama i sugestijama koji su produbili moje razumijevanje genetičke epidemiologije. Iskreno se zahvaljujem prof. dr. sc. Ariani Vorko-Jović na savjetima i podršci. Također se zahvaljujem dr. sc. Goranu Benčiću i dr. sc. Ivanu Halaszu na detaljnom iščitavanju disertacije i komentarima. Na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima, na bezuvjetnoj podršci i atipičnoj perspektivi.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACTH	adrenokortikotropni hormon (engl. Adreno-Corticotropic Hormone)
CRH	kortikotropin-oslobađajući hormon (engl. Corticotropin-Releasing Hormone)
GHQ	upitnik o općem zdravstvenom stanju (engl. General Health Questionnaire)
GWAS	cjelogenomski test asocijacije (engl. Genome-Wide Association Study)
HWE	Hardy-Weinbergova ravnoteža (engl. Hardy-Weinberg Equilibrium)
KHF	Korelacija heterozigotnosti i fitnessa
LD	neravnoteža vezanja (engl. Linkage Disequilibrium)
MAF	udio rjeđeg alela (engl. Minor Allele Frequency)
N	broj ispitanika
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
STR	mikrosatelitni biljeg (engl. Short Tandem Repeat)



## POPIS SLIKA

**Slika 1.** (A) Teorija o korelaciji heterozigotnosti i fitnesa. Učinak okolišnih nepovoljnih čimbenika na svojstvo povezano s fitnessom modificiran je genomskom heterozigotnosti. Specifični slučaj (B) prikazuje utjecaj akutnog psihološkog stresa na poremećaj koncentracije kortizola, a koji je modificiran genomskom heterozigotnošću.

**Slika 2.** Regulacija kortizola i čimbenici koji utječu na njegovo lučenje.

**Slika 3.** Biosinteza kortizola iz kolesterola.

**Slika 4.** Srednje vrijednosti kortizola (korijen-transformirane) od 0 do 12 sati nakon buđenja. Prikazana je krivulja za osobe koje se bude rano (puna linija) i za osobe koje se bude kasno (isprekidana linija).

**Slika 5.** Otok Vis, Hrvatska.

**Slika 6.** Histogram vrijednosti jutarnjeg kortizola. Okomite crvene linije predstavljaju donju (140 nmol/L) i gornju (800 nmol/L) granicu normalnih vrijednosti.

**Slika 7.** Histogram rezultata GHQ-30 upitnika (bodovanje po Likertu). Crvena crta označava graničnu vrijednost od 31 bod: vrijednosti iznad crvene crte sugeriraju narušeno psihičko zdravlje.

**Slika 8.** Korelacija rezultata GHQ-30 upitnika kada se koristi bodovanje prema Likertu sa ostalim načinima bodovanja: modificiranim bodovanjem po Likertu, GHQ bodovanjem i C-GHQ bodovanjem.

**Slika 9.** Histogram standardizirane multilokusne heterozigotnosti izračunate pomoću STR biljega.

**Slika 10.** Prikaz ovisnosti kortizola o heterozigotnosti. Više vrijednosti kortizola povezane su sa smanjenom standardiziranom multilokusnom heterozigotnošću. Vrijednosti kortizola su z-transformirane i standardizirane na dob, spol i na akutno narušeno psihičko zdravlje.

**Slika 11.** Grafički prikaz rezultata cjelogenomske asocijacijske studije jutarnje koncentracije kortizola (Manhattan prikaz), pri čemu su u model bili uključeni dob, spol i pojedini SNP biljeg. Y os prikazuje negativni logaritam  $p$ -vrijednosti nadjene za svaki SNP biljeg koji je bio uključen u analizu (više vrijednosti na Y osi označavaju veću statističku značajnost).

**Slika 12.** Za SNP biljege koji su pokazali najsnažniju povezanost sa koncentracijom kortizola prikazan je položaj u genomu i relativni odnos prema najbližim genima, transkriptima i pseudogenima (198).

**Slika 13.** Genomska regija kromosoma 3p25.3. Crne strelice pokazuju na gen GHRL (obilježen uskim crvenim pravokutnikom) i na poziciju rs1000772 biljega (obilježen zelenom linijom).



## POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Očekivane učestalosti genotipova u općoj i srođenoj populaciji.

**Tablica 2.** Četiri načina bodovanja GHQ-30 upitnika.

**Tablica 3.** Broj ispitanika u pojedinoj kategoriji obrazovanja.

**Tablica 4.** Broj ispitanika (ženskih i muških) u kategoriji zdravih (<31), narušenog (31 – 50) i jako narušenog (>50) psihičkog zdravlja; klasifikacija je napravljena prema rezultatu GHQ-30 upitnika (bodovanje po Likertu).

**Tablica 5.** Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja u ovisnosti o kategoriji obrazovanja (I – najniži stupanj obrazovanja). Kao zdravi su definirani oni koji imaju <31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.

**Tablica 6.** Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja ovisno o socio-ekonomskom statusu (podatak prikupljen samo-evaluacijom). Kao zdravi su definirani oni koji imaju <31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.

**Tablica 7.** Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja ovisno o socio-ekonomskom statusu, procijenjeno prema pokazateljima socioekonomskog statusa (1- najnepovoljniji socio-ekonomski status). Kao zdravi su definirani oni ispitanici koji imaju manje od 31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.

**Tablica 8.** Beta-koeficijenti za ispitivane prediktorne varijable (sve varijable su z-transformirane); također su prikazani i standardna pogreška beta-koeficijenta i odgovarajuća *p*-vrijednost.

**Tablica 9.** Postotak varijance jutarnjih vrijednosti kortizola koji je objašnjen sa pojedinom prediktivnom varijablom.

**Tablica 10.** Lista svih SNP biljega za koje je nađena povezanost sa jutarnjim koncentracijama kortizola ( $p < 10^{-4}$ ) u modelu koji je uključivao dob, spol i pojedini SNP biljeg.

**Tablica 11.** Lista svih SNP biljega za koje je nađena povezanost sa jutarnjim koncentracijama kortizola ( $p < 10^{-4}$ ) u modelu koji je uključivao dob, spol, akutno narušeno psihičko zdravlje i pojedini SNP biljeg.

**Tablica 12.** Lista SNP biljega koji su izdvojeni na temelju malih *p*-vrijednosti u oba modela (GWAS korigiran na dob i spol, te GWAS korigiran na dob, spol i akutno narušeno psihičko zdravlje).

## **1. UVOD**

## 1.1. Građa ljudskog genoma

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) u ljudi organizirana je u 23 kromosomska para, a ukupni broj nukleotidnih baza procjenjuje se na više od 3 milijarde. DNK kodira oko 23.000 gena, manje nego što je procijenjeno u ranijim studijama koje su govorile o čak 40.000 gena. (1) Premda je biološka funkcija za mnoge od do sada opisanih gena i dalje nepoznata, značajno postignuće predstavlja sama činjenica da raspoložemo podacima o njihovom postojanju i lokalizaciji unutar genoma.

Genetska raznolikost predstavlja jedno od najvažnijih i najčešće mjerenih i opisivanih obilježja ljudskoga genoma. U usporedbi s raznolikosti između ljudi i ostalih vrsta, genetska raznolikost unutar ljudske populacije znatno je manja nego što bismo očekivali sudeći prema fenotipskom izgledu. Tako je primjerice podudarnost genetske građe dvaju nasumično odabranih ljudi čak 99,9%, a sličnost genetske građe čovjeka i čimpanze iznosi čak 98%. (2) Ta zapažanja objašnjavamo činjenicom da je tijekom većeg dijela svoje povijesti ljudska populacija bila brojčano mala, te time što su se ljudi od primata odvojili relativno nedavno. (3)

Genetsku raznolikost možemo promatrati na nekoliko razina, od sekvence cijele DNK, do mjerenja genotipa na određenim lokusima ili samog fenotipa. Na razini pojedinca, promjene u frekvencijama alela posljedice su interakcije evolucijskih sila koje oblikuju genetičko nasljeđe: mutacije<sup>1</sup>, prirodne selekcije, genetičkog pomaka<sup>2</sup> i toka gena<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Pod tim pojmom uglavnom se misli na fiksne ili stabilne mutacije koje s obzirom na specifične molekularne promjene na razini DNK dijelimo na supstitucije, insercije, delecije i duplikacije dijela gena ili slijeda DNK.

Stanje genetske raznolikosti u populaciji najčešće određuje ravnoteža između stope mutacije, toka gena i veličine populacije. (4-6) Usprkos činjenici što je riječ o sporim mehanizmima, stalno djelovanje različitih evolucijskih procesa danas je zabilježeno u milijunima genetičkih polimorfizama ljudskoga genoma. Pod pojmom „polimorfizam“ podrazumijevamo mogućnost postojanja različitih alela na određenom lokusu, a da bismo neki alel smatrali polimorfizmom u užem smislu njegova učestalost u populaciji mora biti veća od 1%. Sve alele s manjom učestalošću nazivamo rijetkim mutacijama.

Genetički polimorfizmi najčešće se koriste kao biljezi u istraživanjima kojima je cilj pronalaženje gena u podlozi bolesti, te se ispituje povezanost određenog genotipa s bolesti ili svojstvom. Danas su u tom smislu najveću primjenu našli mikrosatelitni biljezi (engl. short tandem repeat, STR) i polimorfizmi jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism, SNP), iako postoje i druge vrste varijabilnosti u humanom genomu, na primjer kromosomske anomalije, inverzije, insercije, delecije ili duplikacije dužeg slijeda DNK.

Mikrosatelitni biljezi u DNK prvi su puta detaljno opisani 1985. godine, a predstavljaju kratki slijed od dva ili više nukleotida (obično od 2 do 16) koji se ponavlja različiti broj puta redomice, a obično se nalazi u nekodirajućim regijama genoma. (5-7) Ovi biljezi iznimno su nestabilni i imaju visoku stopu mutacije, pa u nekim slučajevima postoji čak

---

<sup>2</sup> Zbog ograničene veličine populacije i malog broja potomaka alelne učestalosti u sljedećim naraštajima u pravilu odstupaju od teorijski očekivane vjerojatnosti.

<sup>3</sup> Protokom gena (engl. gene flow) nazivamo razmjenu gena između populacija putem migracijskih procesa, emigracija i imigracija, čime se smanjuju ili poništavaju njihove međusobne genetske različitosti.

do nekoliko tisuća mogućih varijanti za pojedini mikrosatelitni lokus. Broj ponavljanja može varirati od 5 – 5000, no najčešće je riječ o 20-50 ponavljanja. (8) Tako primjerice mikrosatelitni biljezi s 20 ili više alela i heterozigotnosti većom od 0,85 nisu rijetkost. (9) Naziv pojedinog STR biljega sadrži informaciju o kromosomu na kojem se biljeg nalazi (šifrirano kao slovo „D“ i broj kromosoma) i zatim broj STR biljega na tom kromosomu (šifrirano kao slovo „S“ nakon kojeg slijedi broj biljega); na primjer D14S75. (5, 6)

Polimorfizmi pojedinog nukleotida (SNP biljezi, prema engl. Single Nucleotide Polymorphism) su najčešći tip polimorfizama u ljudskom genomu i čine ih razlike u građi DNK od svega jedne baze: na primjer, kod jedne osobe se pronalazi slijed ATCAAGC, a kod druge ATCGAGC. Pripisuje im se čak 90% svih razlika u sekvencama ljudskoga genoma, a u usporedbi s mikrosatelitnim biljezima manje su varijabilni (na pojedinom lokusu obično su moguće samo dvije varijante). Procjenjuje se da u ljudskoj populaciji postoji oko 10 milijuna SNP-ova, od kojih su neki izrazito rijetki s učestalošću manjom od 1%. (10) Trenutačno je većina znanstvenih istraživanja usmjerena na pronalaženje SNP-ova u regulatornim i kodirajućim regijama genoma (tzv. coding SNPovi, cSNP) koji često uzrokuju izmjenu u građi proteina i funkcionalne promjene, za razliku od SNP-ova smještenih u ostalim „nefunkcionalnim“ regijama genoma. Ovakvih SNP-ova ima svega oko pet posto, jer funkcionalne regije čine samo manji dio genoma. (11)

Premda većina SNP-ova ne utječe na funkcioniranje gena, ipak su nam mnogi korisni kao biljezi zbog povezanosti s funkcionalnim SNP-ovima. Podaci o SNP biljezima

dostupni su na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> i <http://www.ensembl.org/index.html>. Polimorfizmi ljudskog genoma detaljno su opisani zahvaljujući HapMap projektu (12-14). Detaljne informacije o projektu i bazi podataka dostupne su na <http://snp.cshl.org/>. Naziv pojedinog SNP biljega sastoji se od sloga „rs“ (prema engl. „restriction site“) i broja. Broj pojedinog biljega ne ovisi o fizičkoj poziciji polimorfizma u genomu, već se obično dodjeljuje redom, kako se koji polimorfizam otkrije.

Polimorfizmi govore o razlikama među ljudima i oni su zapravo biljezi genetske raznolikosti, te se ispitivanjem (tj. genotipiziranjem) polimorfizama razlike mogu „mjeriti“. SNP i STR biljezi se, uz druge biljege genetske raznolikosti, koriste na primjer u sudskoj medicini, utvrđivanju očinstva, otkrivanju podrijetla, dijagnostici bolesti, otkrivanju gena u podlozi bolesti i evolucijskoj biologiji.

Usprkos činjenici što raspolažemo velikim brojem podataka, treba naglasiti da će se cjelovita varijacija DNK moći detaljnije opisati tek kada sekvencioniranje cijelog genoma postane financijski dostupnije i kada se analiziraju sekvence velikog broja ljudi iz genetički različitih populacija.

## **1.2. Heterozigotnost – mjera genetske raznolikosti**

Heterozigotnost je mjera genetske raznolikosti kojom opisujemo prisutnost dvaju različitih alela na određenom lokusu homolognih kromosoma. Možemo je mjeriti na razini pojedinca ili populacije, te izračunati za jedan lokus (pa jednostavno kažemo da je lokus heterozigotan) ili više njih (multilokusna heterozigotnost). Heterozigotnost na



razini populacije obično je u korelaciji s ostalim mjerama genetičke raznolikosti populacije (npr. koeficijentom srođenosti). Kako heterozigotnost pojedinca definiramo kao vjerojatnost da je osoba heterozigot za određeni lokus, heterozigotnost teorijski može iznositi od 0 do 1. (15)

Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWR) predstavlja temeljni koncept populacijske genetike i pomoću nje se određuje očekivani broj homozigota i heterozigota na lokusu koji ima dva alela, A i a (vrijedi za diploidne organizme). Frekvencija alela A u populaciji se označava s  $p$ , a frekvencija alela a s  $q$ . Pritom  $f(AA)$  i  $f(aa)$  označavaju učestalosti jednog i drugog homozigota, a  $f(Aa)$  označava učestalost heterozigota.

**Tablica 1.** Očekivane učestalosti genotipova u općoj i srođenoj populaciji.

<b>Opća populacija</b> (očuvan HWR)	<b>Srođena populacija</b> (odstupanje od HWR)
$f(AA) = p^2$	$f(AA) = p^2 + (p \times q \times F)$
$f(aa) = q^2$	$f(aa) = q^2 + (p \times q \times F)$
$f(Aa) = 2 \times p \times q$	$f(Aa) = 2 \times p \times q \times (1 - F)$

Jednadžba koja određuje frekvencije homozigota i heterozigota prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = f(AA) + f(Aa) + f(aa)$$

vrijedi u idealnoj i beskonačno velikoj populaciji u kojoj je izbor spolnog partnera slučajan (panmiksija), stopa mutacije stalna, a migracije i selekcija nisu prisutne. Promjena bilo kojeg od spomenutih parametara može dovesti do odstupanja od ravnoteže. Ako je riječ o srođenoj populaciji, prilikom izračunavanja učestalosti genotipova (AA, Aa i aa) koristi se prilagođena jednadžba za HWR koja uključuje i koeficijent srođenosti (F) (**Tablica 1**). Koeficijent srođenosti je šansa da dva alela potiču od istog pretka. (16) Iz jednadžbe je vidljivo da udio homozigota (AA i aa) raste s porastom srođenosti, što objašnjava i davno opaženu veću prevalenciju recesivnih bolesti u srođenim populacijama u odnosu na opće, otvorene populacije.

Srođivanje i heterozigotnost su genetički pojmovi koji su dinamično povezani, pa je u srođenim populacijama uobičajeno naći smanjenu heterozigotnost, odnosno povećanu homozigotnost genskih lokusa. (16) Korelacija između srođenosti izračunate iz rodoslovlja i heterozigotnosti je velika, što dodatno potvrđuje učinak srođivanja na heterozigotnost. (17) Vrijedi i obrnuto: temeljem heterozigotnosti donekle možemo procijeniti u kojoj je mjeri neka populacija srođena. (18, 19)

### **1.2.1. Mjere heterozigotnosti**

Heterozigotnost možemo mjeriti pomoću STR i SNP biljega. Polimorfizmi pojedinog nukleotida (SNP biljezi) redovito dolaze u samo dva oblika, odnosno postoje dvije nukleotidne baze koje nalazimo na lokusu, a obično razlikujemo „češći“ i „rjeđi“ alel. S druge strane, STR biljezi na pojedinom lokusu su raznolikiji te postoji mnogo različitih

alela koje pojedinac može imati na određenom lokusu. Iz činjenice da su SNP lokusi mnogo češće homozigotni (jer postoje samo dvije varijante) proizlazi prednost STR biljega u izračunu heterozigotnosti.

Kada govorimo o heterozigotnosti važno je razlikovati multilokusnu heterozigotnost i genomsku heterozigotnost. Svaki lokus u genomu diploidnog organizma (osim lokusa na spolnim kromosomima) može biti homozigotan - ako je na određenom lokusu na homolognim kromosomima prisutna ista varijanta, ili heterozigotan - ako su varijante različite. Pod pojmom **multilokusna heterozigotnost** podrazumijevamo proporciju genotipiziranih lokusa za koju je neka osoba heterozigot. Izračunava se iz omjera heterozigotnih biljega i ukupnog broja biljega koji su uspješno genotipizirani, prema jednadžbi:

$$MLH_i = \text{biljeg}_{\text{het } (i)} / \text{biljeg}_{\text{ukupno } (i)}$$

pri čemu je **MLH<sub>i</sub>** udio heterozigotnih biljega kod ispitanika ***i***, **biljeg<sub>het (i)</sub>** je broj heterozigotnih biljega, a **biljeg<sub>ukupno (i)</sub>** ukupni broj uspješno genotipiziranih biljega ispitanika ***i***.

U idealnom slučaju bila bi nam poznata sekvenca cijelog genoma i mogli bismo izračunati **genomsku heterozigotnost** kojom bi točno izračunali heterozigotnost pojedine osobe koristeći sve baze u DNK. Međutim, sekvencioniranje cijelog genoma još uvijek je financijski nedostupno, pa se temeljem multilokusne heterozigotnosti pokušava procijeniti genomska heterozigotnost. Korištenje većeg broja biljega omogućuje precizniju korelaciju multilokusne i genomske heterozigotnosti.

Pod pojmom **standardizirana multilokusna heterozigotnost** podrazumijevamo omjer kojem se u brojniku nalazi proporcija genotipiziranih lokusa na kojima je neka osoba heterozigotna ( $MLH_i$ ), a u nazivniku prosječna heterozigotnost populacije, ali uzevši u obzir samo lokuse koji su uspješno genotipizirani kod ispitivane osobe. Stoga ova mjera isključuje potencijalni bias koji bi se mogao pojaviti ako su različiti ljudi genotipizirani za različite lokuse (20), a razvili su ju Coltman i suradnici (21).  $sMLH$  se računa prema jednadžbi:

$$sMLH_i = MLH_i / MLH_{\text{prosjeck},i}$$

pri čemu je  $sMLH_i$  standardizirana multilokusna heterozigotnost ispitanika  $i$ ,  $MLH_i$  je udio heterozigotnih SNP biljega kod ispitanika  $i$ , a  $MLH_{\text{prosjeck},i}$  je prosječna heterozigotnost svih ispitanika, ali samo za SNP biljege koji su uspješno genotipizirani kod ispitanika  $i$ . Za detalje o izračunu vidjeti poglavlje: **3.2.4.2. Određivanje standardizirane multilokusne heterozigotnosti.**

### **1.2.3. Dosadašnja istraživanja multilokusne heterozigotnosti s STR biljezima**

Kako je u ovom istraživanju heterozigotnost mjerena temeljem mikrosatelitnih markera i izražena kao standardizirana multilokusna heterozigotnost navesti ćemo primjer nekoliko istraživanja koja su slična ovdje opisanim analizama. Treba napomenuti da je heterozigotnost koju uobičajeno nalazimo u ljudskim populacijama dosta velika, između ostalog i zbog snažnog socijalnog pritiska protiv brakova među bliskim rođacima u većini ljudskih zajednica, a koji bi mogli dovesti do smanjenja heterozigotnosti (22).

Opažene heterozigotnosti u općim populacijama obično su vrlo sličnih vrijednosti, što otežava dizajn istraživanja zbog nepostojanja „statističkih“ skupina za usporedbu – jer gotovo i ne postoji razlika između izrazito heterozigotnih i izrazito homozigotnih pojedinaca u takvom uzorku. (16, 19, 23, 24)

Pretraživanje MEDLINE baze podataka temeljem ključnih riječi „heterozygosity” i „STR” s postavljenim ograničenjem za pretraživanje samo radova koji proučavaju ljude (limits: „humans“) daje nam ukupno 530 radova. Kada dodamo i pojam „isolated“ dobijemo 19 radova.

Pregledali smo radove kod kojih je za istraživanje odabrana izolirana populacija i u kojoj je stoga srođivanje u nekoj mjeri izgledno (bilo da je izolacija geografske prirode ili srođivanje postoji zbog običaja ženidbe bliskih rođaka). Dati ćemo za primjer nekoliko radova koji opisuju takve izolirane ljudske zajednice s niskom heterozigotnošću: Zhu i sur. našli su da je heterozigotnost u izoliranoj populaciji na Tibetu od 0,615 do 0,817 koristeći 21 STR biljeg (32), Krithika i sur. (2007) istraživali su izolirana plemena Panggi, Komkar i Padam u Indiji, te su našli heterozigotnost (redom) od: 0,7747, 0,7742 i 0,7663 koristeći 15 STR biljega (31). Sotak i sur. (2008) napravili su istraživanje u Slovačkoj koristeći 15 STR biljega i pronašli su heterozigotnost od 0,77222 u općoj populaciji i heterozigotnost od 0,73220 među Romima. (25) Tariq i sur. (2008) proučavali su heterozigotnost s 13 STR biljega na X kromosomu žena u Pakistanu, te su našli heterozigotnost od 0,524 do 0,884. (26)

Eaaswarkhanth i sur. (2009) istraživali su razlike u genetičkoj raznolikosti Šiita i Sunita, te su za 15 STR lokusa našli heterozigotnosti od 0,5833 do 0,8595, i 0,6818 do 0,8333, gledajući zasebno svaki pojedini biljeg. (27) Brojna su istraživanja heterozigotnosti pojedinog STR lokusa, npr. Shazia i sur (2009) istraživali su heterozigotnost u deset različitih populacijskih podgrupa, te su analizom samo jednog STR biljega našli heterozigotnost od 0,72 do 0,94 (28); ili istraživanje Phillipsa i sur. (2008) koji su pronašli heterozigotnost od 0,66 do 0,75 za STR biljeg D9S1120. (29) No, prema definiciji, multilokusna heterozigotnost se ne može procijeniti iz samo jednog biljega.

Za usporedbu s izoliranim populacijama, Lie i sur. (2009) su u općoj populaciji Australije koristeći 14 STR biljega van MHC regije i 12 biljega u MHC regiji našli heterozigotnost od 0,84 i 0,83. (30)

U Hrvatskoj su do sada napravljena istraživanja multilokusne heterozigotnosti na otočnim populacijama. Rudan i sur. (2008) su usporedili razine heterozigotnosti kod 6 skupina ispitanika koje su se razlikovale po srođenosti i porijeklu. U skupini koja je imala strukturu opće populacije heterozigotnost je bila visoka (0,970), a u skupini koja je bila srođena mnogo niža: 0,875. (19, 23, 31, 32)

### **1.3. Srođivanje i fitnes**

Fitnes je svojstvo organizma povezano s preživljenjem i reprodukcijom. U klasičnom smislu, izračunava se usporedbom broja potomaka organizma i prosječnog broja potomaka u populaciji.

Srođivanje je najčešće posljedica ograničenog izbora spolnih partnera, ali i kulturoloških osobitosti u nekim dijelovima svijeta, primjerice u arapskim zemljama i dijelovima subsaharske Afrike gdje postoje običaji ženidbe bliskih rođaka. Srođivanje povećava urođenost populacije, a pozitivni i negativni učinci srođivanja na potomstvo, osim kod ljudi, zamijećeni su i kod biljaka i životinja. Naime, čovjek je od pamtivijeka manipulirao oplođivanjem kod biljaka i životinja kako bi probrao niz sebi korisnih svojstava, međutim kod srođenih jedinki zamijećena su nepoželjna svojstva potomaka povezana s preživljavanjem te reprodukcijom. (33) Upravo je jedna od paradigmi evolucijske biologije pojava da je potomstvo bliskih srodnika manje otporno na stresore iz okoliša, te ima manju sposobnost preživljavanja i reprodukcije od nesrođenih jedinki. (34)

Općenito, kaže se da srođene jedinke pokazuju smanjeni fitness, a pod tim pojmom najčešće podrazumijevamo smanjeni reproduktivni uspjeh neke jedinke u odnosu na prosjek u populaciji. Ovaj termin je začeo još u XIX. st. britanski sociolog Herbert Spencer<sup>4</sup>, tvorac koncepta pod nazivom: „preživljenje najprilagođenijih“. U narednim godinama ovaj je koncept poslužio kao temelj kako bi se opisao pojam koji je Charles Darwin nazvao prirodna selekcija. Britanski biolog J.B.S. Haldane je bio prvi koji je kvantificirao fitness i sintetizirao spoznaje proistekle iz Darwinova učenja i mendelske genetike, što je iznio u svom radu iz 1924. godine: *A Mathematical Theory of Natural and Artificial Selection*. Daljnji značajan napredak u objašnjenju termina fitness pružio je

---

<sup>4</sup> Herbert Spencer (1820–1903) bio je britanski sociolog, filozof i istaknuti političar. Najpoznatiji je zbog postavljanja koncepta „preživljenje najprilagođenijih“ (orig. engl. "survival of the fittest").

britanski biolog W.D. Hamilton kada je u svom radu iz 1964 god. objasnio važnost evolucije socijalnog ponašanja (naziv originalnog djela: *The Evolution of Social Behavior*).

Danas je dostupno više definicija fitnesa i nije ga prikladno jednoznačno tumačiti, premda u genetici pod tim pojmom najčešće opisujemo reproduktivnu sposobnost neke jedinke. Kada smanjeni fitnes zamijetimo u nekoj populaciji u čijoj se podlozi nalazi srođivanje ta se pojava u literaturi naziva depresija srođivanja (engl. inbreeding depression). (35, 36) Smatra se da su glavni uzrok ove pojave štetni recesivni aleli za koje je srođena jedinka homozigot. (37) Na razini populacije velika genetska raznolikost je poželjna osobina i štiti populaciju od trenutačnih i budućih izazova okoliša, jer povećava mogućnost preživljavanja neke dobro prilagođene jedinke. Istovjetno, smatra se da slično vrijedi i za pojedince: što je veća njihova heterozigotnost unutar genoma, to je načelno veći njihov kompenzacijski potencijal u stresnim situacijama.

Kako kontrolirana istraživanja srođivanja nije moguće provesti na ljudima, istraživanja na biljkama i životinjama uvelike su pridonijela razumijevanju ove problematike. (38, 39) Prirodno kratak životni vijek nekih organizama pokazao kao posebno poželjna osobina jer brža smjena generacija ubrzava ovakva istraživanja. (39) Tako su opisani brojni negativni učinci srođivanja na fitnes, na primjer: Barrett i Charlesworth (1991) su istraživanjima na kukuruzu pokazali kako srođenoj populaciji treba dug vremenski period kako bi dostigla prvotnu razinu fitnesa (40); nepovoljan učinak na usjev (u smislu smanjene količine) pokazali su 1974. godine Cornelius i Dudley (41). McCarthy



(1967) je pokazao da srođeni miševi imaju manja legla (42), dok je White (1972) utvrdio smanjenu masu miševa u okotu i zaostatak u rastu (43). Slična istraživanja provedena su i na vrstama koje imaju gospodarsku važnost, npr. stoku i ovce, te u primata (44-46). S druge strane, promjene u svojstvima koja nisu izravno povezana s fitnessom i preživljenjem pokazuju minimalne razlike kada se uspoređuju srođena i opća populacija. Na primjer, broj senzornih dlačica na tijelu *Drosophila* ne razlikuje se između srođenih i nesrođenih organizama<sup>5</sup> (16).

Kod djece bliskih srodnika opažena je povećana učestalost niza bolesti kasnije dobi (npr. visoki krvni tlak), što se objašnjava ranijim iscrpljivanjem njihovih kompenzacijskih mehanizama. (23, 47) Ovo zapažanje nije novijeg datuma - još je u XIX.<sup>6</sup> st. pred britanskim parlamentom iznesen problem srođivanja i neuspješno postavljen zahtjev da se znanstveno istraži zdravlje djece proistekle iz takvih brakova. Od tada do danas napravljene su mnogobrojne studije ovog problema, pa je nedavno i Darwin G. H. (2009) proučavajući brakove između prvih rođaka potvrdio povećani broj sterilnih brakova (ako su partneri prvi rođaci i u brakovima osoba čiji su roditelji prvi rođaci) (48). U brakovima nesrođenih osoba postotak sterilnih iznosi 15,9%. U brakovima među prvim rođacima taj se postotak kreće od 14,7 do 20,9%, a u brakovima djece iz braka prvih rođaka 17,2%. Istraživanja učinka srođenosti na zdravlje djece rođene u braku između prvih rođaka provedena su u cijelom svijetu: Japanu (49-52),

---

<sup>5</sup> *Drosophila* je jedan od najčešće proučavanih organizama u genetici, a broj senzornih dlačica je izrazito često proučavani fenotip.

<sup>6</sup> Zahtjev je postavio 1871. godine Sir John Lubbock (1834 – 1913) koji je bio engleski bankar, biolog, arheolog i političar.

Pakistanu (53, 54), Africi (55), Indiji (56) i drugdje. Ova istraživanja sustavno su pokazala smanjeni fitnes djece iz brakova srođenih osoba, što se očitovalo kao povećani mortalitet, smanjen rast, manji kvocijent inteligencije i drugo (57).

### **1.3.1. Primjeri suprotstavljanja gubitku heterozigotnosti**

U biljnom i životinjskom svijetu opaženi su modaliteti razmnožavanja koji po svojoj prirodi imaju tendenciju smanjiti heterozigotnost potomstva te tada nerijetko opažamo neuobičajene pojave čija je zadaća suprotstaviti se gubitku heterozigotnosti. Na primjer, neobična je pojava nedavno opisana kod guštera roda *Aspidoscelis* (58). Ova vrsta razmnožava se samo-oplođivanjem, pa bi u svakoj slijedećoj generaciji trebalo doći do daljnjeg smanjenja heterozigotnosti, i u svjetlu dosadašnjih spoznaja - do smanjenog fitnesa organizma. Nedavno je istraživanje pokazalo je kako kod ove vrste dolazi do modifikacije klasičnog tijeka mejoze koje omogućava održanje heterozigotnosti unatoč samo-oplođivanju. Naime, prije same mejoze dolazi do udvostručavanja broja kromosoma, što omogućava sparivanje sestrinskih (identičnih) kromosoma. Kada ne bi bilo ove modifikacije, rekombinacija bi nužno dovela do smanjenja heterozigotnosti, no ako je ograničena na razmjenu među sestrinskim kromosomima (efektivno, kao da rekombinacije niti nema), heterozigotnost je u potpunosti zadržana (58).

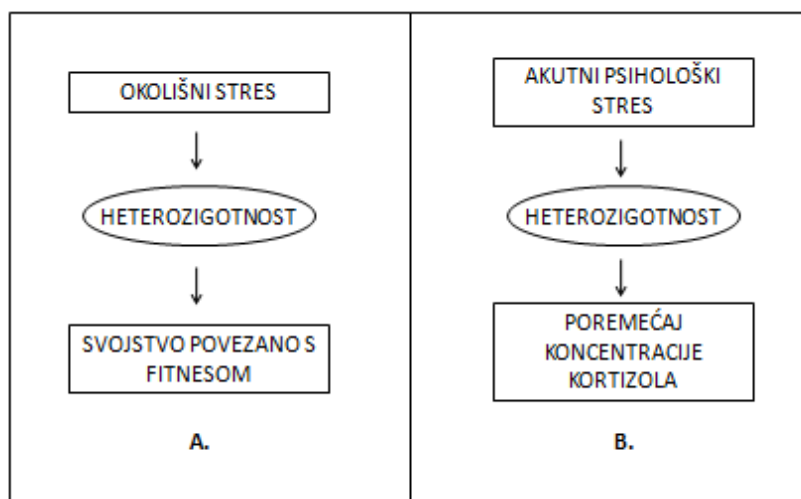
Drugi neobičan primjer opisuje kako ženke nekih vrsta, pa čak i onih monogamnih, povećavaju heterozigotnost svog potomstva tako što imaju više spolnih partnera – u slučaju kada postoji ograničen izbor spolnih partnera, na ovaj se način suprotstavlja negativnom učinku srodivanja i povećavajući genetsku raznolikost, povećava se fitnes potomaka. U oba primjera dolazi do značajne modifikacije uobičajenih fizioloških

mehanizama ili ponašanja kako bi se očuvala heterozigotnost, što govori u prilog važnosti održanja genetske različitosti.

### **1.3.2. Korelacija heterozigotnosti i fitnesa - smjernice za istraživanje**

Statistička povezanost heterozigotnosti i karakteristika organizma povezanih s fitnesom u literaturi se naziva **korelacija između heterozigotnosti i fitnesa**. Kako će u tekstu koji slijedi biti detaljno objašnjeno, ovaj rad također pripada u studije korelacije između heterozigotnosti i fitnesa, a jedan od ciljeva rada bio je istražiti korelaciju između heterozigotnosti i kortizolskog odgovora. Szulkin i sur. (2010) napravili su smjernice koje svako istraživanje korelacije heterozigotnosti i fitnesa treba slijediti (17).

Prvo, valjano je proučavati samo fenotipove povezane s fitnesom (17). Primjerice, poznato je da kortizol direktno i imunosupresivno utječe na imunološki sustav (59-65). Sprega kortizola i imunološkog sustava je neosporiva: detaljno razumijemo patofiziološki mehanizam, postoje brojna opažanja iz medicinske prakse koja potvrđuju povezanost, opaža se veza između „doze kortizola“ i učinka na imunološki sustav (npr. kod terapije kortikosteroidima ili kod poremećaja koji prate bolesti, npr. Cushingov sindrom), a supresija imunološkog sustava prestaje obustavom kortikosteroidne terapije ili izlječenjem bolesti (61-63, 65-69). Zbog toga što kortizol izravno utječe na imunološki sustav, za očekivati je da je vrlo važan za fitnes organizma. Povišene vrijednosti kortizola negativno se odražavaju na imunološki sustav, pa se smatra da veći stupanj disregulacije (tj. više vrijednosti kortizola) u odgovoru na akutni psihološki stres predstavlja oslabljeni fitnes (59, 60, 62-65, 70, 71). **Slika 1.** prikazuje dijagram korelacije heterozigotnosti i fitnesa, A) općenito i B) na primjeru kortizola.



**Slika 1. (A) Teorija o korelaciji heterozigotnosti i fitnesa. Učinak okolišnih nepovoljnih čimbenika na svojstvo povezano s fitnessom modificiran je genomskom heterozigotnosti. Specifični slučaj (B) prikazuje utjecaj akutnog psihološkog stresa na poremećaj koncentracije kortizola, a koji je modificiran genomskom heterozigotnošću.**

Drugo, iako postoji nekoliko mjera heterozigotnosti (vidi poglavlje: **1.2. Heterozigotnost – mjera genetske raznolikosti**) autori smjernica preporučaju korištenje standardizirane multilokusne heterozigotnosti. (17) Razlog leži u tome što kada je heterozigotnost mjerena STR biljezima, za očekivati je da je veza s fenotipom neizravna te da je biljezima procijenjena opća heterozigotnost ispitivanog genoma i da ona ne odražava utjecaj određenog lokusa na fenotip, zato što su STR biljezi većinom neutralni i nalaze se u nekodirajućim regijama genoma. (17)

### **1.3.3. Istraživanja korelacije između heterozigotnosti i fitnesa**

Lerner je još 1954. godine postavio hipotezu da je heterozigotnost važna jer omogućava uspješnije održanje homeostaze u promjenjivom okolišu, te da heterozigotni organizmi imaju bolju mogućnost kompenzacije stalno promjenjivog okoliša (72). Do sada su

mnogi istraživači proučavali vezu između heterozigotnosti i raznih fenotipskih obilježja pri različitim uvjetima okoliša. (73) U literaturi se može naći nekoliko studija sličnog dizajna kao i moje istraživanje, koje su proučavale korelaciju heterozigotnosti i fitnesa. Dok postoji pozamašan broj studija na biljkama i životinjama, rijetke su studije koje proučavaju učinak heterozigotnosti u ljudi.

Izrazito poznato istraživanje provedeno na morskim lavovima pokazalo je kako srođeni organizmi više poboljšavaju od niza bolesti, uključujući: karcinome, parazitarne infekcije, bakterijske infekcije i trovanje toksinima algi (38). Također, istraživanja na ljudima pokazala su povoljan učinak heterozigotnosti kod zaraznih bolesti (npr. hepatitis, tuberkuloza, mortalitet od bakterijskih infekcija kod djece, te općeg zdravstvenog stanja), ali i nezaraznih (visok krvni tlak, povišeni kolesterol) (23, 24, 30, 47, 74-76).

Dok su učinci srođivanja na fitnes (u smislu preživljenja i reprodukcije) i rijetke Mendelske bolesti vrlo dobro dokumentirani, literatura o utjecaju heterozigotnosti na kompleksna obilježja i bolesti kasnije dobi vrlo je oskudna. (77) Izdvojit ću studije koje su analizirale povezanost heterozigotnosti i odabranih fenotipskih karakteristika u ljudi, te su po dizajnu izrazito slične istraživanju prikazanom u ovoj disertaciji.

Napravljeno je pretraživanje Pubmed baze podataka uz ključne pojmove „heterozygosity“ i „fitness“ s ograničenjem postavljenim na „humans“. Tako je dobiveno 113 radova koji su pregledani, te su izdvojena 24 rada koji su se činili bitnima za ovo istraživanje. Nakon detaljnijeg pregleda odabranih radova, pronađeno je pet

studija koje su analizirale povezanost heterozigotnosti i odabranih fenotipskih karakteristika u ljudi, a po dizajnu su izrazito slične istraživanju prikazanom u ovoj disertaciji.

U Framinghamskoj studiji (Framingham Heart Study) proučavan je utjecaj heterozigotnosti na nekoliko fenotipskih obilježja povezanih s kardiovaskularnom bolesti (73). Zbog toga što se važnost heterozigotnosti posebno ističe prilikom izloženosti okolišnom stresu, kao krajnji ishod je odabrano složeno svojstvo „rizik za kardiovaskularnu bolest“, za koje je sigurno da postoji mnoštvo čimbenika koji predstavljaju okolišni stres i doprinose razvoju te bolesti (npr. pušenje, loša prehrana, slaba fizička aktivnosti). Od ovih se okolišnih stresora očekuje da će opteretiti kompenzacijske mehanizme i pružiti odgovarajuće uvjete (točnije, stvoriti će nepovoljne uvjete okoliša) kako bi se mogla istražiti povezanost između stresora iz okoliša, heterozigotnosti i fenotipskih obilježja povezanih s kardiovaskularnom bolesti. Nakon što su rezultati pokazali pozitivan učinak heterozigotnosti na sistolički i dijastolički tlak, promjer i debljinu stjenke lijeve klijetke (sve bitni čimbenici u etiologiji kardiovaskularne bolesti), autori su zaključili da postoji povezanost multilokusne heterozigotnosti s fenotipskim karakteristikama koje su dijelom pod utjecajem uvjeta iz okoliša (73).

Drugo istraživanje (Campbell i sur. 2007) proučavalo je utjecaj heterozigotnosti na niz obilježja povezanih s najčešćim ljudskim bolestima (23). Autori su pronašli da je veća heterozigotnost povezana s nižim krvnim tlakom i nižom koncentracijom LDL

kolesterola, te sugeriraju mogućnost da se smanjena heterozigotnost može smatrati genetskim rizičnim čimbenikom u nastanku ovih bolesti.

S obzirom da važnost heterozigotnosti posebno dolazi do izražaja u nepovoljnim uvjetima koji predstavljaju izazov za organizam, istraživanja utjecaja heterozigotnosti na kompleksna svojstva (npr. ona koja predstavljaju rizični čimbenik u razvoju bolesti kasnije dobi) trebaju izmjeriti i heterozigotnost osobe i kvantitativno svojstvo. No to nije sve: kako bi pretpostavljeni pozitivan učinak heterozigotnosti došao do izražaja potrebno je da postoji okolišni stres, a istraživanje bi bilo bolje kada bi se i okolišni stres mogao kvantificirati.

Navedene studije (Campbell i sur. (2007) i Govindaraju i sur. (2009)) izračunale su individualnu heterozigotnost (prva s STR, a druga s SNP biljezima). Proučavani fenotip bila su kvantitativna svojstva koja su prepoznata kao rizični čimbenik u nastanku kardiovaskularne bolesti (krvni tlak, HDL, LDL, kolesterol, promjer i debljinu stjenke lijeve klijetke). Postojanje stresora je u oba istraživanja očekivano, zbog toga što je nemoguće izbjeći sve rizične čimbenike iz okoliša, koji pridonose razvoju kardiovaskularne bolesti (23, 73). Nažalost, iako je ispravno pretpostavljeno postojanje okolišnih stresora, samo je mali dio bio izmjeren i uzet u obzir prilikom analize (npr. pušenje i socioekonomski status), te nije bilo moguće procijeniti važnost heterozigotnosti pri različitim intenzitetima okolišnih stresora. U zaključku, u navedenim istraživanjima nije postojala dobro opisana i kvantificirana veza između okolišnih stresora i proučavanog fenotipa.

Kako bismo kvantificirali vanjske uvjete, mi smo u našem istraživanju odabrali okolišni stresor koji je moguće izmjeriti (akutno naručeno psihičko stanje), a za koji je dobro poznata povezanost s fenotipom (koncentracija kortizola).

Treća studija sličnog tipa koju treba spomenuti je istraživanje Lie i sur. (2009), a ispitalo je učinak heterozigotnosti na „svakodnevno“ zdravlje, odnosno ispitanici su tokom četiri mjeseca bilježili sve simptome koji su im se javljali u tom periodu. (30) Multilokusna heterozigotnost i genetička raznolikost  $d^2$  izračunati su pomoću 12 STR biljega u MHC regiji i 14 u drugim regijama genoma. Multilokusna heterozigotnost nije bila standardizirana. Kako bi barem djelomično isključili vanjske čimbenike koji bi mogli povećati broj zdravstvenih simptoma, analiza je bila korigirana na stres posebnim upitnikom koji ispituje depresivnost, anksioznost i stres. Autori su pronašli malu, ali statistički značajnu povezanost genetske raznolikosti i „svakodnevnog“ zdravlja.

Lyons i suradnici pokušali su procijeniti utjecaj multilokusne heterozigotnosti na podložnost zaraznim bolestima. (24, 74) U prvoj studiji 148 djece mlađe od 13 godina koja su umrla od invazivne bakterijske infekcije i 137 odgovarajućih kontrola genotipizirani su s 134 mikrosatelitna biljega. Standardizirana opažena homozigotnost bila je statistički značajno različita između slučajeva i kontrola ( $p=5,89 \times 10^{-6}$ ), te stoga autori zaključuju je heterozigotnost povezana sa smanjenim rizikom umiranja od invazivnih bakterijskih infekcija. (74)

Isti autori analizirali su i povezanost multilokusne heterozigotnosti i prijemljivosti za hepatitis, gubu i tuberkulozu. (24) Istraživanje u Gambiji napravljeno je za tuberkulozu,



pri čemu je uključeno 263 ispitanika genotipiziranih za 272 mikrosatelitna biljega i za hepatitis gdje je bilo uključeno 280 ispitanika genotipiziranih za 276 mikrosatelitna biljega; u Indiji je istražena prijemljivost za gubu te je analizirano 394 ispitanika koji su bili genotipizirani s 390 biljega dok je u Italiji istraživana povezanost s hepatitisom te je bilo uključeno 147 ispitanika koji su bili genotipizirani s 295 biljega. Nađena je snažna povezanost između multilokusne heterozigotnosti i prijemljivosti za tuberkulozu i perzistirajući hepatitis u populaciji Gambije. Međutim, nije nađena povezanost multilokusne heterozigotnosti i hepatitisa u populaciji Italije - autori smatraju da uzrok leži u slaboj snazi statističkog testa, zbog izbjegavanja srođivanja i posljedično malih razlika u multilokusnoj heterozigotnosti. Također, nije nađena povezanost između obolijevanja od gube i multilokusne heterozigotnosti u Indiji.

Napravljeno je dodatno pretraživanje Pubmed baze podataka sa srodnim pojmovima „inbreeding“ i „fitness“ te „heterosis“ i „fitness“, u oba slučaja uz ograničenje postavljeno na „humans“. U prvom slučaju dobiveno je 12, a u drugom 46 radova. Nisu pronađeni novi radovi relevantni za moje istraživanje. Također, u gore opisanih pet radova pregledan je popis literature kako bi se pronašle druge relevantne publikacije.

U studijama korelacije heterozigotnosti i fitnesa postotak varijance objašnjen s heterozigotnosti tipično je samo nekoliko posto ili manje, pa je tako na primjer u meta-analizi uključenih studija objašnjena varijanica u rasponu od 0,07% do 3,3%, a u studijama u kojima su korišteni STR biljezi oko 1% (17, 21, 78, 79).

#### 1.4. Prednost heterozigota

Pod pojmom **prednost heterozigota** (engl. heterozygote advantage) podrazumijevamo slučajeve kada organizam koji je heterozigot (AB) ima veći fitness u usporedbi s homozigotom neovisno o kojem se homozigotu radi, AA ili BB. Prednost heterozigota često dolazi do izražaja u ovisnosti o uvjetima okoliša, na primjer kada je jedan čimbenik okoliša poguban za homozigote AA, a drugi je poguban za homozigote BB, pa heterozigoti AB zapravo imaju u isto vrijeme i prednosti i nedostatke, no ukupno pokazuju najbolji fitness (primjeri će biti navedeni kasnije). Zbog toga prirodna selekcija<sup>7</sup> daje prednost heterozigotima i smatra se da je upravo selekcija mehanizam koji pomaže održanju heterozigota u populaciji i objašnjava njihovu povećanu učestalost. Ovakvi su slučajevi opisani i kod ljudi i kod životinja, a srpasta anemija predstavlja jedan od najpoznatijih slučajeva gdje selekcija favorizira heterozigote za određeni lokus kod ljudi.

Srpasta anemija je česta bolest u malaričnim područjima Afrike. (80, 81) Uzrok srpaste anemije je mutacija u genu za  $\beta$ -lanac hemoglobina (alel S), pri čemu dolazi do stvaranja promijenjenog hemoglobina-S. Kod osoba s genotipom SS dolazi do nakupljanja promijenjenog hemoglobina u eritrocitima, što dovodi do srpastog oblika eritrocita zbog čega se eritrociti u većoj mjeri odstranjuju iz cirkulacije. Posljedično,

---

<sup>7</sup> Prirodnu selekciju definiramo kao diferencijalni reproduktivni uspjeh jedinke ili genotipova, koji se temelji na mogućnosti genetičke varijacije obilježja povezanih s reprodukcijom. Njome se iz populacije uklanjaju štetne mutacije i funkcionalno poboljšava vrsta. Većina mutacija u kodirajućem dijelu genoma izložena je selekcijskom pritisku što smanjuje stopu preživljavanja nosioca mutacije, pa govorimo o negativnoj selekciji. Kada nastala mutacija poboljšava reproduktivnu sposobnost jedinke, govorimo o pozitivnoj selekciji. Ponekad mutacija može biti podjednako korisna kao i prisutne genetske varijante, pa takvu mutaciju određujemo kao selektivno neutralnu.

dolazi do razvoja teške anemije i pratećih tegoba (npr. mikroembolija i hipoksije), te do taloženja defektnih eritrocita u zglobovima i kapilarama. Osobe SS genotipa bez medicinske pomoći obično umiru u ranoj dobi. S druge strane, heterozigoti SA genotipa (alel A kodira normalan oblik hemoglobina, hemoglobin-A), imaju samo blagi oblik anemije, no u usporedbi s homozigotima AA otporniji su na malariju; možda zato što dolazi do deformacije eritrocita koji su inficirani s parazitom pa isti budu ranije odstranjeni iz cirkulacije (81, 82). Homozigoti za normalan oblik proteina (AA) nisu anemični, ali su podložni teškim oblicima malarije s često smrtnim ishodom. (81)

Kod životinja sličan je primjer zabilježen među populacijama štakora koje su bile tretirane otrovom varfarinom (81, 83). Štakori homozigotni za divlji tip gena (wt alel), osjetljivi su na otrov varfarin te nakon njegova konzumiranja umiru uslijed krvarenja (varfarin interferira s vitaminom K, koji je nužan za nastanak faktora koagulacije). Kao odgovor na otrov, u populacijama štakora pojavila se mutacija u genu VKORC1 koja omogućava otpornost na otrov (R alel). Štakori homozigotni za ovaj gen zahtijevaju ogromne količine vitamina K kako bi preživjeli, zbog promijenjene funkcije enzima u metabolizmu vitamina K. Nasuprot oba homozigota, heterozigoti wt/R imaju evolucijsku prednost: divlji tip gena (pa i enzima) omogućuje normalan metabolizam vitamina K, a gen za rezistenciju na otrov ih štiti od varfarina (81).

Prirodna selekcija glavna je odrednica genetičke kompozicije i izravno određuje koji će se geni prenijeti u slijedeću generaciju, a koji će se odstraniti iz populacije (16). Organizam bolje prilagođen životnim uvjetima, to jest onaj koji pokazuje veći fitness, imati će veću vjerojatnost za preživjeti i za dati potomstvo. U slučaju srpaste anemije,

selekcija odabire heterozigote jer u malarijom zahvaćenim područjima heterozigoti imaju veći fitness i od osoba homozigotnih za S-hemoglobin, ali i od osoba homozigotnih za normalan hemoglobin (16). Jednako tako, u uvjetima izloženosti otrovu varfarinu, štakori s jednom kopijom gena za rezistenciju selekcijski su u najpovoljnijem položaju i pokazuju veći fitness od oba homozigota.

Ova dva izolirana primjera dobro oslikavaju osnovnu ideju prednosti koju nudi veća heterozigotnost. Ako osoba nosi dvije identične kopije gena, to znači da će se translacijom tog gena na ribosomima proizvoditi potpuno jednak protein iz obje kopije gena. To dalje znači da će, na primjer, ako je protein koji se stvara enzim, postojati samo jedan set vanjskih uvjeta (poput pH i temperature) kada će enzim optimalno funkcionirati. Otklanjanjem od optimalnih uvjeta, funkcionalnost enzima opada što može dovesti do poremećaja funkcije i na razini organizma. Međutim, ako osoba nosi dvije funkcionalne, ali različite kopije gena, što znači da se proizvode dva funkcionalna i različita enzima, moguće je da dvije forme optimalno funkcioniraju pri različitim uvjetima: na primjer, jedan oblik može izgubiti funkciju pri povišenoj tjelesnoj temperaturi, no funkcionalnost alternativnog oblika možda neće ovisiti o temperaturi. S dvije funkcionalne, ali različite forme organizam se dodatno osigurava za slučaj nepovoljnih uvjeta jer je proširen spektar uvjeta u kojima može odgovarajuće reagirati - ako jedan protein izgubi funkciju tu je alternativni oblik koji će moći dalje obavljati zadaću.

Nemoguće je općenito kazati što je optimalno, jer će za svaki gen i svaki organizam okolnosti biti jedinstvene. No ukupno gledano, čini se moguće da dva funkcionalna i

različita oblika proteina osiguravaju funkcionalnost pri širem spektru uvjeta i time stvaraju povoljnije preduvjete za osiguranje homeostaze, na razini pojedinog organizma jednako kao i na razini cijele populacije.

### **1.5. Uloga okolišnih i genetičkih čimbenika u nastanku bolesti**

S obzirom na etiologiju, bolesti teorijski možemo podijeliti u dvije velike, u praksi teško odjeljive skupine: bolesti primarno genetskog podrijetla i bolesti uzrokovane okolišnim čimbenicima. Bolesti primarno genetskog podrijetla su većinom monogenske, tj. mendelske nasljedne bolesti. One su obično uzrokovane mutacijom jednoga gena i ta je mutacija snažnog učinka: ako je mutacija prisutna razviti će se bolest. Ako mutacije nema, neće doći do bolesti (kod dominantnih bolesti je potreban jedan, a kod recesivnih dva mutirana alela).

Većina ostalih bolesti je u većoj ili manjoj mjeri poligeniski uvjetovana, odnosno mutacije u brojnim genima utječu na nastanak, razvoj i tijek bolesti. U ovu skupinu bolesti ubrajamo i vodeće uzroke mortaliteta i morbiditeta u razvijenim zemljama, primjerice koronarnu bolest srca, rak, dijabetes i psihičke bolesti. U znanstvenim krugovima uvriježio se koncept “česta bolest/česta varijanta” (engl. common diseases/common variant, CD/CV) koji pretpostavlja da je učestalost uzročnih mutacija za česte bolesti u populaciji veća od 5% (84, 85). Ove su bolesti uobičajeno multifaktorski uvjetovane, što znači da u njihovoj etiologiji osim gena značajnu ulogu imaju i okolišni čimbenici. Činjenica da geni mogu biti u međusobnoj interakciji, kao i

u interakciji s okolišem te različito pridonosi ekspresiji fenotipa dodatno komplicira i otežava istraživanja (86, 87). Zbog složenosti njihove etiologije ove bolesti nazivamo čestim složenim bolestima (engl. common complex diseases).

Pri dizajniranju istraživanja čiji je cilj pronalaženje uzročnih gena, iznimno je važno uzeti u obzir kompleksnost etiologije i genetske podloge, te razmotriti način na koji se ona može pojednostaviti kako bi se utvrdila asocijacija između mjerena genotipa i fenotipa. Ova nastojanja objedinjena su u području genetskih istraživanja koje nazivamo genetske asocijacijske studije, a u zadnje vrijeme dominiraju cjelogenomske asocijacijske studije (engl. genome-wide association studies, GWAS). Do danas je analizom genetičkih podataka prikupljena ogromna količina novog znanja o fiziološkim i patofiziološkim procesima u podlozi kvantitativnih svojstava i bolesti (88, 89), a očekuju se i novi proboji kada sekvenca genoma postane dostupna.

Uz okoliš i gene kao čvrsto utemeljene čimbenike u nastanku bolesti, danas je prihvaćeno da psihološki i psihički čimbenici također mogu imati značajan utjecaj na razvoj somatskih bolesti (90, 91). Pod pojmom „somatske bolesti“ podrazumijevamo bolesti čije je simptome moguće utvrditi objektivnim pretragama i dijagnostičkim testovima. Iako psihološki čimbenici najčešće nisu sami po sebi niti nužni, a niti dovoljni za razvoj većine somatskih bolesti, njihov značajan doprinos u kombinaciji i interakciji s ostalim rizičnim čimbenicima - kako genetskim, tako i okolišnim - ne može biti isključen (92, 93). Skupinu bolesti u čijoj je etiologiji prepoznat važan utjecaj psihičkih čimbenika, primjerice stresa, nazivamo „psihosomatskim bolestima“. Teško je, međutim, objektivizirati i mjeriti psihološke uzroke bolesti. Još je teže mjeriti

interakcije psiholoških čimbenika s jedne strane i okolišnih ili genetskih čimbenika s druge strane, no bez razumijevanja tih interakcija teško ćemo u potpunosti razumjeti etiologiju većine bolesti. Zbog otežanog mjerenja psiholoških stanja i njihovog utjecaja na razvoj ljudskih bolesti, neki autori smatraju da je ovaj skup mogućih rizičnih čimbenika znatno podcijenjen i nepravedno zanemaren u usporedbi s okolišnim i genetskim rizičnim čimbenicima (94, 95).

Doprinos okolišnih čimbenika u nastanku bolesti razmjerno je dobro istraženo područje; pažnja posvećena okolišnim čimbenicima zasigurno je barem djelomično uvjetovana time što su ovi čimbenici u mnogim slučajevima dobro definirani, vidljivi i često lako mjerljivi. Nasuprot tome, genetičke čimbenike do nedavno uopće nije bilo moguće mjeriti ili je bilo moguće prikupiti tek vrlo ograničeni broj informacija (npr. analiza duljine restrikcijskog fragmenta, engl. RFLP) uz veliki utrošak vremena i sredstava. Tek je u zadnjih nekoliko godina, obilježenih izrazitim tehnološkim napretkom u tehnikama analize DNK i genotipiziranju, omogućeno ispitivanje velikog broja genetičkih markera i masovno prikupljanje informacija iz genoma (89). Uobičajene genetske studije danas prikupljaju podatke za nekoliko stotina tisuća (ili čak 1-2 milijuna) genetičkih biljega za svakog ispitanika, a bliži nam se i doba kada će biti moguće sekvencioniranje egzoma i cijelog genoma (84, 96-101).

U usporedbi s genotipom na određenom lokusu, rezultatima krvnih pretraga ili visinom, nekome tko nije stručnjak može biti teško prihvatiti mjerenje psiholoških čimbenika kao „egzaktno“ – iako je subjektivnost ispitivača zapravo prisutna u mnogim dijagnostičkim

testovima u klasičnoj medicini (npr. očitavanje nalaza slikovnih pretraga ili mjerenje krvnog tlaka).

Time je pred istraživače koji zagovaraju značenje psiholoških i psihičkih čimbenika u razvoju ljudskih bolesti postavljen veći izazov u osmišljavanju i dizajniranju što je moguće kvalitetnijih istraživanja koja bi na vjerodostojan i ponovljivi način mogla uvjeriti znanstvenu zajednicu u njihov stvaran etiološki doprinos razvoju bolesti, budući da je razumjeti „bolest“ kao složenu pojavu moguće jedino istraživanjem okolišnih, genetskih i psiholoških čimbenika zajedno s njihovim međusobnim interakcijama. Ovakva interdisciplinarna istraživanja koja uzimaju u obzir brojne čimbenike postaju moguća tek u današnje vrijeme obilježeno brzim razvojem računala i statističkih metoda i pristupa (npr. kako analizirati preko 500.000 podataka po ispitaniku, kako primjereno korigirati granicu statističke značajnosti za velik broj napravljenih statističkih testova itd.).

Već dugo su poznati instrumenti koji omogućavaju sve preciznije kvantificiranje općenitog psihološkog profila pojedinaca i međusobno razlikovanje osoba prema osnovnim psihološkim obilježjima. Uz instrumente koji ispituju tip ličnosti ili inteligenciju (npr. EPQN upitnik ličnosti, Goldbergov upitnik za mjerenje pet-faktorskog modela ličnosti, različiti IQ testovi), pridodani su i instrumenti koji omogućavaju opažanje akutno ili kronično narušenog psihičkog zdravlja (npr. GHQ – Opći upitnik o zdravlju, Goldbergov upitnik o depresiji).



Jasno je da čovjeka čine njegovo tijelo i njegova psiha. Stoga su zapravo sva stanja, poremećaji i bolesti u ljudi psihosomatske prirode – imaju svoje tjelesne i svoje psihičke uzroke ili situacije u kojima se javljaju. Nije jednostavno za objasniti (ili razumjeti) kako se tijelo i psiha isprepliću, pokazati mehanizam kojim tijelo utječe na psihi, ili pak kako psiha utječe na tijelo. Ipak, intuitivno nam je vrlo lako razumjeti da događaji na razini tijela utječu na psihološko stanje: lako ćemo shvatiti tugu i depresiju oboljelog od karcinoma ili anksioznost osobe s novonastalim invaliditetom. Štoviše i manje će se dramatični tjelesni poremećaji odraziti na psihičko stanje pojedinca: prekomjerna tjelesna težina, loš ten ili ćelavost mogu biti dovoljni da unište samopouzdanje i budu uzrok velikog nezadovoljstva. Kako postoji psihički odgovor na svaku tjelesnu bolest, možemo se zapitati hoće li postojati tjelesni odgovor kod psihičkih bolesti ili psihičkih poremećaja. Anorexia nervosa evidentan je primjer kako psihički poremećaj izravno utječe na tijelo. No kod većine je bolesti takva povezanost manje očita i teže objašnjiva.

Bilo bi izuzetno intrigantno dokazati kako osobe različitih psiholoških profila dugoročno imaju sklonost različitim skupinama somatskih bolesti, a studije koje potkrepljuju ovu tezu već su objavljene u svjetskoj literaturi (102, 103). Psiholozi Friedmann i Rosenmann su još davne 1948. godine u poznatoj Framinghamskoj studiji psihološkim intervjuom odvajali osobe tipa A od osoba tipa B, te je nakon 20 godina trajanja te longitudinalne prospektivne studije utvrđeno da osobe tipa A značajno češće obolijevaju od koronarne bolesti. Nacionalni institut za srce, pluća i krv (Sjedinjenih Američkih Država) je 1981. godine objavio da tip A ličnosti predstavlja veći rizik za

koronarnu bolest srca i infarkt nego pušenje, dob, hipertenzija ili visoki kolesterol, ističući taj važan psihički čimbenik u etiologiji, ove danas najčešće bolesti u razvijenijim zemljama. Osobe tipa A su ambiciozne, nestrpljive, uvijek u žurbi, nameću si mnogo poslova u kratko vrijeme, agresivne su i željne stalnog dokazivanja. Nastojeći svugdje „biti prvi“, dolaze u sukobe s bližnjima i koliko god najčešće uspijevaju postići svoje ciljeve, ostaju i dalje nezadovoljni i u neprijateljstvu s okolinom u kojoj žive. Danas se za mnoge organske bolesti smatra da su povezane s psihičkim stanjem te da je psiha važan etiološki čimbenik. Tako egzacerbacija psorijaze često uslijedi nakon stresnog događaja (poput rastave braka ili smrti bliske osobe), a ulkusi dvanaesnika klasično se povezuju s dugotrajnom izloženosti stresu (na primjer kod poslovnih ljudi). Bolesti poput bronhalne astme, menstrualnih problema, iritabilnog kolona, ulceroznog kolitisa, ekzema, neurodermitisa, migrene, povišenog krvnog tlaka također su velikim dijelom psihološki uvjetovane.

Još neposredniji dokaz o ulozi psiholoških čimbenika u nastanku somatskih bolesti bio bi izdvojiti ljude kod kojih je nastupilo akutno narušenje psihičkog zdravlja, ili pak popuštanje kompenzacijskih mehanizama, te pokazati kako takvo kratkoročno stanje dovodi do objektivno mjerljivih promjena u odnosu na opću populaciju, na primjer u metabolizmu i imunološkom sustavu. U literaturi se mogu naći studije koje istražuju povezanost psihičkih stanja i npr. C-reaktivnog proteina i klirensa kreatinina, kao biljega koji odražavaju akutno stanje u organizmu (104-106). Nedavna studija Rief i sur. (2010) pokazala je značajan utjecaj akutnog raspoloženja i trenutnog stresa kojem su izloženi ispitanici na koncentraciju markera upale i kateholamina tokom noći (107).

Dodatni primjer takvog istraživanja bilo je dokazano pogoršanje vrijednosti u krvi velikog broja biokemijskih i imunoloških parametara u oslobođenih zarobljenika iz ratnih logora tijekom rata u Bosni i Hercegovini (108). U tom slučaju značajan čimbenik koji je mogao utjecati na rezultate ovog istraživanja bila je i prateća neuhranjenost i iscrpljenost ratnih zarobljenika. Rijetke su studije u mirnodopskom razdoblju koje su se bavile ovom problematikom (109, 110).

### **1.6. Hormoni stresa i kortizol**

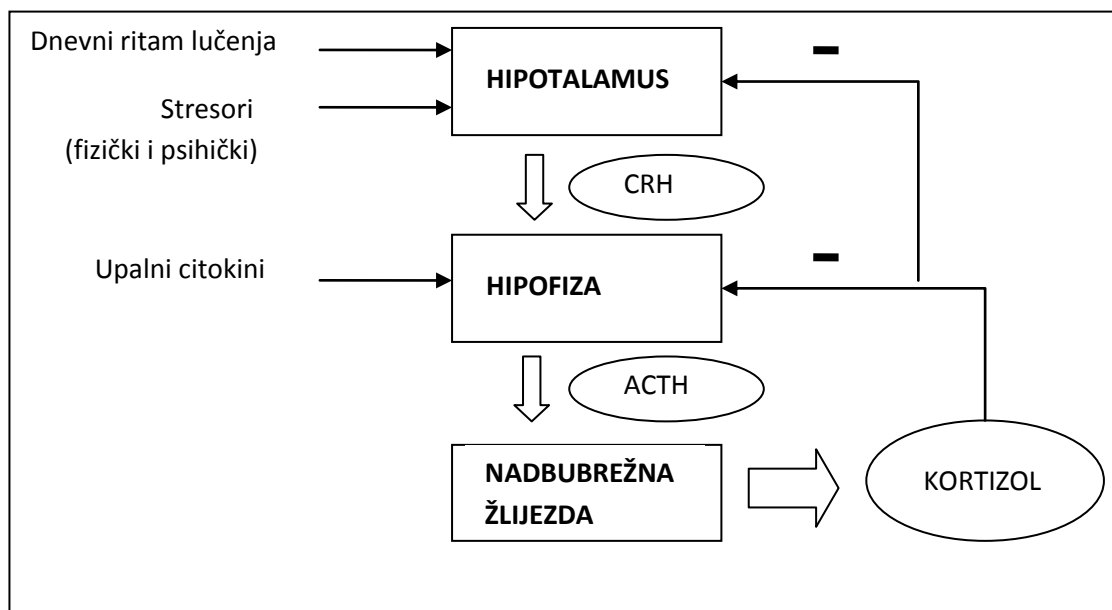
Danas se pojam „stres“ često susreće, kako u psihologiji, tako i u medicini i biologiji. Prema jednostavnoj definiciji, stres je duševno ili tjelesno preopterećenje organizma<sup>8</sup>. Organizam je u stanju stresa kada nije sposoban primjereno odgovoriti na fizičke ili psihičke prijetnje te dolazi do narušavanja psiho-fizičke ravnoteže i poremećene homeostaze.

Kao poznati primjer koji zorno predočava vezu između psihičkog stanja i organskih procesa često se spominje pojačano lučenje adrenalina u strahu ili bijegu, kako kod ljudi, tako i kod životinja. (111) Organizam na opasnu ili neugodnu situaciju reagira lučenjem adrenalina, s ciljem da se tijelo pripremi na reakciju – među inim, šire se zjenice, srce brže kuca, krvotok se preusmjerava u mišiće i mozak, iz jetre se oslobađa glukoza i drugo. (111)

---

<sup>8</sup> Definicija prema: Klaić, Rječnik stranih riječi. Pojam je uveo kanadski liječnik H. Selye 1930. godine.

Hormon čije je lučenje nedvojbeno povezano sa stresom je kortizol pa se ovaj hormon često naziva „hormon stresa“ (70). Brojna su istraživanja pokazala da se raznorodni psihički stres i anksioznost - pa čak i samo očekivanje stresne situacije - odražavaju na lučenje kortizola (112-114). Naravno, neće sve osobe jednako reagirati: stresnom situacijom uzrokovana patološka promjena u lučenju kortizola razlikovati će se od osobe do osobe, te će ovisiti o mnogim čimbenicima, poput psihičkih osobina (npr. samopouzdanje), crta ličnosti (npr. neuroticizam), popratnih bolesti (npr. depresija), navika (npr. pušenje) i drugo (113, 115-118).



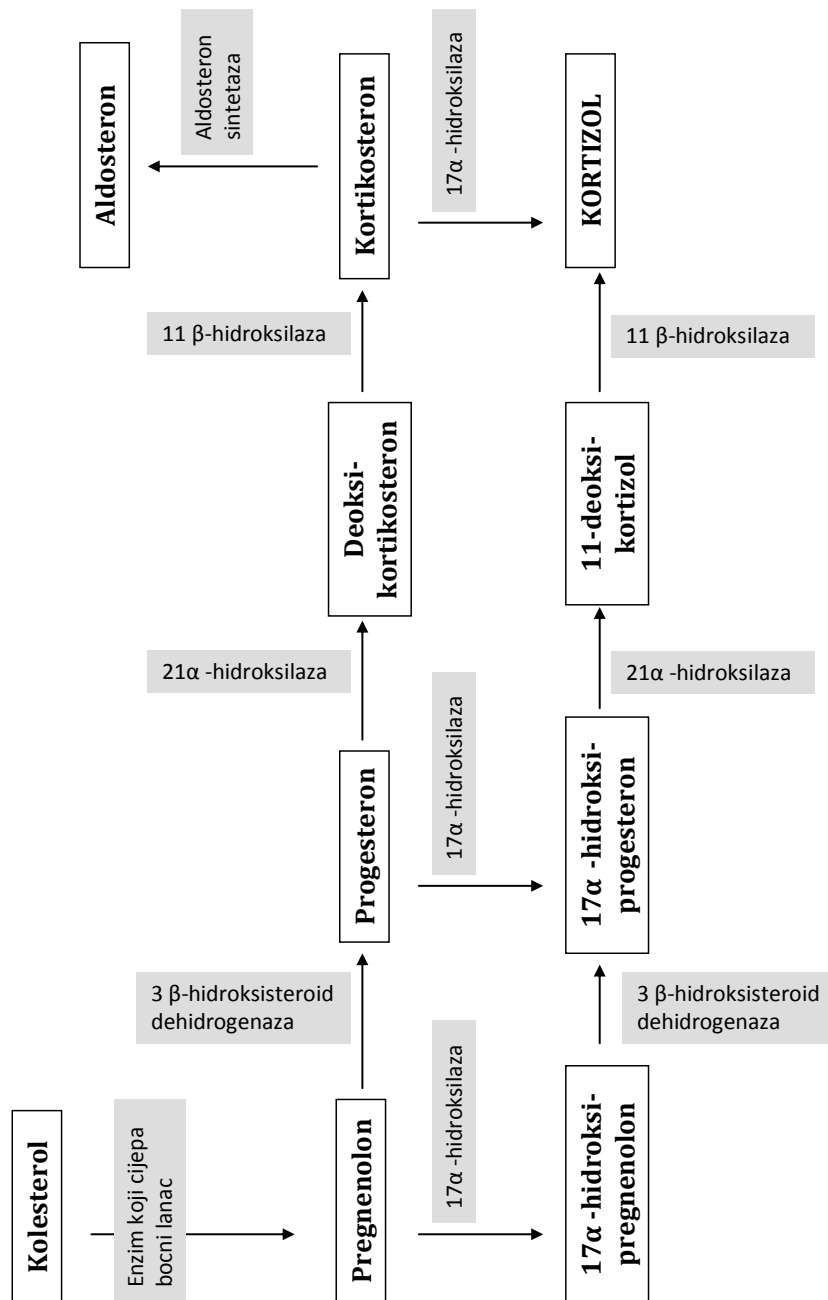
**Slika 2. Regulacija kortizola i čimbenici koji utječu na njegovo lučenje.**

Kortizol je hormon kore nadbubrežne žlijezde, a njegovo je lučenje pod kontrolom hipotalamusa i hipofize (Slika 2). Kortikotropin-oslobađajući faktor (CRH, engl.

corticotropin-releasing hormone) luči se u hipotalamusu te ima cirkadijani ritam lučenja; no stres i drugi podražaji mogu utjecati na lučenje CRH. Iz hipotalamusa CRH dolazi u prednji režanj hipofize gdje potiče lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u krv. Na kraju, ACTH potiče lučenje kortizola u kori nadbubrežne žlijezde (**Slika 2**). Preciznije, djelovanjem brojnih enzima kortizol se sintetizira iz kolesterola u *zoni fasciculati* kore nadbubrežne žlijezde (**Slika 3**).

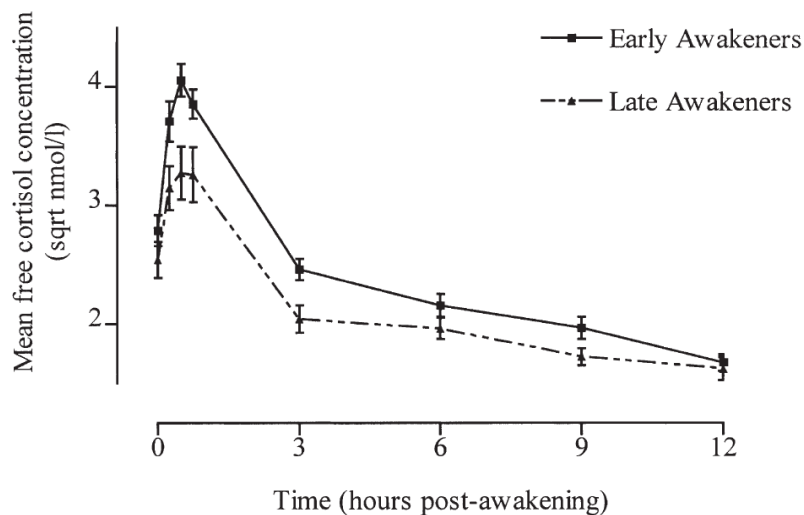
Potpuni podaci o koncentraciji kortizola, a posebno ritma lučenja, dobiju se kada se kortizol mjeri u više navrata tijekom dana (ili kontinuirano cijeli dan). Tako je lučenje kortizola u ljudi detaljno proučeno još 1971. kada je opisan cirkadijani ritam lučenja i periodično lučenje u 6 zdravih osoba (119). Prosječno je nađeno 9 epizoda sekrecije kortizola u 24 sata (raspon: 7-13), a aktivno lučenje kortizola zbiva se 24% vremena (119). Prosječno se u 24 sata izluči 16 mg kortizola, a njegovo je vrijeme poluraspada u krvi 66 minuta. Razlike u lučenju kortizola dolaze većinom iz (a) razlike u frekvenciji i (b) duljini sekretorne faze, dok je sama sekrecija u vremenu prilično konstantna i iznosi oko 0,05 mg/min (119).

Autori su definirali četiri faze sekrecije: 1) *minimalna sekretorna aktivnost* (4 sata prije usnivanja i prva 2 sata sna), 2) *preliminarna noćna sekrecija* (treći do peti sat sna), 3) *glavna sekretorna faza* (zadnja 3 sata sna i prvi sat nakon buđenja), i 4) *interminantna sekretorna aktivnost*, preostali dio dana. Koncentracija kortizola u krvi obično je najviša ujutro, 45 minuta nakon buđenja (kao posljedica glavne sekretorne faze), dok su koncentracije najniže u snu - obično nakon 3 do 5 sati spavanja (119, 120).



Slika 3. Biosinteza kortizola iz kolesterola.

U praksi, uobičajen način mjerenja vrijednosti ovoga hormona je određivanje razine hormona u krvi koja je uzeta između 8:00 i 9:00 sati ujutro (optimalno 30-45 minuta nakon buđenja, kada je koncentracija najviša). Vrijeme uzimanja krvi za mjerenje kortizola izrazito je važno, upravo zbog naglašenog cirkadijanog ritma lučenja.



**Slika 4. Srednje vrijednosti kortizola (korijen-transformirane) od 0 do 12 sati nakon buđenja. Prikazana je krivulja za osobe koje se bude rano (puna linija) i za osobe koje se bude kasno (isprekidana linija) (preuzeto iz *Psychoneuroendocrinology*, vol. 26, Edwards i sur., *Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity*, str. 613–622, Copyright (2001), odobrio: Elsevier).**

Zbog intenzivnog lučenja kortizola u glavnoj sekretornoj fazi, promjene koncentracije su u ovom periodu najizraženije: u zadnjem satu sna i neposredno poslije buđenja bilježi se nagli porast, a potom 30-60 minuta nakon buđenja nagli pad koncentracije (**Slika 4**). To u praksi znači da će izmjerene vrijednosti biti značajno različite ako se kortizol mjeri 30, 45 ili 90 minuta nakon buđenja, što dodatno otežava interpretaciju rezultata kada ne postoji podatak o točnom vremenu buđenja.

Razina kortizola u krvi prati cirkadijani ritam lučenja, no psihički ili fizički stres modificiraju lučenje kortizola te dovode do odstupanja koncentracije kortizola i ritma lučenja od normale. Poremećaj koncentracije kortizola, ili poremećaj dnevnog ritma lučenja, može biti posljedica raznih okolišnih čimbenika ili bolesti; na primjer, patoloških vrijednosti ACTH (npr. tumor), depresije, hipoglikemije, raznih organskih bolesti, povišene temperature, traume ili operacije, boli, straha, izloženosti ekstremnim uvjetima i drugo.

Kortizol djeluje na mnoga tkiva i brojne organske sustave (68). Predmnijeva se da, slično kao i adrenalin, kortizol predstavlja odgovor tijela na opasnost i stres, te u tom smislu potiče procese koji omogućavaju „bijeg i obranu“, a stišavaju se lokalno „nepotrebni“ procesi poput cijeljenja rana, imunološkog odgovora i osjećaja gladi ili boli (61-63, 65-70, 121).

Primjerice, kortizol podiže razinu šećera u krvi poticanjem glukoneogeneze u jetri; potiče razgradnju bjelančevina (npr. dovodi do gubitka kolagena u koži); utječe na koncentracije elektrolita (prvenstveno natrija i kalija) te ima višestruke i važne učinke



na imunološki sustav: glavni je učinak na imunološki sustav imunosupresija (pa se u tu svrhu koriste glukokortikoidi u liječenju), no dugotrajno povišena koncentracija kortizola i prateća imunosupresija mogu imati izražene štetne posljedice na organizam (61, 64-67, 69, 71).

Ekstremni primjer je Cushingov sindrom, poremećaj koji je uzrokovan dugotrajno i jako povišenom razinom kortikosteroida, koji imaju jednak učinak na tijelo kao i kortizol (59, 60). Uzrok njihove povećane koncentracije najčešće je dugotrajna terapija visokim dozama kortikosteroida, na primjer prednisonom, deksametazonom (Decadron) ili metilprednizolonom (Medrol.), ili rjeđe tumor (obično tumor hipofize koji luči ACTH, koji pak potiče pojačano lučenje kortizola) (59, 60, 122-125). Na primjeru Cushingovog sindroma može se predočiti koji su učinci dugotrajno povišene razine kortikosteroida: atrofija kože popraćena nastajanjem strija, aknama i kožnim infekcijama, centripetalna debljina, hiperglikemija, oportunističke infekcije zbog oslabljenog imuniteta, slabije cijeljenje rana, osteoporoza i drugo (59, 60).

### **1.6.1. Jutarnja koncentracija kortizola.**

Odgovor kortizola na buđenje predstavlja nezavisan korak u dnevnom ritmu lučenja kortizola, pa neke studije sugeriraju da je jutarnja sekrecija pod zasebnom regulacijom, različitom od regulacije cirkadijanog ritma lučenja; u zdravih odraslih ljudi koncentracija kortizola poveća se za 50-160% samo 30 minuta nakon buđenja. (126) Upravo jutarnja koncentracija kortizola pokazuje najsnažniju statističku povezanost s

psihičkim zdravljem i zadovoljstvom u životu. (126-128) Blagostanje (engl. well-being) i dobro psihičko stanje povezani su s nižim razinama kortizola i boljim fizičkim zdravljem (127, 128), a broj publikacija koje ukazuju na važnost blagostanja i dobrog osjećanja za zdravlje svake je godine sve veći. Opće je prihvaćeno da stres negativno utječe na imunološki sustav (129), a upravo su povišene koncentracije kortizola jedan od glavnih medijatora ovog učinaka. Za povišenu koncentraciju kortizola je poznato da djeluje imunosupresivno i narušava regulaciju imunološkog sustava. Nadalje, pokazano je kako je učinak dovoljno snažan da može naštetiti zdravlju pojedinca.

### **1.7. Instrumenti za mjerenje psihičkog stanja: GHQ-30**

Psihičko zdravlje je složena, višedimenzionalna pojava i ne postoji jednostavan način njegove procjene. Opći upitnik o zdravlju (engl. General Health Questionnaire, GHQ) mjeri trenutačno psihičko zdravlje, a ne opće zdravlje pojedinca. Upitnik utvrđuje ispitanikovo trenutno psihičko stanje, uspoređujući kako se ono razlikuje od ispitanikovog uobičajenog stanja. Stoga je ovaj upitnik osjetljiv na kratkoročne psihičke poremećaje, ali ne i na dugotrajna obilježja ispitanika, tako da omogućuje uspješno otkrivanje akutno narušenog psihičkog zdravlja (130-132).

Ovaj je upitnik našao primjenu u grani epidemiologije koju nazivamo psihometrijska epidemiologija. Radi se o kvantitativnoj disciplini u čijoj se podlozi nalaze statistički modeli, međutim ona podjednaku pažnju pridaje procjeni pouzdanosti i valjanosti istraživanja. Pomoću nje se mogu istraživati multipla kvantitativna obilježja, ali i

diskretne psihijatrijske dijagnoze. Tako se GHQ upitnik koristi kao alat probira (engl. screeninga) kako bi se otkrili manji psihijatrijski poremećaji koji u podlozi nemaju psihotičnu etiologiju.

GHQ upitnik ispitanici samostalno ispunjavaju, a usredotočen je na dva područja: nesposobnost normalnog funkcioniranja i pojavu novih uznemirujućih stanja. Prema Goldbergu i Williamsu (1991), postoji cijeli niz minornih somatskih simptoma i promjena u socijalnom ponašanju. (133) Ovakve pojave u cijelosti definiraju pojmovi emocionalni stres, psihološki stres i psiho-socijalna disfunkcija.

Upitnik se primjenjuje u općoj populaciji ili kod pacijenata zaprimljenih na odjele bolničkog sustava koji se ne bave isključivo psihijatrijskim bolestima i poremećajima - primjerice u primarnoj praksi ili pri ambulantnom prijemu. Namijenjen je isključivo odraslim osobama (ne dječjoj populaciji), a koristan se pokazao i u nekim istraživanjima adolescenata.

Još od kada je Goldberg 70-ih godina utemeljio i razvio GHQ upitnik, poznat i pod imenom Goldbergov GHQ upitnik, on je našao široku primjenu u različitim područjima istraživanja. Njegova ideja bila je razviti upitnik koji će moći razlikovati pacijente koji imaju psihijatrijske probleme od onih dobrog mentalnog zdravlja. Primjenu je našao u medicini rada, općoj medicini, psihologiji, ali i u kliničkoj praksi kada se želi procijeniti prisutnost psihičkog poremećaja kod pacijenata. Premda je inicijalno razvijen kao upitnik s 60 pitanja, postoji suvišnost informacija pa su razvijene verzije upitnika s

manje pitanja, ali zadovoljavajućom osjetljivošću pri diskriminaciji zdravih i oboljelih.

Kraće verzije koje se koriste u istraživanjima su GHQ-30, GHQ-28 i GHQ-12.

Svaka od ovih verzija ima svoje prednosti i nedostatke, te odabir verzije GHQ upitnika ponajprije ovisi o istraživanoj populaciji, vrsti istraživanja, uvjetima i drugim praktičnim pitanjima kao što su raspoloživo vrijeme, mjesto istraživanja i dr.

**GHQ-60** jest cjelovit upitnik koji sadrži 60 pitanja i detektira potencijalne slučajeve narušenog psihičkog zdravlja u istraživanoj populaciji. Međutim, idealno istraživačko okruženje u smislu raspoloživog vremena i prikladnih ispitanika nije često. Kod istraživanja gdje je vrijeme ograničeno, ili u slučaju kada ispitanici imaju poteškoće s čitanjem te im je potrebno pročitati pitanja, ovaj upitnik nema prednosti u usporedbi s kraćim verzijama, primjerice GHQ-12 upitnikom. S GHQ-60 upitnikom dobijemo ukupan zbroj koji možemo analizirati na pojedinačnoj i skupnoj razini temeljem preporučene granične (engl. cut-off) vrijednosti iz ranijih istraživanja. (134)

**GHQ-30** predstavlja kraću verziju upitnika GHQ-60 iz kojeg su izostavljena pitanja koje se odnose na fizičke tegobe (bolesti, simptome, stanja) i učinjena je bolja diskriminacija psihijatrijske etiologije. Valjanost GHQ-30 kao alata koji uspješno identificira slučajeve s psihijatrijskom etiologijom dokazana je u više studija, a prosječna senzitivnost procijenjena je na 81%, a specifičnost na 80%. (134, 135) Psihološki simptomi procjenjuju se temeljem pet kriterija mentalnog zdravlja: anksioznost, samopouzdanje, depresija, otežano nošenje s problemima i socijalnu disfunkcija. (136)

Ova verzija sa svojih 30 pitanja pokazala se kao odličan alat za probir slučajeva u nešto kraćem vremenu. Velika zastupljenost u istraživanjima i literaturi upućuje da je GHQ upitnik široko prihvaćen instrument, korišten u vrlo raznorodnim istraživanjima i u različitim populacijama koje su se razlikovale po dobi, kulturi, socioekonomskom statusu i drugim čimbenicima. GHQ-30 se pokazao kao izuzetno primjenjiv, dobro prihvaćen, osjetljiv i specifičan instrument za procjenu akutno narušenog psihičkog zdravlja, te je upravo ova verzija upitnika najčešće korištena i validirana, a službeno se navodi čak 29 validacijskih studija. Veliki broj takvih studija najčešći je razlog odabira ove verzije od strane istraživača bez obzira na neke nedostatke. Naime, prednost GHQ-30 verzije u usporedbi s GHQ-60 je dvostruko kraće vrijeme koje je potrebno za njegovo ispunjavanje: 3-4 minute nasuprot 6-8 minuta. Premda se razlika čini zanemariva, ipak se neki istraživači s obzirom na mjesto istraživanja (primjerice ambulante) odlučuju za kraću verziju upitnika. Populacijska istraživanja daju prednost dužoj verziji, jer ima veću šansu detektirati slučajeve u populacijama gdje je njihova prevalencija niska. I kod ove verzije imamo ukupan zbroj koji možemo usporediti temeljem preporučenih graničnih vrijednosti.

**GHQ-28** verzija naziva se također i multidimenzionalni upitnik, a s njim se procjenjuju somatski simptomi, anksioznost i nesanica, socijalna disfunkcija i teža depresija. Kod ove verzije postoji mogućnost procjene ne samo ukupnog zbroja, već i profila ukupnog zbroja na pojedinim sub-skalama. Upravo se zbog te osobine ova verzija smatra posebno korisnom. Ova verzija GHQ upitnika sadrži 28 pitanja koja su temeljem faktorske analize podijeljena u četiri sub-skale od kojih svaka sadrži sedam pitanja. A–

somatski simptomi (1-7), B– anksioznost/nesanica (8-14), C– socijalna disfunkcija (15-21) i D–teža depresija (22-28). Za sub-skale ne postoji granična vrijednost već se one koriste pri kreiranju individualnog dijagnostičkog profila, pa su dodatne informacije o anksioznosti i depresiji jedna od prednosti ove verzije. Kako bi se identificirali slučajevi temeljem GHQ-28 verzije upitnika nužno je koristiti totalni zbroj svih sub-skala. Goldberg i sur. su 1997. godine napravili studiju o mentalnim bolestima kojom su validirane dvije verzije upitnika na pacijentima u općoj praksi, te se ovo istraživanje smatra jednim od najznačajnijih u kojima je korištena ova verzija upitnika. (137) Zbog toga što je jedna četvrtina elemenata ovog upitnika vezana za somatske simptome, a druga uz tešku depresiju, smatra se da ova verzija nije idealna za normalnu, zdravu populaciju. (138)

**GHQ-12** je izrazito prikladan za istraživanje jer je brz, pouzdan i visoke osjetljivosti. Kako sadrži svega 12 pitanja potrebno je otprilike dvije minute za njegovo ispunjavanje. S obzirom na njegova psihometrijska svojstva usporediv je s dužim verzijama, ali najveću prednost u istraživanjima mu ipak daje brzina ispunjavanja, pa se koristi kod istraživanja gdje nije praktično primijeniti dužu verziju. I kod ove verzije u analizi se koristi ukupan zbroj.

### **1.7.1. Načini bodovanja GHQ-30 upitnika**

GHQ-30 upitnik sadrži 30 pitanja od kojih je 15 formulirano na pozitivnoj skali i nude se četiri odgovora za opis trenutnog stanja: a) bolje nego inače, b) jednako kao i inače,

c) gore nego inače i d) mnogo gore nego inače, a preostalih 15 pitanja formulirano je na negativnoj skali i ponuđeni su odgovori: a) uopće ne, b) ne više nego inače, c) nešto više nego inače i d) znatno više nego inače. Kako je točno sročeni odgovor ovisiti će o pojedinom pitanju. Postoji nekoliko načina za bodovanje ovog upitnika. Način bodovanja odgovora (a-b-c-d) za četiri popularne metode sažeto je prikazan u tablici (**Tablica 2**).

GHQ i C-GHQ bodovanje koriste se kako bi se identificirali „slučajevi“ narušenog psihičkog zdravlja, dok se bodovanje po Likertu i modificirano bodovanje po Likertu koriste se kako bi se dobila veća varijabilnost i širi raspon vrijednosti u populaciji, s idejom da konačna distribucija rezultata bude što pogodnija za statističku analizu. (139, 140)

**Tablica 2. Četiri načina bodovanja GHQ-30 upitnika.**

<b>METODA BODOVANJA</b>	<b>odgovor A</b>	<b>odgovor B</b>	<b>odgovor C</b>	<b>odgovor D</b>
<b>bodovanje po Likertu</b>	0	1	2	3
<b>modificirano bodovanje po Likertu</b>	0	0	1	2
<b>GHQ bodovanje</b>	0	0	1	1
<b>C-GHQ bodovanje*</b>	0/0	0/1	1/1	1/1

\* kombinacija 0-0-1-1 i 0-1-1-1, ovisno je li slaganje s pitanjem ukazuje na zdravlje ili bolest

GHQ bodovanje podrazumijeva da ćemo odgovore a i b bodovati s 0, a odgovore c i d s brojem 1. Za Likertovo i modificirano Likertovo bodovanje (0-1-2-3 i 0-0-1-2) vidljivo je da veći rezultat upućuje na teže stanje, što je i slučaj kod GHQ bodovanja, međutim distribucija bodova dobivenih po Likertovoj metodi biti će znatno šira. Zbog pogodnosti za regresijsku analizu u kojoj će se koristiti rezultat GHQ-30 upitnika, u našem je uzorku primijenjeno bodovanje po Likertu zbog šireg raspon rezultata i povoljnije distribucije za daljnju statističku obradu.

C-GHQ metodu bodovanja predložili su Goodchild i Duncan-Jones, i na ovaj način bodovanja dobivamo distribuciju rezultata koja je sličnija normalnoj distribuciji nego kada koristimo GHQ metodu. (141) Za negativno formulirana pitanja ovom metodom odgovor na pitanje a bodujemo 0, a odgovor na preostala 3 pitanja s 1. U slučaju pozitivno formuliranih odgovora koristi se način bodovanja koji se koristi kod tradicionalne metode: 0-0-1-1. C-GHQ bodovanje smatra se relativno specijaliziranom metodom i pokazalo se korisnim za istraživanja kada je važno identificirati slučajeve kod kojih istraživana bolest ili stanje duže traje.

### **1.7.2. GHQ-30 u istraživanjima**

GHQ-30 se dokazao kao vrlo vrijedan instrument u mnogim istraživanjima - u literaturi se može naći više stotina radova u kojima je korišten ovaj upitnik. Na primjer, Urnes i sur. (2006) koristili su GHQ-30 kao „zlatni standard“ kako bi prema njemu evaluirali novi DSIQ upitnik (Digestive Symptoms and Impact Questionnaire) (142). Mosaku i



sur. (2006) koristili su GHQ-30 kako bi istražili povezanost psihosocijalnih faktora i astme u Nigeriji (143). Dale i sur. (2009) su istraživali učinak njege u kući na psihičko zdravlje starijih osoba, a ujedno su i validirali norvešku verziju upitnika (144). Ukpomg i sur. (2006) su pomoću upitnika GHQ-30 utvrđivali emocionalni distres i depresiju kod žena nakon carskoga reza (145). Evans i sur. (2007) istraživali su povezanost lošega vida s depresijom i anksioznosti kod starijih ljudi (146). Ng i sur. (2008) koristili su upitnik kako bi ispitali psihičko zdravlje među studentima u Kini (147).

Iz velike zastupljenosti u istraživanjima i literaturi, vidi se da je GHQ upitnik široko prihvaćen instrument, korišten u vrlo raznorodnim istraživanjima i u različitim populacijama, koje su se razlikovale po dobi, kulturi, socioekonomskom statusu i drugim čimbenicima. U svim slučajevima, GHQ-30 se pokazao kao izuzetno primjenjiv, dobro prihvaćen, osjetljiv i specifičan instrument za procjenu akutno narušenog psihičkog zdravlja.

Evans i sur. (2007) istraživali su povezanost razine kortizola i psihičkog stanja mjenenog upitnikom GHQ-30 (115). Upitnikom se nezavisno procijenilo dobro i loše psihičko stanje, pa je za svakog ispitanika dobiven broj bodova za dobro psihičko stanje (pozitivna skala) i broj bodova za loše psihičko stanje (negativna skala). Tako su ispitanici ukupno dobrog psihičkog stanja oni s rezultatom višim od prosječnog za dobro psihičko stanje (veći broj bodova na pozitivnoj skali), ali i ispitanici s rezultatom nižim od prosječnog za loše psihičko stanje (niži broj bodova na negativnoj skali).

Pokazano je da je razina kortizola ujutro 45 minuta nakon buđenja statistički značajno povezana s psihičkim stanjem mjerenim upitnikom GHQ-30 (115). Ispitanici su podijeljeni u četiri skupine, ovisno o tome jesu li imali visok (+) ili nizak (-) broj bodova na pozitivnoj skali (P) i na negativnoj skali (N); tako su dobivene četiri skupine: P+N-, P+N+, P-N- i P-N+.

Ispitanici s rezultatom višim od prosječnog za dobro psihičko stanje i nižim od prosječnog za loše psihičko stanje (P+N-, skupina najboljeg psihičkog stanja) imali su 27% niže razine kortizola 45 minuta nakon buđenja. Ova grupa ispitanika značajno se razlikovala od ostalih ispitanika (P+N+, P-N+, P-N-), dok su se preostale tri skupine međusobno minimalno razlikovale moguće je da se radi o snažnoj interakciji prisutnih pozitivnih stanja i odsustva negativnih stanja (115).

Istraživanja obično proučavaju učinke lošeg, narušenog psihičkog zdravlja na organizam i somatske bolesti, dakle koncentriraju se na negativnu skalu. Suprotno tome, javno-zdravstvene mjere naglašavaju važnost dobrog psihičkog stanja, odnosno bave se elementima s pozitivne skale. Motivacija za nezavisnu procjenu dolazi iz želje da se ove dvije skale stave u odnos - iako se intuitivno očekuje da su obrnuto i visoko korelirane (148). Koeficijent korelacije pokazao je visoku korelaciju i iznosi -0,59 što je potvrdilo očekivanja i u skladu je s ostalim istraživanjima (115, 148).

Iako je pokazana povezanost broja bodova na pozitivnoj i negativnoj skali, možda je čak i zanimljivije što ta korelacija nije snažnija. Nekoliko je istraživanja potvrdilo umjerenu neovisnost između broja bodova na pozitivnoj i negativnoj skali što upućuje

na moguć nezavisan učinak: (a) pozitivnog osjećanja i (b) negativnog osjećanja na psihičko zdravlje i tjelesno funkcioniranje (115, 148-150). GHQ-30 upitnik omogućuje nezavisno mjerenje pozitivnih i negativnih psiholoških stanja, što su u studiji koja je uključila više od 6.000 ispitanika pokazali Huppert i Whittington (2003), kreiranjem pozitivne i negativne skale, a koristeći pozitivne i negativne elemente iz GHQ-30 upitnika (148). Zanimljivo, sedmogodišnji je mortalitet snažnije povezan s niskim rezultatom na pozitivnoj skali nego s visokim rezultatom na negativnoj skali (132). Slično, različiti učinak pozitivnih i negativnih stanja na lučenje kortizola pokazali su Ryff i sur. (2006), Lai i sur. (2005) i Seeman i McEwen (1996) (127, 151, 152).

### **1.8. Povezanost genetskih čimbenika i koncentracije kortizola**

1993. godine provedene su prve studije koje su proučavale genetske učinke na koncentraciju kortizola, a provedene su na skupinama jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca, te je već tada sugerirana povezanost između koncentracije kortizola i nekih genetičkih čimbenika (153). Kasnije studije su pokazale heritabilnost koncentracije kortizola od 0,33 do 0,97 (154). Izračunata vrijednost se razlikovala ovisno o okolnostima mjerenja kortizola, poglavito ovisno o tome kakvom su stresu – kvalitativno i kvantitativno - bile izložene osobe prije mjerenja kortizola, te u koje doba dana je proveden pokus i mjeren kortizol (154-156). Koncentracija kortizola ne predstavlja samo jedan fenotip, već se, ovisno o situaciji kada se uzima uzorak, može govoriti o: bazičnim razinama, kortizolskom odgovoru na stres, ukupnoj sekreciji tokom dana, ritmu lučenja i slično. Novija istraživanja govore o heritabilnosti različitih

fenotipova povezanih s koncentracijom kortizola od oko 0,20 do 0,60 (157). Iako blizanci osim genetičkih čimbenika dijele i mnogo zajedničkih okolišnih čimbenika, što može dovesti do precijenjene heritabilnosti, ovako visoka heritabilnost ipak upućuje na važnost genetičkih čimbenika u oblikovanju fenotipa definiranih koncentracijom kortizola.

Nedavno su otkriveni polimorfizmi receptora za kortizol, te u drugim funkcionalno povezanim genima (npr. mineralokortikoidni receptor). Polimorfizmi u ovim genima uzrokuju poremećaj reaktivnosti osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, te dovode do odstupanja od optimalnih razina kortizola u organizmu (158, 159). Keavney i sur. (2005) proučavali su polimorfizme u genu CYP11B1/B2 za enzim 11-beta-hidroksilazu, koji je uključen u sintezu kortizola (160). Alexander i sur. (2010) proučavali su polimorfizme u genu za BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor) i pronašli su da polimorfizam Val66Met modulira reaktivnost na stres (161). Armbruster i sur. (2009) proučavali su kako polimorfizmi u dopaminskom receptoru i serotoninском transporteru modificiraju kortizolski odgovor na stres, te su pokazali da polimorfizmi nezavisno utječu na odgovor (162). Nakamura i sur. (2009) proučavali su polimorfizme u genu ABCB1, koji kodira transporter kortizola i aldosterona. Pokazano je da ovi polimorfizmi utječu na razinu kortizola u plazmi (163).

U skladu s paradigmom koja kaže da je većina bolesti i kvantitativnih svojstava poligenске etiologije, vrlo je vjerojatno da navedeni polimorfizmi i drugi još neotkriveni polimorfizmi u genomu oblikuju individualni kortizolski odgovor na stres, te posljedično moduliraju i determiniraju nastanak somatskih bolesti (159). Istraživanja

genetičkih čimbenika u podlozi bazalne koncentracije kortizola, u podlozi kortizolskog odgovora na stres i ostalih fenotipova povezanih s kortizolom su malobrojna; provedena su većinom na malim uzorcima i nedovoljne su statističke snage. Uloga genetike u modificiranju razine kortizola još uvijek je slabo istražena.

Cjelogenomskim asocijacijskim studijama na velikom uzorku ispitanika otkriveni su do danas brojni polimorfizmi u podlozi različitih bolesti (npr. šećerne bolesti tipa II ili karcinoma dojke) i kvantitativnih obilježja (npr. tjelesne visine i koncentracije mokraćne kiseline), pa čak i ponašanja pojedinca (npr. sklonost pušenju) (96, 98-101, 164-166). Vrijednost ovih otkrića neosporiva je u razumijevanju fizioloških i patofizioloških mehanizama, a očekuje se i primjena u svrhu rane dijagnostike, prevencije razvoja bolesti i kreiranja individualizirane terapije.

Prema dostupnim informacijama, još uvijek nije napravljena cjelogenomska asocijacijska studija koncentracije kortizola, koja bi istražila povezanost nekoliko stotina tisuća (ili čak 2-3 milijuna) SNP biljega i koncentracije kortizola u krvi, a da je provedena na dovoljno velikom uzorku. Većina istraživanja koja su provedena do sada bavila su se polimorfizmima kandidatnih gena, a samo je jedna studija napravila analizu cijelog genoma, no koristeći vrlo mali broj biljega: Kurina i sur. (2005) koristili su 900 mikrosatelitnih biljega i 400 SNP biljega za analizu asocijacije i pronašli su regije na kromosomima 11 i 14 koje pokazuju statistički značajnu povezanost s jutarnjim vrijednostima kortizola (167). Međutim, iskustveno se pokazalo da su rezultati dobiveni ovakvim dizajnom istraživanja, kada je uzorak mali, vrlo često lažno pozitivni i

potrebno je pričekati replikaciju rezultata u drugoj populaciji kako bi se potvrdila vjerodostojnost nalaza (96, 97, 168).

Jedna od otežavajućih okolnosti u istraživanju kortizola su velike razlike u koncentraciji među različitim ispitanicima. Jednako tako, velike varijacije u koncentraciji redovito su zabilježene i kod iste osobe, vjerojatno zbog toga što je lučenje kortizola pod utjecajem mnogih čimbenika: cirkadijanog ritma, spola, dobi, životnih navika poput pušenja i konzumiranja alkohola i kave, prehrane, lijekova, osobina ličnosti, genetskih faktora, izloženosti kroničnom i akutnom stresu, vrsti stresa i drugo (169). Sve je navedeno razlog zašto je fenotip „koncentracija kortizola“ teško definirati, dok je s druge strane gotovo nemoguće uzeti u obzir sve čimbenike koji bi mogli utjecati na njegovu koncentraciju. Prepoznavanje čimbenika koji utječu na razinu kortizola, bilježenje prilikom provedbe pokusa i njihovo uključivanje u analize, omogućiti će u budućnosti preciznije razumijevanje fizioloških i patofizioloških procesa. Istraživači smatraju da se razlika u pobolu između muškaraca i žena (na primjer, muškarci češće boluju od kardiovaskularnih, a žene od autoimunih bolesti) djelomično može objasniti upravo razlikom u tjelesnom odgovoru uslijed stresa (170). Razumijevanje ove povezanosti doprinijelo bi razumijevanju patološkog mehanizma koji dovodi do bolesti.

### **1.9. Dosadašnja istraživanja hrvatskih otoka**

Za ovo je istraživanje odabrana populacija otoka Visa. Zemljopisni položaj, karakteriziran velikom udaljenošću od kopna i način života doprinijeli su izolaciji stanovnika otoka Visa kroz povijest (171). Za izolirane populacije vrijedi da započinju

od ograničenog broja „osnivača“, a kroz svoju povijest obično bilježe periode bolesti, gladi i ratova koji dovode do smanjenja populacije koji se izmjenjuju s periodima rasta populacije. Ove sile oblikuju genetičko naslijeđe izoliranih populacija, te one imaju svoje specifičnosti koje oslikavaju i primjeri rijetkih recesivnih bolesti. (77)

Na otoku Visu postoje dva glavna naselja: grad Vis i Komiža. Povijest populacije otoka Visa dobro je dokumentirana u povijesnim zapisima i crkvenim knjigama, što je omogućilo izradu detaljnog rodoslovlja tamošnjeg stanovništva. Ovaj je genetski izolat do sada opširno opisan u literaturi, uključujući povijest populacije, migracije na otok, rodoslovlje, te niz bolesti i kvantitativnih svojstava (75, 172-178).

Iz crkvenih knjiga vidljiv je skoro potpuni izostanak imigracije, što se očituje visokim stupanjem srođenosti koji su kasnije potvrdile genetičke studije. (23, 75, 173, 179) Da ovako visok stupanj srođenosti utječe na povećanu učestalost određenih bolesti, pokazalo je istraživanje za nekolicinu mendelskih nasljednih bolesti na Jadranskim otocima (77) . Kao posljedica izoliranosti i ograničenog broja spolnih partnera napravljena je analiza pomoću STR biljega, te je utvrđena povećana srođenost i smanjena heterozigotnost u ovoj populaciji, u usporedbi s općom hrvatskom populacijom. (19, 180)

Srođenost (ili endogamija) se može definirati kao postotak djedova i baka rođenih u istom selu kao i ispitanik, a ukoliko primijenimo taj kriterij na istraživanu populaciju, onda srođenost u Komiži doseže čak 91%, a u Visu 85% (171). Populacija ovakve strukture pogodna je za predviđeno istraživanje, jer postoji cijeli spektar srođenosti: od

izrazito srođenih pojedinaca, do potpuno ne srođenih (to su većinom osobe koje su nedavno imigrirale na otok). Suprotno tome, ako bi se uzeo jednako veliki uzorak iz opće populacije, vjerojatno bi udio srođenih osoba bio minimalan. Uzorak gdje imamo oba ekstrema srođenosti (odnosno, izrazito srođene i izrazito nesrođene pojedince), kao i cijeli spektar između njih omogućuje, najveću snagu za istraživanje učinka srođenosti i usporedbi karakteristika ovisnih o srođenosti (23). S druge strane, opće populacije velikih gradova ne bi bile dobre za predviđeno istraživanje upravo zbog odsustva srođenosti, te ne bi bilo moguće proučavati učinak srođenosti na različita svojstva i bolesti, jednostavno zato što su čak i među ekstremima razlike minimalne pa usporedba ne bi bilo moguća. Ovu pretpostavku je na populaciji hrvatskih otoka potvrdio Rudan i sur. (2008) kada je uspoređujući skupine ispitanika koje su se razlikovale po porijeklu pokazao da (a) skupina koja odgovara općoj populaciji ima najveću heterozigotnost, a (b) skupina osoba s najvećim brojem djedova i baka iz istog sela najmanju. (19, 23)

Dodatna prednost ove populacije u istraživanjima je to što ispitanici žive u vrlo sličnom okolišu i imaju općenito slične životne navike (75, 173), pa su zbog toga učinci neprepoznatih čimbenika koji bi mogli utjecati na rezultate istraživanja smanjeni.





**Slika 5. Otok Vis, Hrvatska.** (© 2009 Google, Map Data © 2009 Tele Atlas)

Na kraju, treba spomenuti niz cjelogenomskih studija asocijacije. Ova istraživanja dominiraju poljem humane genetike posljednjih pet godina, odnosno od kada je genotipiziranje velikog broj SNP biljega putem čipova postalo financijski prihvatljivo za velike kohorte od tisuću i više ispitanika. Zbog slabog pojedinačnog učinka SNP biljega (omjer šansi je uobičajeno samo 1.1-1.3) za detekciju povezanosti SNP biljega s fenotipom potreban je velik uzorak ispitanika koji se postiže meta-analizom rezultata iz brojnih manjih kohorti. Ovakvim pristupom i identifikacijom ključnih gena napravljeni su u zadnjih nekoliko godina revolucionarni proboji u razumijevanju fiziologije i patofiziologije bolesti u ljudi, a kohorta s otoka Visa prikazana u ovom radu pridonijela je mnogima od njih. Primjeri bolesti i obilježja čija je etiologija značajno pojašnjena cjelogenomskom analizom (koristeći SNP biljege) su: indeks tjelesne mase, omjer bokova i struka, šećerna bolest tip 2, pušenje, krvni tlak, bubrežna funkcija i bubrežne bolesti, koncentracija glukoze i rizik za razvoj šećerne bolesti tip 2, plućna funkcija,

lipidi i rizik za razvoj koronarne bolesti, koncentracija urične kiseline i giht, visina, lipidi u krvi, kolesterol, sfingolipidi, opseg struka i drugo. (100, 181-190)

Studije su pokazale kako je populacija otoka Visa genetički slična drugim europskim populacijama pa se zaključuje da će se otkrivene asocijacije između genetičkih čimbenika i fenotipa koje se otkriju na populaciji Visa vjerojatno moći generalizirati na druge europske populacije, i obrnuto, unatoč tome što se radi o genetičkom izolatu.

(171)

## **2. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA**

Prva pretpostavka ovog istraživanja temelji se na dosadašnjim studijama koje upućuju da akutno narušeno psihičko zdravlje ima izravne i mjerljive učinke na organizam, koji se manifestiraju i promjenama u lučenju i koncentraciji kortizola.

Druga pretpostavka kaže da je evolucijska prednost heterozigota posebno izražena u nepovoljnim i stresnim situacijama (23, 73), te proizlazi da će u situacijama kada organizam nije izložen stresu (npr. ne ugrožavaju ga mikroorganizmi, vanjski uvjeti temperature i slično su povoljni, ne postoji nestašica hrane itd.) razlika između homozigota i heterozigota biti manje izražena, nego kada je organizam izazvan uslijed nepovoljnih okolišnih uvjeta – tako da je prednost heterozigota najizraženija upravo u stresnim situacijama. U prikazanom specifičnom slučaju akutno narušeno psihičko zdravlje predstavljalo bi nepovoljne uvjete okoliša pri kojima povoljni utjecaj multilokusne heterozigotnosti jače dolazi do izražaja.

Glavni je cilj istraživanja ispitati da li standardizirana multilokusna genetska heterozigotnost (sMLH) osobe utječe na promjenu jutarnje koncentracije kortizola u krvi, posebno kada je psihičko zdravlje osobe akutno narušeno.

Dodatni cilj rada je napraviti cjelogenomsku asocijacijsku studiju jutarnjih vrijednosti kortizola koja će istražiti povezanost pojedinih SNP biljega s jutarnjom koncentracijom kortizola. Slijedi detaljan prikaz svih ciljeva istraživanja:

i) Ispitati utječu li spol, dob i indeks tjelesne mase na koncentraciju kortizola, te utvrditi imaju li osobe narušenog psihičkog zdravlja višu koncentraciju jutarnjeg kortizola od ostale populacije.

ii) Utvrditi je li rezultat GHQ-30 upitnika povezan sa spolom, dobi, obrazovanjem, bračnim ili socio-ekonomskim statusom.

iii) Utvrditi smjer i jačinu povezanosti sMLH i jutarnjih vrijednosti kortizola kod ispitanika uz standardizaciju na dob, spol, godine školovanja i rezultate GHQ-30 upitnika.

iv) Učiniti će se cjelogenomska asocijacijska studija jutarnjih vrijednosti kortizola, pri čemu će istražiti povezanosti pojedinih SNP biljega s koncentracijom kortizola, standardiziranom na dob i spol i akutno narušeno psihičko zdravlje.

Hipoteza ovog istraživanja je da će, među osobama s akutno narušenim psihičkim zdravljem, oni s manjom standardiziranom multilokusnom heterozigotnošću pokazati veću promjenu (porast) koncentracije jutarnjih vrijednosti kortizola, u usporedbi s osobama povećane multilokusne heterozigotnosti.

Svrha istraživanja je produbiti razumijevanje čimbenika u regulaciji koncentracije kortizola zbog toga što poremećaj u sekreciji ovog hormona može posredno dovesti do povećanog rizika za razvoj bolesti, a zbog neposrednog i jakog djelovanja kortizola na imunološki sustav.

### **3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA**

### 3.1. Ispitanici i terensko istraživanje

Terensko istraživanje je provedeno 2002. i 2003. godine u sklopu dvaju znanstveno-istraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske: “Genetske, socijalne i bihevioralne značajke zdravlja i bolesti” i “Antropološka istraživanja populacijske strukture Hrvatske – biomedicinski i antropogenetički pristup“. Proveli su ga zaposlenici Škole narodnog zdravlja „Andrija Štampar“ (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) i Antropološkog instituta u Zagrebu. U istraživanju je sudjelovalo 924 ispitanika s otoka Visa; 576 iz Komiže i 349 iz grada Visa. Oba navedena projekta i ovaj doktorski rad dobili su odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Ispitanici su potpisali obaviješteni pristanak na istraživanje. Svakom ispitaniku izmjereni su krvni tlak, tjelesna visina i težina, te je uzet uzorak krvi za biokemijske i genetske analize. Krvni tlak je mjeran dva puta, a visina i težina izmjereni su u lokalnoj ambulanti nakon vađenja krvi na standardan način. Krv je vađena između 8:30 i 9:30 ujutro, natašte i pohranjena je u dvije epruvete: 6 ml za biokemijske pretrage koje su obavljene u biokemijskom laboratoriju „Labor Centar“ u Zagrebu, i 7ml u EDTA epruveti za ekstrakciju DNK, koja je učinjena u Laboratoriju za antropogenetiku Instituta za antropologiju u Zagrebu, i genotipizaciju SNP i STR biljezima (Prilog 1). Laboratorij „Labor Centar“ provodi strogu unutarnju kontrolu, a vanjska kontrola kvalitete je provedena od strane Referentnog centra za biokemijska mjerenja RH i neovisne internacionalne agencije RIQAS (engl. Randox International Quality Assessment Sample).

Svi ispitanici su ispunili upitnik posebno pripremljen u skladu s ciljevima projekta i njime su prikupljeni podaci o slijedećim varijablama: dob, mjesto rođenja, spol, bračni status (broj dosadašnjih brakova i dob pri sklapanju prvog braka), zanimanje, školovanje, socio-ekonomski status; način života i navike (prehrana, pušenje i konzumacija alkohola); podaci o bolestima i zdravstvenim poremećajima, kao i o konzumaciji lijekova te Upitnik o općem zdravstvenom stanju GHQ-30 (Prilog 2).

## **3.2. Analizirane varijable**

### **3.2.1. Opći podaci**

Prikupljeni su podaci o zanimanju ispitanika i radnom statusu, a podatak o duljini školovanja ispitanika određen je temeljem odgovora na pitanje o broju završenih razreda škole (Prilog 2). Za procjenu socioekonomskog statusa ispitanika korištena su dva pitanja iz upitnika:

1. Ispitanici su odgovorili na pitanje: „Kako biste procijenili svoje materijalno stanje, odnosno materijalno stanje Vaše obitelji?“ svrstavši se u jednu od slijedećih kategorija: (1) Mnogo je lošije od drugih (prosjeaka); (2) Nešto je lošije od drugih; (3) Isto je kao kod drugih; (4) Nešto je bolje od drugih; ili (5) Mnogo je bolje od drugih;
2. Drugo pitanje je glasilo: „Da li u stanu ili kući gdje živite imate: vodovod, dva TV uređaja, WC s ispiranjem, stroj za pranje suđa, kupaonicu, kompjuter, centralno ili plinsko grijanje, biblioteku (više od 100 knjiga), drvene podove,



umjetničke slike/predmete, telefon, automobil, videorekorder, škrinju za zamrzavanje, vikendicu/drugi stan, brod. Označite sve što imate.“. Svaki pozitivan odgovor donosio je jedan bod, a maksimalan ukupni broj bodova za ovo pitanje iznosio je 16.

U prvom slučaju socio-ekonomski status je prikazan kao kategorijska varijabla s pet kategorija koje su direktno preuzete iz odgovora na pitanje. U drugom slučaju je socio-ekonomski status prikazan kao numerička varijabla dobivena brojanjem odgovora na koje je ispitanik potvrdno odgovorio (minimum: 0 i maksimum: 16).

### **3.2.2. Kortizol**

Kortizol je mjeran radioimunološkom metodom (RIA) koja se temelji na vezivanju protutijela za antigen (kortizol). Najmanja koncentracija kortizola koja se može izmjeriti ovom metodom je 4,69 nmol/L. Granične vrijednosti kortizola u plazmi, urinu ili slini ovise o metodi kojom se mjeri koncentracija, te se ispravne referentne vrijednosti razlikuju između metoda i laboratorija (191). Udžbenik interne medicine navodi raspon referentnih vrijednosti od 140-690 nmol/L (192). Mi smo se odlučili za strožu diskriminaciju ispitanika s povišenim vrijednostima u ovom istraživanju. Za klasifikaciju u normalne, povišene i snižene vrijednosti kortizola, korištene su granične vrijednosti koncentracije kortizola 140 nmol/L i 800 nmol/L. Prikupljeni podaci uneseni su u elektroničku bazu podataka, pri čemu je za svakog ispitanika korišten jedinstven identifikacijski broj.

### **3.2.3. Upitnik o općem zdravstvenom stanju: GHQ-30**

U našem istraživanju korišten je GHQ-30 (Prilog 2), a za ispunjavanje je potrebno 3-4 minute. Rezultat GHQ-30 izražava se kao ukupan broj bodova što omogućuje jednostavno postavljanje granice između zdravih osoba i onih narušenog psihičkog zdravlja. Najprikladnija granica za utvrđivanje je li osoba narušenog psihičkog zdravlja ili ne, ovisiti će o danoj populaciji i o željenim parametrima, poput specifičnosti, osjetljivosti, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti.

Kada se upitnik koristi u općoj populaciji kao što je slučaj u ovom radu, vrijednosti iznad 31 bod prema Likertovom bodovanju smatraju se pokazateljima narušenog psihičkog zdravlja, uz osjetljivost od 0,83 i specifičnost od 0,83. Kao osobe teško narušenog psihičkog zdravlja definirali smo one koje imaju preko 50 bodova prema Likertovom bodovanju; odnosno one osobe čiji rezultat odstupa za više od dvije standardne devijacije od prosječne vrijednosti. Srednja vrijednost bila je 28,12, a standardna devijacija 11,19. Prema tome, granica za teško narušeno psihičko zdravlje je:

srednja vrijednost + 2 x standardna devijacija =  $28,12 + (2 \times 11,19) = 50,51$ .

### **3.2.4. Genetički podaci i analize**

#### ***3.2.4.1. Izolacija DNK, genotipiziranje i priprema podataka***

**Izolacija DNK.** DNK je ekstrahirana iz uzoraka pune krvi sakupljenih u EDTA epruvete. Izolacija je napravljena u laboratoriju Antropološkog instituta u Zagrebu, prema metodi Poncza i suradnika (193).

**Genotipiziranje SNP biljega.** Uzorci su genotipizirani koristeći Sentrix HumanHap300 Genotyping BeadChip (Illumina, San Diego, SAD), i odgovarajuću računalnu aplikaciju BeadStudio (Illumina, San Diego, SAD). Komercijalno je dostupno nekoliko panela SNP biljega koji se razlikuju prema broju i odabiru biljega. Izbor komercijalno dostupnog panela ovisiti će o raspoloživim financijskim mogućnostima i o populaciji koju se istražuje. Kako su naši ispitanici europskog porijekla, odabran je skup od 317.503 SNP biljega koji su se pokazali kao najinformativniji za europsku populaciju, što praktično znači da su odabrani biljezi za koje se očekuje da je udio rjeđeg alela veći od 1-5% (MAF, prema engl. minor allele frequency) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

**Genotipiziranje STR biljega.** Analiza mikrosatelitnih markera (STR) napravljena je u Velikoj Britaniji u laboratoriju zavoda za humanu genetiku (Human Genetics Unit, Medical Research Council, Edinburgh). Korišten je uređaj ABI3700 DNK sequencer uz odgovarajuću kompjutorsku aplikaciju Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Genotipizirano je ukupno 810 STR biljega, od čega je većina bila iz panela deCode (deCODE Genetics, Reykjavik, Island).

**Odabir biljega za analizu.** U analizi su korišteni samo STR i SNP biljezi na autosomima, tj. iz analize su isključeni biljezi na X i Y kromosomima. Kada se govori o heterozigotnosti, svi muški ispitanici su zapravo homozigoti za sve biljege na X kromosomu zbog toga što imaju samo jednu kopiju alela. Uključivanje ovih biljega u analizu heterozigotnosti dovelo bi stoga do relativnog smanjenja heterozigotnosti muških ispitanika u odnosu na ženske.

Za sve dobivene genetičke podatke provedena je kontrole kvalitete na slijedeći način:

i) Iz daljnjih analiza isključeni su SNP biljezi s manje od 90% uspješnog odaziva pri genotipiziranju: ako je genotipiziranje određenog lokusa (tj. SNP biljega) bilo neuspješno u više od 10% ispitanika, taj je SNP isključen iz analize. Jednako tako, iz analize su uklonjeni i svi STR biljezi koji su bili neuspješno genotipizirani u više od 10% ispitanika. Uz navedeno, iz analize je isključen STR biljeg ako su svi ispitanici bili homozigoti za isti.

ii) Iz daljnje analize isključeni su lokusi kod kojih opažene učestalosti statistički značajno odstupaju od očekivanih temeljem Hardy-Weinbergove ravnoteže. Korišten je  $\chi^2$  test, pri čemu je opaženi broj pojedinog genotipa dobiven analizom SNP biljega, a očekivani broj pojedinog genotipa za dani lokus u populaciji izračunat je iz frekvencija dvaju alela na tom lokusu. Ovdje se smatralo da je Hardy-Weinbergova ravnoteža narušena ako je  $p$ -vrijednost manja od 0,001.

Identifikacija SNP biljega koji ne zadovoljavaju postavljene kriterije kvalitete napravljena je pomoću funkcije implementirane u R aplikaciju GenABEL (detaljniji opis vidi: 3.3. Priprema podataka, strana 68):

```
check.marker (data, callrate = 0.90, p.level=0.001),
```

pri čemu se argument funkcije *callrate* odnosi na postavljeni kriterij uspješnog genotipiziranja, a argument *p.level* na postavljeni kriterij odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Isključeno je 8.507 SNP biljega zbog neuspješnog genotipiziranja i točno 1.000 SNP biljega zbog ekstremnog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, te je na kraju preostalo ukupno 307.996 SNP biljega za analizu. Jednako tako, iz analize su isključeni STR biljezi koji su odstupali od Hardy-Weinbergove ravnoteže, pa je na kraju preostalo 746 STR biljega za analizu.

#### **3.2.4.2. *Određivanje standardizirane multilokusne heterozigotnosti***

Analiza heterozigotnosti je napravljena je korištenjem STR biljega. U ovom istraživanju korištene su dvije mjere heterozigotnosti. Prva je jednostavno udio heterozigotnih biljega kod ispitanika. Kod druge se mjere ta vrijednost standardizira prema podacima o prosječnoj heterozigotnosti preostalih ispitanika na istom skupu biljega, kako bi se dobila relativna, standardizirana, heterozigotnost za ispitanike iz naše populacije.

Udio heterozigotnih biljega za svakog ispitanika jednostavno je izračunat kao broj heterozigotnih biljega ispitanika podijeljen s ukupnim brojem biljega koji su uspješno genotipizirani kod tog ispitanika:

$$MLH_i = \text{biljeg}_{\text{het } (i)} / \text{biljeg}_{\text{ukupno } (i)}$$

pri čemu je  $MLH_i$  udio heterozigotnih biljega kod ispitanika  $i$ ,  $\text{biljeg}_{\text{het } (i)}$  je broj heterozigotnih biljega, a  $\text{biljeg}_{\text{ukupno } (i)}$  ukupni broj uspješno genotipiziranih biljega ispitanika  $i$ .

Zatim, za svakog je ispitanika izračunata standardizirana multilokusna heterozigotnost prema metodi koju su razvili Coltman i suradnici (21):

$$sMLH_i = MLH_i / MLH_{\text{prosjeck},i}$$

pri čemu je  $sMLH_i$  standardizirana multilokusna heterozigotnost ispitanika  $i$ ,  $MLH_i$  je udio heterozigotnih SNP biljega kod ispitanika  $i$ , a  $MLH_{\text{prosjeck},i}$  je prosječna heterozigotnost svih ispitanika, ali samo za SNP biljege koji su uspješno genotipizirani kod ispitanika  $i$ . Ova standardizacija osigurava da je heterozigotnost svih ispitanika prikazana na istoj skali čime su ispitanici stavljeni u relativni odnos jedni prema drugima.

Izračun je napravljen koristeći program R i pridružene aplikacije. Za izračunavanje  $MLH_i$  (udio heterozigotnih biljega ispitanika) korištena je funkcija *perid.summary()* implementirana u pridruženoj aplikaciji „GenABEL“. Ova funkcija prebroji broj heterozigotnih biljega za svakog ispitanika. S druge strane,  $sMLH$  je izračunata

koristeći funkciju *sh()* koja je implementirana u R aplikaciji „Rhh“. Ova funkcija pobroji koliko je heterozigotnih biljega kod pojedinog ispitanika, no kako nisu svi biljezi uspješno genotipizirani u svih ispitanika u drugom koraku ova funkcija izračuna prosječnu heterozigotnost svih ostalih ispitanika, ali samo za isti skup biljega kao i kod ispitanika. U zadnjem koraku, broj heterozigotnih biljega bude podijeljen s prosječnim brojem heterozigotnih biljega kod ostalih ispitanika, te slijedi standardizirana multilokusna heterozigotnost pojedinog ispitanika, ili sMLH.

### **3.3. Priprema podataka za analizu**

Za pohranu podataka i deskriptivnu statističku analizu korišten je Microsoft Office Excel. Za statističku analizu, ali također i za pohranu i obradu podataka korišten je javno dostupan program R preuzet s: <http://cran.r-project.org> (194). s iste internetske stranice preuzete su dvije dodatne aplikacije korištene u analizi: GenABEL i Rhh (194-196).

**Transformacija varijabli.** Normalnost distribucije ispitivanih varijabli ispitana je pomoću Shapiro-Wilksova testa za normalnost. Varijable koje nisu bile raspodijeljene prema normalnoj distribuciji transformirane su za potrebe onih statističkih analiza koje zahtijevaju normalnu distribuciju varijable, primjerice u slučaju linearne regresije ili t-testa.

Distribucija rezultata GHQ-30 upitnika nije bila normalna ( $p < 0,001$ ) pa je varijabla log-transformirana kako bi se poboljšala normalnost. Jednako tako, utvrđeno je da

izmjerene vrijednosti kortizola nisu normalno distribuirane ( $p < 0,001$ ). Normalnost je poboljšana kada se napravila korijen-transformacija ove varijable.

Mnogi ispitanici iz našeg uzorka rodbinski su povezani. Ovakav uzorak, gdje su mnoge osobe blisko rodbinski povezane, sa statističkog stajališta predstavlja problem, jer većina statističkih testova podrazumijeva međusobno neovisna opažanja. Ako su ispitanici u rodu, to znači da dijele manji ili veći dio genetičke upute, no vjerojatno imaju i slične životne navike te druge čimbenike okoliša. Zbog toga, mjerenja ne možemo smatrati u potpunosti neovisnima.

Zbog visokog stupnja rodbinske povezanosti među ispitanicima u ovom istraživanju, pojedina obilježja u fenotipu i genotipu nisu neovisna, pa je bilo neophodno napraviti korekciju, tako da se nakon izvršene korekcije dobiju neovisne vrijednosti, koje se dalje mogu statistički obrađivati klasičnim statističkim metodama. Prvi korak je izrada matrice rodbinske povezanosti, „gkin matrice“. Matrica je izrađena pomoću funkcije „ibs“ implementirane u GenABEL aplikaciji:

```
gkin <- ibs (df1[,autosomal(df1)],w="freq")
```

Nakon izrade matrica je pohranjena i prema potrebi korištena u narednim analizama.

Neke varijable (npr. kortizol) su procesirane pomoću funkcije *polygenic()* koja kao argument u obradi uzima matricu srođenosti „gkin“, nakon čega rezidue određene varijable budu oslobođene utjecaja srođenosti, te se vrijednosti za svakog ispitanika



mogu smatrati neovisnim opažanjima, čime postaju prikladna za daljnje statističke analize.

Nakon ove transformacije više nije moguće izravno tumačiti vrijednosti npr. kortizola pojedine osobe, jer vrijednosti više nisu prikazane na originalnoj mjernoj skali i u jedinici nmol/L, već kao rezidue u rasponu od -2 do 4.

Koeficijent korelacije između ovih rezidua i stvarno izmjerenih vrijednosti bio je 0,9939. Radi lakše interpretacije rezultata i minimalne razlike među mjerenjima, u nekim će se analizama koristiti stvarne vrijednosti kortizola (ili korijen-transformirane kad je postojao zahtjev za normalnom distribucijom). U rezultatima će biti navedeno koja mjera kortizola se koristila u analizi. Ostale korištene varijable bile su prikladno transformirane.

**Isključenja ispitanika.** U analizama koje su ispitivale učinke različitih čimbenika na vrijednosti kortizola, isključeni su svi ispitanici koji uzimaju kortikosteroidne lijekove.

### **3.4. Statistička analiza**

Za opis distribucije frekvencija korištene su deskriptivne statističke metode. Prikazani su postoci za kategorijske varijable, srednja vrijednost i standardna devijacija za kontinuirane varijable, ili pak medijan i raspon varijacije, ako distribucija nije bila normalna. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

T-test je korišten kada se ispitalo razlikuju li se dvije grupe u nekom svojstvu, a kada je to svojstvo bilo normalno distribuirano u populaciji. Ako distribucija nije bila normalna, umjesto t-testa korišten je Kolmogorov-Smirnov test. Tako se t-test koristio kako bi se utvrdilo:

- ovisi li broj završenih razreda o spolu,
- postoji li razlika u koncentraciji jutarnjeg kortizola između muškaraca i žena
- ovisi li akutno narušeno psihičko zdravlje o bračnom statusu.

Multipla regresija korištena je kako bi se ispitaao:

- utjecaj dobi na broj završenih razreda
- ovisi li koncentracija jutarnjeg kortizola o dobi ili o BMI
- ovisi li rezultat na GHQ-30 upitniku o dobi.

Kovarijate u regresijskoj analizi su birane temeljem rezultata ranijih istraživanja (113, 115-118), a za svaku analizu je ispitana kolinearnost prediktornih varijabli.

Kada su ispitivane kategorijske varijable korišten je  $\chi^2$ -test. Tako je ispitana statistička značajnost:

- je li proporcija osoba akutno narušenog psihičkog zdravlja po kategorijama jednaka za muškarce i žene

- postoji li razlika u proporciji osoba narušenog zdravlja s obzirom na kategoriju obrazovanja kojoj pripadaju
- imaju li osobe lošijeg socio-ekonomskog statusa češće akutno narušenje psihičkog zdravlja (za socio-ekonomski status procijenjen prema pokazateljima socio-ekonomskog statusa i samo-procjenom).

Multiplom regresijom ispitana je povezanost jutarnjih vrijednosti kortizola s brojem bodova na GHQ-30 upitniku i sa standardiziranom multilokusnom heterozigotnošću. U model su uključene kovarijate za koje su ranija istraživanja utvrdila da su povezane s koncentracijom kortizola (dob i BMI). Kako bi se osigurala normalna distribucija svih varijabli, korištena je korijen-transformirana vrijednost kortizola, a rezultati GHQ-30 upitnika su bili log-transformirani. Varijable dob i BMI bile su normalne distribucije.

Kako bi se odredio relativni učinak pojedinih varijabli na razinu kortizola, izračunat je beta-koeficijent ( $\beta$ ). Zbog razlike u distribuciji i rasponu vrijednosti, beta-koeficijente prediktornih varijabli nije moguće izravno uspoređivati. Na primjer, heterozigotnost ima srednju vrijednost 1 i standardnu devijaciju 0,03, dok su isti parametri za dob 56 i 15,5 pa će jedinična promjena vrijednosti heterozigotnosti mnogo snažnije utjecati na zavisnu varijablu. Zbog toga su sve prediktorne varijable z-transformirane (odnosno transformirane su tako da budu normalno distribuirane i imaju srednju vrijednost 0, a standardnu devijaciju 1), te je tada izračunat  $\beta$ .

Analizom varijance dobivena je suma kvadrata za svaki prediktor, te ostatna suma kvadrata. Postotak varijance zavisne varijable koji je objašnjen odabranim prediktorom

izračunat je prema formuli: suma kvadrata odabranog prediktora/(suma kvadrata svih prediktora + ostatna suma kvadrata).

### 3.5. Genetičke analize

Napravljena je cjelogenomska analiza povezanosti SNP-ova s razinom jutarnjeg kortizola. Mjerenja kortizola su prvo z-transformirana i standardizirana na dob i spol, a potom korigirana zbog rodbinske povezanosti:

```
t_kortizol <- ztransform(kortizol ~ dob + spol, df1)
```

```
polygenic_kort <- polygenic(t_kortizol, gkin, df1)
```

Funkcija *ztransform()* transformira distribuciju koja nije normalna i generira varijablu koja ima srednju vrijednost nula i varijancu jedan. Funkcija se može modificirati tako da ujedno i standardizira vrijednosti varijable za spol i dob, na način da se uzmu rezidue iz regresijske analize i transformiraju prema standardnoj normalnoj distribuciji, tako da se na kraju dobije normalno distribuirana i standardizirana vrijednost kortizola. Nakon ove transformacije više nije moguće direktno interpretirati vrijednosti kortizola pojedine osobe, jer vrijednosti više nisu prikazane na početnoj mjernoj skali i u jedinici nmol/L, već kao vrijednosti na standardnoj normalnoj distribuciji.

Opažene vrijednosti kortizola bilo je potrebno korigirati zbog rodbinske povezanosti ispitanika koji su sudjelovali u ovom istraživanju. Korekcija je napravljena pomoću funkcije *polygenic()* koja je implementirana u aplikaciji GenABEL. Izlazna vrijednost

koju daje funkcija su rezidualne vrijednosti kortizola koje se ponašaju kao neovisna opažanja. Ove rezidualne vrijednosti, korigirane na dob, spol i rodbinsku povezanost korištene su u cjelogenomskoj asocijacijskoj analizi kortizola.

Koristeći korigirane vrijednosti kortizola, napravljen je cjelogenomski test asocijacije.

Korištena je funkcija „formetascore“:

```
gwas_cort <- formetascore(polygenic_kort, df1, stat=mm score, transform =  
"no")
```

**Određivanje statističke značajnosti u cjelogenomskim analizama.** Zbog velikog broja provedenih testova (za svaki od 307.996 SNP biljega) bilo je potrebno odrediti prikladnu razinu statističke značajnosti. Napravljena je Bonferroni korekcija (197), te je granična  $p$ -vrijednost dobivena prema jednadžbi:  $\alpha/n$ , pri čemu je  $\alpha$  željena razina značajnosti  $\alpha=0,05$  dok je  $n$  broj provedenih testova, u ovom slučaju  $n=307.996$  – jedan test za svaki SNP biljeg. Prema tome, statistički značajne smatrati će se  $p$ -vrijednosti manje od  $0,05/307.996$ , odnosno  $p < 1,62 \times 10^{-7}$ .

Bonferroni korekcija u genomskim analizama često je kritizirana kao suviše stroga (96, 168, 197). Razlog leži u tome što SNP biljezi u genomu nisu posve neovisni. Zbog mehanizama rekombinacije genoma prilikom stvaranja spolnih stanica, biljezi koji su blizu često se nasljeđuju zajedno i među njima postoji neravnoteža vezanja (LD, prema engl. linkage disequilibrium) pa nisu neovisni jedan od drugoga i efektivno smanjuju broj učinjenih statističkih testova (npr. ako je korelacija između dva biljega 1, test asocijacije fenotipa s drugim biljegom je zapravo samo ponovljeni test prvog biljega).

## **4. RESULTATI**

## 4.1. Opis populacije

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 924 ispitanika s otoka Visa, od čega 576 iz Komiže i 349 iz grada Visa. Od ukupnog uzorka, 563 (58%) su činile žene. Ispitanici su prilikom ulaska u studiju bili u dobi od 18 do 93 godine, a srednja vrijednost starosti ispitanika je bila  $56,4 \pm 15,5$  godina.

### 4.1.1. Opći podaci

**Bračni status.** U ispitivanoj populaciji 111 osoba nije bilo u braku, 799 ih je bilo vjenčano, od čega većina u prvom braku (733).

**Školovanje.** Medijan godina školovanja u ovoj populaciji bio je 11, raspon od 2 do 20. Broj ispitanika prema kategorijama obrazovanja prikazan je u **Tablici 3**. Vidljivo je da većina ispitanika ima osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje, a manjina (7,8%) fakultetsko obrazovanje.

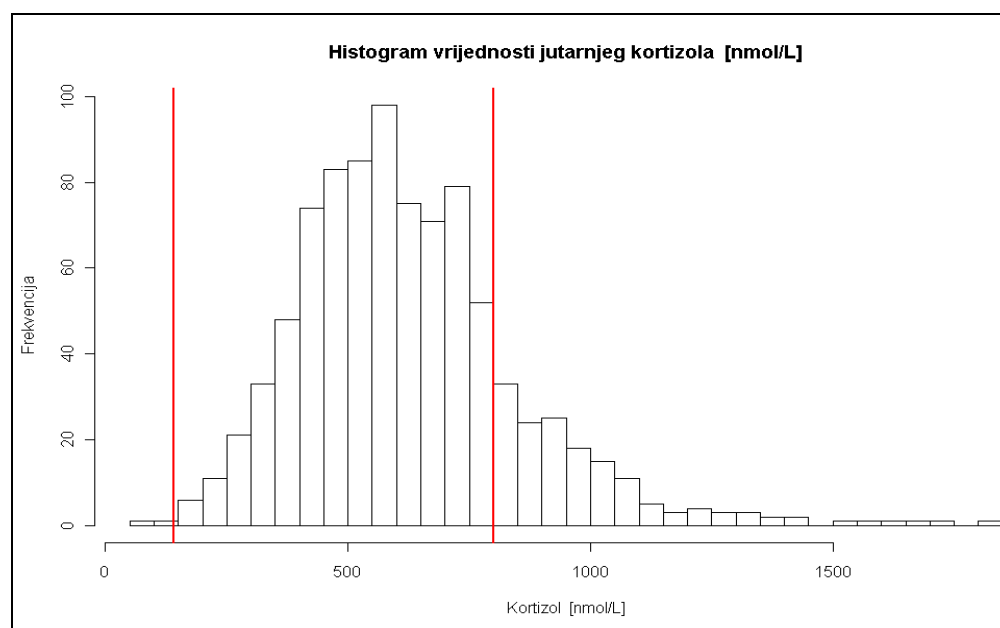
**Tablica 3. Broj ispitanika u pojedinoj kategoriji obrazovanja.**

Kategorije obrazovanja (broj završenih razreda)	broj ispitanika (%)
I (< 8)	216 (23,66%)
II (8 – 11)	303 (33,19%)
III (12 – 15)	323 (35,38%)
IV (> 16)	71 (7,78%)

Broj godina školovanja značajno ovisi o dobi i spolu, pa tako muškarci imaju više godina obrazovanja od žena: prosječno 10,9 godina kod muškaraca i 9,3 godina kod žena,  $p = 3,6 \times 10^{-12}$  (t-test). Također, mlađa dob povezana je s dužim školovanjem,  $p < 10^{-16}$  (ANOVA).

#### 4.1.2. Kortizol

Referentne vrijednosti kortizola za jutarnje uzorke su od 140 do 800 nmol/L. Podaci o vrijednosti kortizola nisu bili dostupni za 32 ispitanika, a 17 ispitanika je isključeno zbog kortikosteroidne terapije, tako da je analiza provedena na ukupno 876 ispitanika.



**Slika 6. Histogram vrijednosti jutarnjeg kortizola. Okomite crvene linije predstavljaju donju (140 nmol/L) i gornju (800 nmol/L) granicu normalnih vrijednosti.**

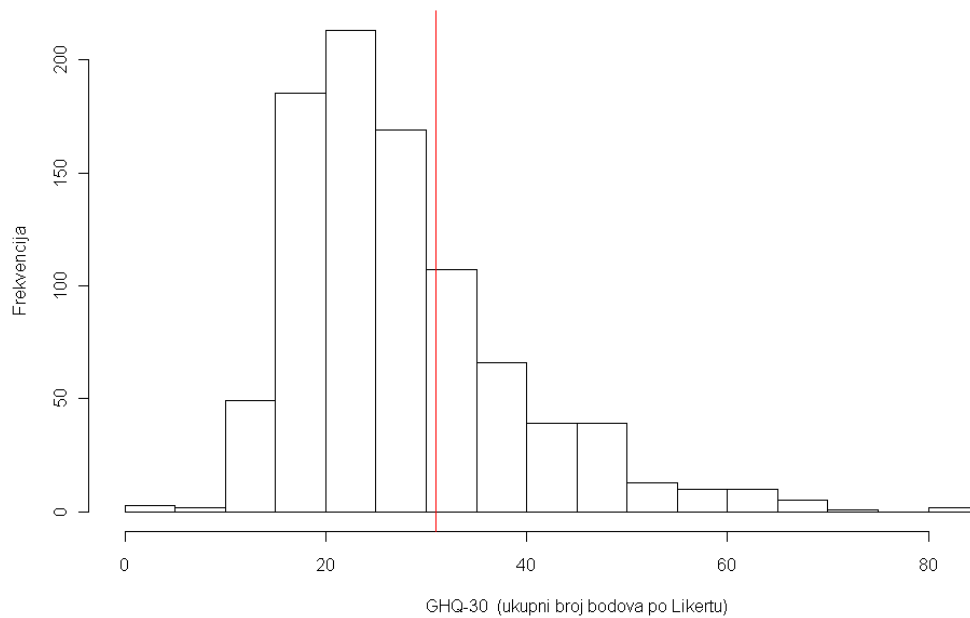


Srednja vrijednost kortizola u uzorku je  $623,26 \pm 230,04$  nmol/L (**Slika 6**). Najmanja izmjerena vrijednost kortizola u uzorku bila je 64,14 nmol/L, a najveća izmjerena vrijednost 1820,68 nmol/L. Ukupno su dva ispitanika imala vrijednost ispod donje granice, a 154 ispitanika je imalo vrijednost iznad gornje granice normalnog raspona za vrijednosti jutarnjeg kortizola.

T-testom je utvrđeno da nema razlike u vrijednostima kortizola između ženskih i muških ispitanika ( $p = 0,92$ ). Povezanost razine kortizola s dobi utvrđena je linearnom regresijom (korištena je korijen-transformirana vrijednost kortizola) te je pokazana invertna povezanost: razina kortizola se smanjuje sa starijom dobi ( $p = 0,003$ ). Zatim, istražena je povezanost indeksa tjelesne mase (BMI) i kortizola, te je modelom linearne regresije pokazano da je veći BMI povezan s nižim razinama kortizola ( $p = 0,0001$ ).

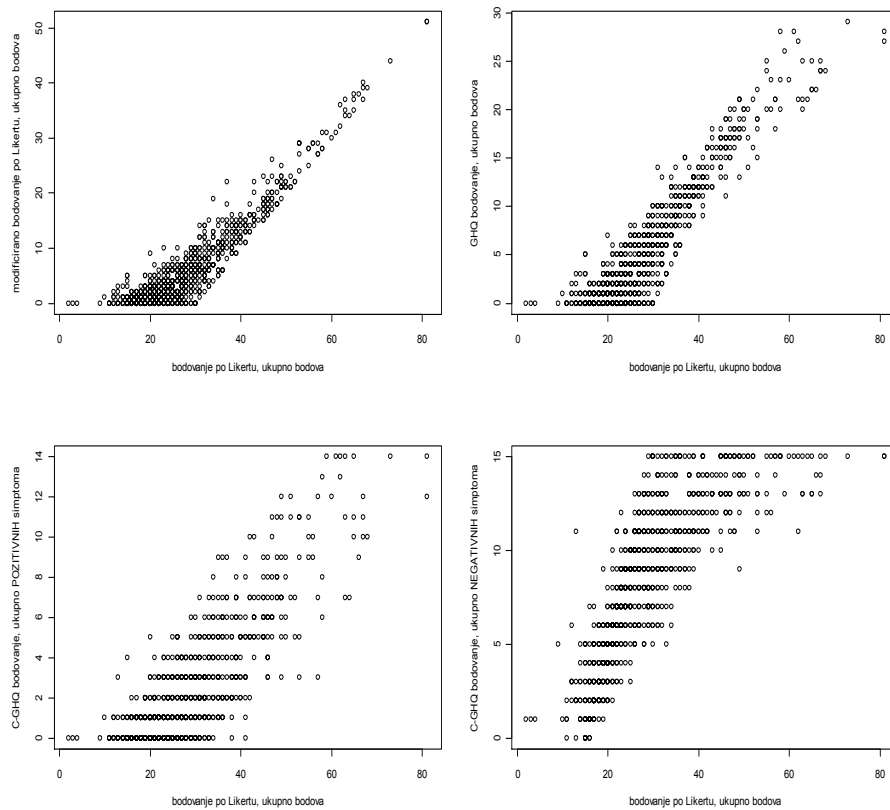
#### **4.1.3. GHQ-30**

GHQ upitnik o općem zdravstvenom stanju ispunilo je 913 ispitanika. Postoji nekoliko načina za bodovanje GHQ-30 upitnika, no u svim slučajevima je krajnji rezultat jedinstveni broj. U ovom istraživanju korišteno je bodovanje po Likertu. Teoretski najmanji mogući broj bodova je nula, a maksimalan 120.



**Slika 7. Histogram rezultata GHQ-30 upitnika (bodovanje po Likertu). Crvena crta označava graničnu vrijednost od 31 bod: vrijednosti iznad crvene crte sugeriraju narušeno psihičko zdravlje.**

U proučavanoj populaciji najmanji rezultat je bio dva, a najveći zabilježeni 81 (Slika 7); srednja vrijednost u našem uzorku je  $28,12 \pm 11,19$ . Zbog toga što je distribucija rezultata lijevo asimetrična, bolja mjera centralne tendencije je medijan, a on je u proučavanoj populaciji 26.



**Slika 8. Korelacija rezultata GHQ-30 upitnika kada se koristi bodovanje prema Likertu s ostalim načinima bodovanja: modificiranim bodovanjem po Likertu, GHQ bodovanjem i C-GHQ bodovanjem.**

Rezultat GHQ-30 upitnika kada se koristi bodovanje prema Likertu u usporedbi s ostalim metodama bodovanja pokazuje, očekivano, visoku korelaciju: 0,93 za modificirano bodovanje po Likertu; 0,93 za GHQ bodovanje te 0,83 i 0,80 za pozitivne i negativne simptome, kada se koristi C-GHQ bodovanje (**Slika 8**).

**Tablica 4. Broj ispitanika (ženskih i muških) u kategoriji zdravih (<31), narušenog (31 – 50) i jako narušenog (>50) psihičkog zdravlja; klasifikacija je napravljena prema rezultatu GHQ-30 upitnika (bodovanje po Likertu).**

	psihičko zdravlje			ukupno
	zdravi	narušeno	izrazito narušeno	
<b>žene</b>	333 (62,95%)	165 (31,19%)	31 (5,86%)	529 (100,00%)
<b>muškarci</b>	314 (81,77%)	60 (15,63%)	10 (2,60%)	384 (100,00%)

Od 913 ispitanika za koje je GHQ-30 rezultat bio dostupan, 266 (29,13%) ih je bilo narušenog psihičkog zdravlja (više od 31 bod prema Likertu), a 41 osoba je bila teško narušenog psihičkog zdravlja. Kada je analiza napravljena po spolu, uvidjela se velika razlika između muškaraca i žena: dok je 18,23% muškaraca bilo narušenog psihičkog zdravlja, udio je kod žena bio mnogo veći, čak 37,05% (**Tablica 4**). Statistička značajnost razlike utvrđena je  $\chi^2$ -testom,  $p = 4,9 \times 10^{-9}$ .

**Tablica 5. Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja u ovisnosti o kategoriji obrazovanja (I – najniži stupanj obrazovanja). Kao zdravi su definirani oni koji imaju <31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.**

Obrazovanje (kategorija)	zdravi	narušenog psihičkog zdravlja
I	115 (53,99%)	98 (46,01%)
II	222 (73,51%)	80 (26,49%)
III	252 (78,02%)	71 (21,98%)
IV	58 (82,86%)	12 (17,14%)

Rezultat GHQ-30 upitnika statistički je značajno povezan s dobi,  $p=4,1 \times 10^{-8}$ . Starija dob povezana je s većim brojem bodova, pa i s narušenim psihičkim zdravljem,  $\beta=0,13$ , odnosno, svaka godina starosti pridoda 0,13 na GHQ-30 rezultat.

**Tablica 6. Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja ovisno o socio-ekonomskom statusu (podatak prikupljen samo-evaluacijom). Kao zdravi su definirani oni koji imaju <31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.**

Socio-ekonomski status (u usporedbi s drugima)	zdravi	narušenog psihičkog zdravlja
puno gore	8 (26,67%)	22 (73,33%)
gore	76 (54,68%)	63 (45,32%)
jednako	379 (70,19%)	161 (29,81%)
bolje	141 (77,90%)	40 (22,10%)
puno bolje	15 (75,00%)	5 (25,00%)

Stupanj obrazovanja značajno je povezan s brojem bodova na GHQ-30 upitniku: čak 46% ispitanika u najnižoj kategoriji obrazovanja bilo je narušenog psihičkog zdravlja, dok je taj broj bio samo 17% u kategoriji s najvećim brojem godina školovanja (**Tablica 5**). Visoka statistička značajnost povezanosti utvrđena je  $\chi^2$  testom,  $p = 1,9 \times 10^{-9}$ . Nije nađena povezanost između bračnog statusa i broja bodova na GHQ-30 upitniku ( $p=0,5$ ).

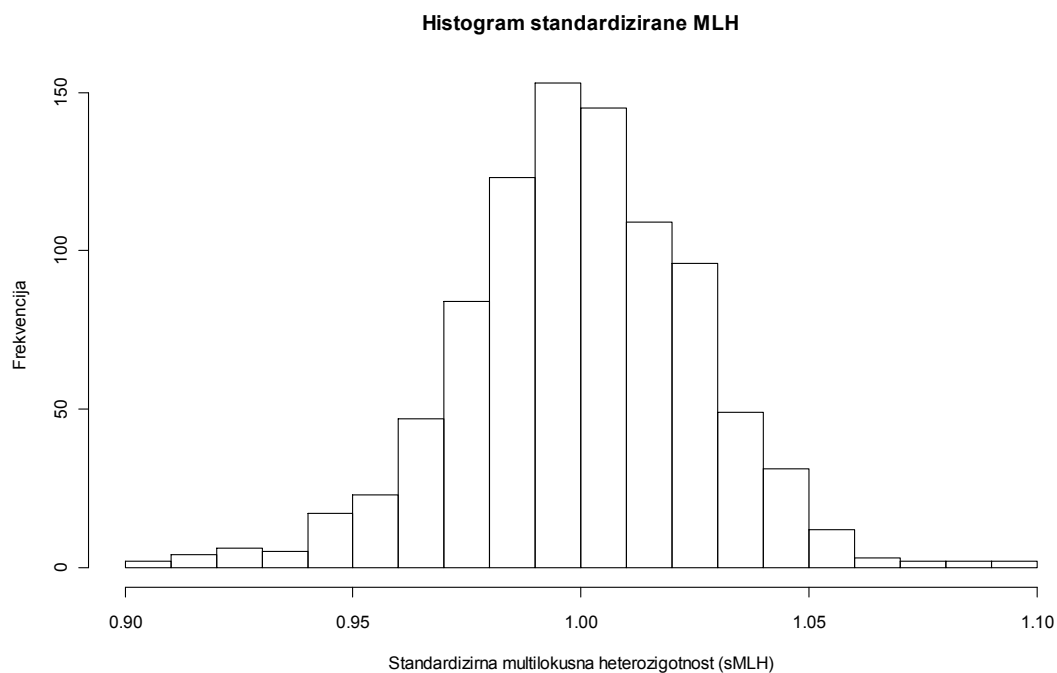
**Tablica 7. Postotak ispitanika narušenog psihičkog zdravlja ovisno o socio-ekonomskom statusu, procijenjeno prema pokazateljima socioekonomskog statusa (1- najnepovoljniji socio-ekonomski status). Kao zdravi su definirani oni ispitanici koji imaju manje od 31 bod na GHQ-30, a kao narušenog psihičkog zdravlja oni koji imaju 31 bod ili više.**

Socio-ekonomski status (prema pokazateljima)	zdravi	narušenog psihičkog zdravlja
<b>1</b>	62 (48,44%)	66 (51,56%)
<b>2</b>	119 (58,62%)	84 (41,38%)
<b>3</b>	255 (73,49%)	92 (26,51%)
<b>4</b>	183 (79,22%)	48 (20,78%)

Osobe koje same sebe smatraju lošijeg socio-ekonomskog statusa od drugih, češće su bile akutnog narušenog psihičkog zdravlja,  $p = 4,6 \times 10^{-9}$ . Sličan rezultat dobiven je i kada se u analizi koristio socioekonomski status procijenjen pomoću pokazatelja socioekonomskog statusa,  $p = 1,3 \times 10^{-10}$ . Koeficijent korelacije između socio-ekonomskog statusa dobivenog samo-procjenom i koristeći uobičajene pokazatelje bio je 0,35.

#### **4.1.4. Standardizirana multilokusna heterozigotnost (sMLH)**

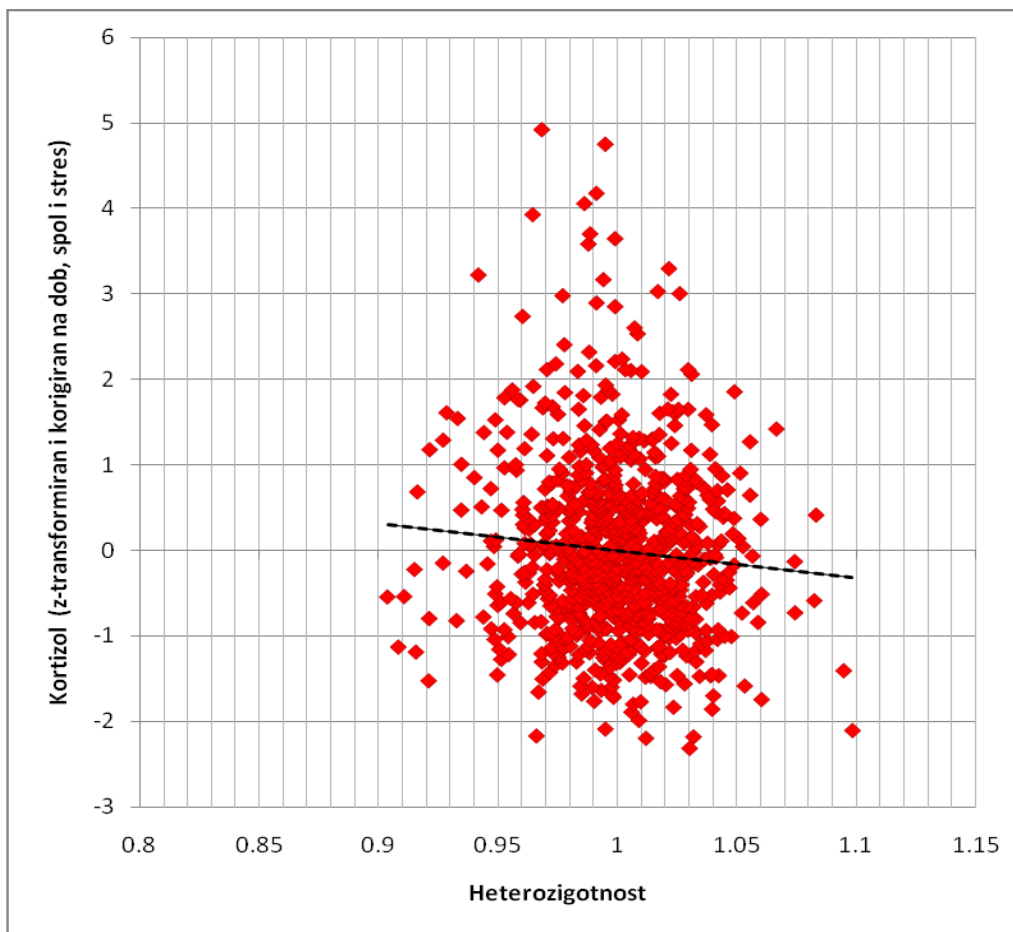
Srednja vrijednost standardizirane multilokusne heterozigotnosti (sMLH), izračunate pomoću STR biljega bila je  $1,0 \pm 0,03$ . Zabilježene su vrijednosti MLH u rasponu od 0,9 do 1,1. Histogram izračunatih vrijednosti je prikazan na **Slici 9**.



**Slika 9. Histogram standardizirane multilokusne heterozigotnosti izračunate pomoću STR biljega.**

#### **4.2. Determinante jutarnjih vrijednosti kortizola**

Multiplom regresijom, u modelu koji je uključivao dob, spol i godine školovanja kao kovarijate, utvrđena je značajna statistička povezanost jutarnjih vrijednosti kortizola s rezultatom GHQ-30 upitnika ( $p=0,009$ ), sa standardiziranom multilokusnom heterozigotnosti ( $p=0,005$ ) i s godinama školovanja ( $p=0,016$ ).



**Slika 10.** Prikaz ovisnosti kortizola o heterozigotnosti. Više vrijednosti kortizola povezane su sa smanjenom standardiziranom multilokusnom heterozigotnošću. Vrijednosti kortizola su z-transformirane i standardizirane na dob, spol i na akutno narušeno psihičko zdravlje.

Za sve prediktorne varijable izračunat je  $\beta$  nakon što su varijable z-transformirane (**Tablica 8**). Beta-koefficient z-transformirane heterozigotnosti slične je veličine kao  $\beta$  z-transformiranog rezultata na GHQ upitniku, ali negativnog predznaka. To znači da je učinak dvaju prediktornih varijabli usporediv, te će jutarnja razina kortizola biti veća



kod osoba s većim brojem bodova na GHQ upitniku (odnosno kod osoba akutno narušenog psihičkog zdravlja), a razina kortizola će biti niža kod osoba povećane multilokusne heterozigotnosti.

**Tablica 8. Beta-koeficijenti za ispitivane prediktorne varijable (sve varijable su z-transformirane); također su prikazani i standardna pogreška beta-koeficijenta i odgovarajuća *p*-vrijednost.**

<b>z-transformirana varijabla</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>standardna pogreška</b>	<b><i>p</i>-vrijednost</b>
<b>dob</b>	-0,56	0,17	0,001
<b>GHQ-30</b>	0,39	0,15	0,010
<b>BMI</b>	-0,50	0,16	0,001
<b>heterozigotnost</b>	-0,41	0,15	0,005
<b>školovanje</b>	-0,41	0,17	0,014

Za svaku prediktornu varijablu izračunat je postotak varijance u zavisnoj varijabli koju objašnjava. Tako od varijabli uključenih u model najveći postotak varijance objašnjava rezultat na GHQ-30 upitniku (1,5%), dok je taj postotak za heterozigotnost 0,9% (Tablica 9).

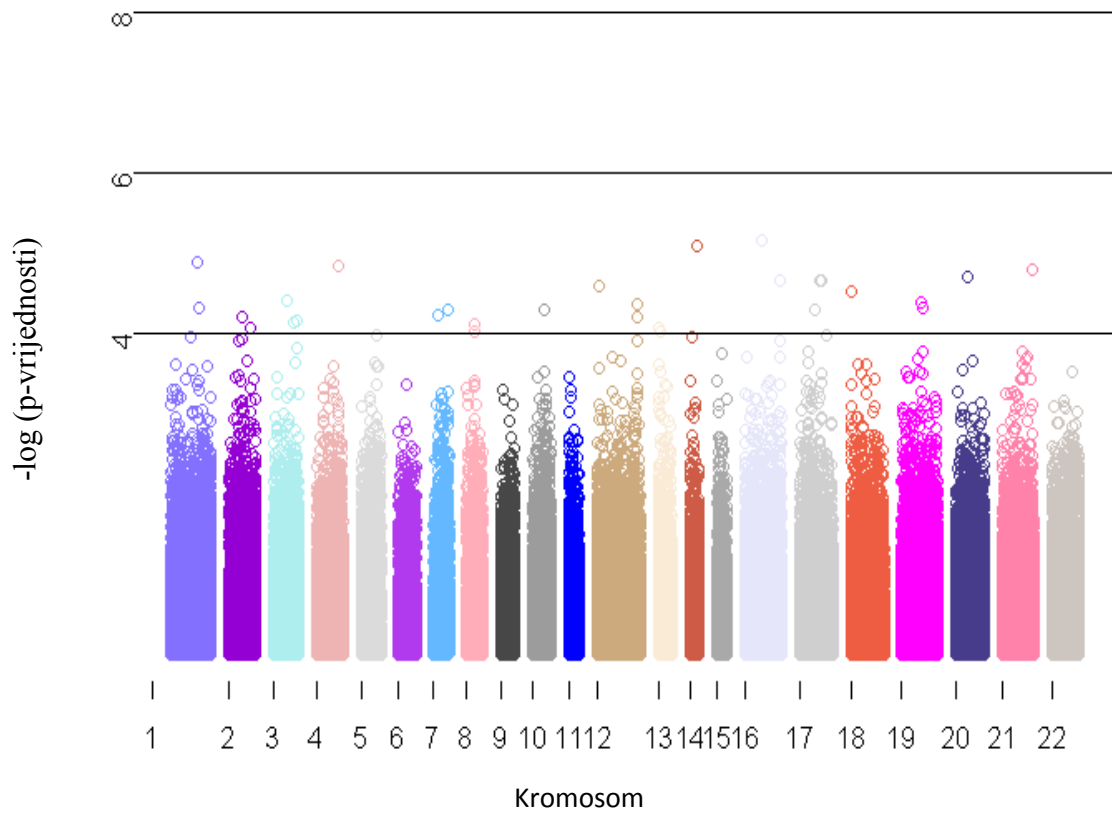
**Tablica 9. Postotak varijance jutarnjih vrijednosti kortizola koji je objašnjen sa pojedinom prediktivnom varijablom.**

<b>Prediktorna varijabla</b>	<b>Objašnjena varijanca (%)</b>
dob	1,1
GHQ-30	1,5
BMI	1,3
heterozigotnost	0,9
školovanje	0,6

#### **4.3. Cjelogenomska studija asocijacije za kortizol**

**GWAS - standardizacija na dob i spol.** Cjelogenomska analiza ukazala je na 30 SNP-ova koji su pokazali razinu statističke značajnosti  $p < 0,0001$ , i stoga ukazuju na moguću povezanost s razinom kortizola. Zbog velikog broja analiza, korigirana  $p$ -vrijednost koja se smatra statistički značajnom u genomskim analizama iznosi  $p < 1,62 \times 10^{-7}$ . Niti jedan SNP u analizi nije pokazao takvu razinu značajnosti povezanosti s kortizolom (**Slika 11, Tablica 10**).

**GWAS - standardizacija na dob, spol i akutni psihički stres.** Zbog utvrđene povezanosti razine kortizola i akutno narušenog psihičkog zdravlja, cjelogenomska analiza je ponovljena, s vrijednostima kortizola standardiziranim, osim na dob i spol, također i na stupanj akutno narušenog psihičkog zdravlja. Niti u ovoj analizi niti jedan SNP nije pokazao statistički značajnu povezanost s razinom kortizola (**Tablica 11**).



**Slika 11. Grafički prikaz rezultata cjelogenomske asocijacijske studije jutarnje koncentracije kortizola (Manhattan prikaz), pri čemu su u model bili uključeni dob, spol i pojedini SNP biljeg. Y os prikazuje negativni logaritam  $p$ -vrijednosti nadjene za svaki SNP biljeg koji je bio uključen u analizu (više vrijednosti na Y osi označavaju veću statističku značajnost).**

**Tablica 10. Lista svih SNP biljega za koje je nađena povezanost s jutarnjim koncentracijama kortizola ( $p < 10^{-4}$ ) u modelu koji je uključivao dob, spol i pojedini SNP biljeg.**

SNP	kromosom	pozicija	alel 1	alel 2	$p$ -vrijednost
rs10826151	10	59525406	C	A	$6,56 \times 10^{-6}$
rs12347952	9	28603702	A	G	$8,25 \times 10^{-6}$
rs2422260	1	169627504	G	A	$1,31 \times 10^{-5}$
rs7651936	3	163505661	C	A	$1,49 \times 10^{-5}$
rs6041692	20	12805733	A	G	$1,57 \times 10^{-5}$
rs3923018	17	86350	A	G	$1,93 \times 10^{-5}$
rs580545	11	129114448	G	A	$1,98 \times 10^{-5}$
rs1486536	11	11008079	C	A	$2,04 \times 10^{-5}$
rs876594	12	3531820	A	G	$2,37 \times 10^{-5}$
rs10276466	7	32261507	A	G	$2,80 \times 10^{-5}$
rs17827216	12	65476260	G	A	$3,26 \times 10^{-5}$
rs4973257	2	228426117	A	G	$3,94 \times 10^{-5}$
rs8041171	15	31653802	C	A	$3,96 \times 10^{-5}$
rs7000234	8	81699669	G	A	$4,25 \times 10^{-5}$
rs2030592	15	35102817	A	C	$4,26 \times 10^{-5}$
rs11227097	11	105915188	A	G	$4,78 \times 10^{-5}$
rs1172292	1	179905976	A	G	$4,82 \times 10^{-5}$
rs10051236	5	85173074	A	G	$4,86 \times 10^{-5}$
rs13191198	6	122968759	A	G	$5,05 \times 10^{-5}$
rs10059041	5	21464532	G	A	$5,53 \times 10^{-5}$
rs7018449	8	81739520	A	G	$6,24 \times 10^{-5}$
rs1512228	2	60473582	G	A	$6,33 \times 10^{-5}$
rs1000772	3	10646218	G	A	$7,09 \times 10^{-5}$
rs6419844	3	22391322	A	G	$7,12 \times 10^{-5}$
rs11740657	5	135609558	G	A	$8,04 \times 10^{-5}$
rs10496444	2	113269899	A	G	$8,11 \times 10^{-5}$
rs1269705	8	103114108	A	G	$8,87 \times 10^{-5}$
rs9650045	8	113638725	G	A	$9,21 \times 10^{-5}$
rs7268	5	139692734	C	A	$9,69 \times 10^{-5}$
rs2726336	12	22783326	G	A	$9,89 \times 10^{-5}$

**Tablica 11. Lista svih SNP biljega za koje je nađena povezanost s jutarnjim koncentracijama kortizola ( $p < 10^{-4}$ ) u modelu koji je uključivao dob, spol, akutno narušeno psihičko zdravlje i pojedini SNP biljeg.**

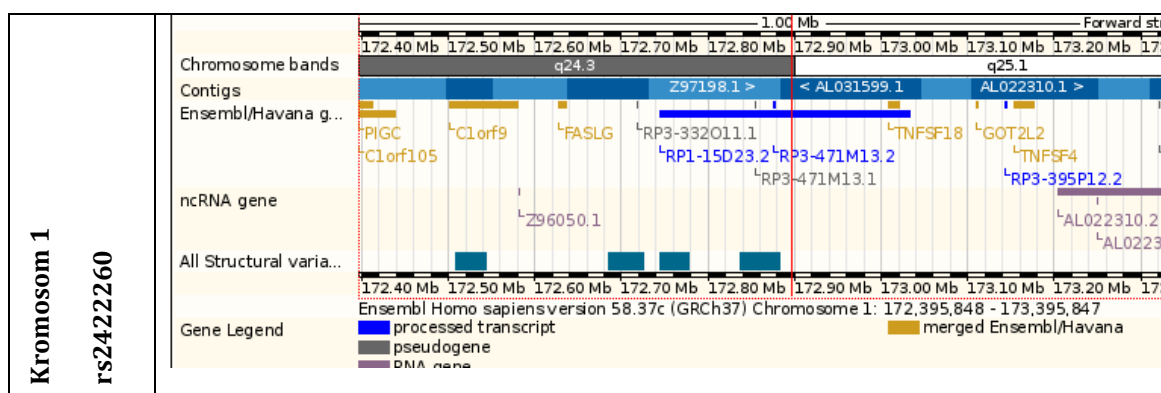
SNP	kromosom	pozicija	alel 1	alel 2	$p$ -vrijednost
rs10826151	10	59525406	C	A	$8,95 \times 10^{-6}$
rs12347952	9	28603702	A	G	$1,10 \times 10^{-5}$
rs1486536	11	11008079	C	A	$1,16 \times 10^{-5}$
rs3923018	17	86350	A	G	$1,32 \times 10^{-5}$
rs7651936	3	163505661	C	A	$1,54 \times 10^{-5}$
rs580545	11	129114448	G	A	$1,86 \times 10^{-5}$
rs2422260	1	169627504	G	A	$1,89 \times 10^{-5}$
rs10276466	7	32261507	A	G	$2,11 \times 10^{-5}$
rs1512228	2	60473582	G	A	$2,45 \times 10^{-5}$
rs8041171	15	31653802	C	A	$2,54 \times 10^{-5}$
rs1172292	1	179905976	A	G	$2,61 \times 10^{-5}$
rs11227097	11	105915188	A	G	$3,35 \times 10^{-5}$
rs2726336	12	22783326	G	A	$3,81 \times 10^{-5}$
rs1512227	2	60473343	G	A	$4,57 \times 10^{-5}$
rs6041692	20	12805733	A	G	$4,72 \times 10^{-5}$
rs7000234	8	81699669	G	A	$4,78 \times 10^{-5}$
rs4973257	2	228426117	A	G	$5,38 \times 10^{-5}$
rs1269705	8	103114108	A	G	$5,44 \times 10^{-5}$
rs2030592	15	35102817	A	C	$5,68 \times 10^{-5}$
rs1000772	3	10646218	G	A	$6,17 \times 10^{-5}$
rs7018449	8	81739520	A	G	$6,49 \times 10^{-5}$
rs17827216	12	65476260	G	A	$7,40 \times 10^{-5}$
rs876594	12	3531820	A	G	$7,76 \times 10^{-5}$
rs7254300	19	23222276	G	A	$8,06 \times 10^{-5}$
rs6992620	8	81798526	G	A	$8,78 \times 10^{-5}$
rs6419844	3	22391322	A	G	$8,92 \times 10^{-5}$
rs13191198	6	122968759	A	G	$9,02 \times 10^{-5}$
rs7268	5	139692734	C	A	$9,07 \times 10^{-5}$

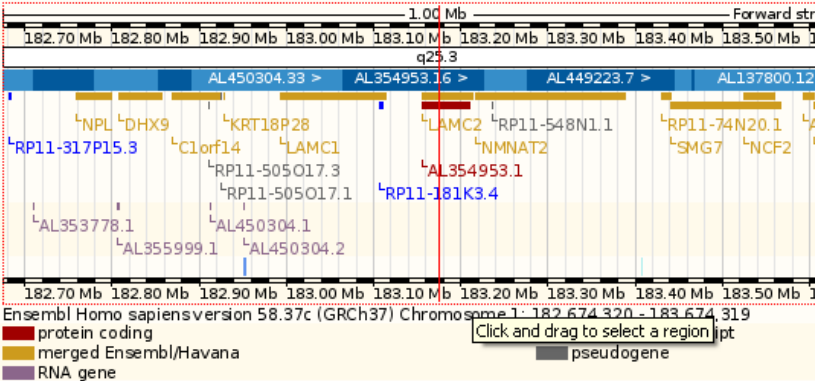
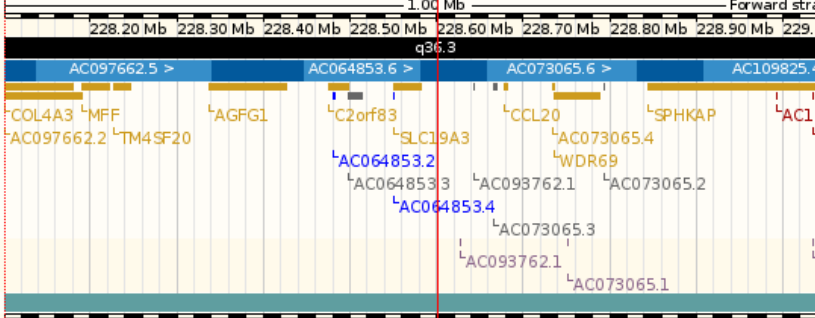
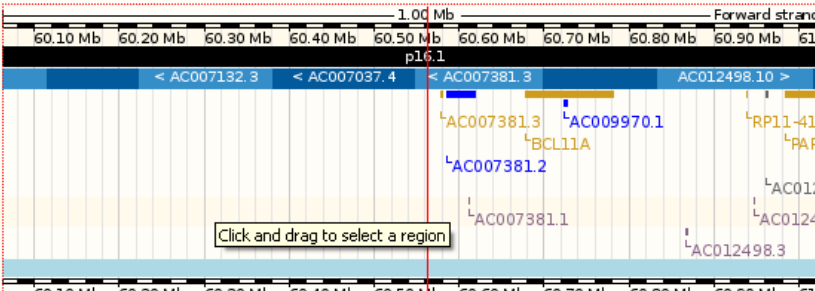
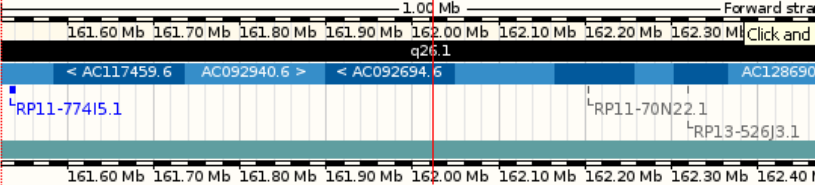
**Tablica 12. Lista SNP biljega koji su izdvojeni na temelju malih *p*-vrijednosti u oba modela (GWAS korigiran na dob i spol, te GWAS korigiran na dob, spol i akutno narušeno psihičko zdravlje).**

	<b>SNP</b>	<b>krom.</b>	<b>pozicija</b>	<b>u genu</b>	<b>u blizini gena</b>
1	<b>rs2422260</b>	1	169627504	RP1-15D23.2	-
2	<b>rs1172292</b>	1	179905976	LAMC2	-
3	<b>rs4973257</b>	2	228426117	-	SLC19A3
4	<b>rs1512228</b>	2	60473582	-	AC007381.3
5	<b>rs7651936</b>	3	163505661	-	-
6	<b>rs1000772</b>	3	10646218	ATP2B2	GHRL
7	<b>rs6419844</b>	3	22391322	ZNF385D	-
8	<b>rs7268</b>	5	139692734	HBEGF	-
9	<b>rs13191198</b>	6	122968759	PKIB	-
10	<b>rs10276466</b>	7	32261507	-	PDE1C, AC018641.7
11	<b>rs7000234</b>	8	81699669	-	ZNF704
12	<b>rs7018449</b>	8	81739520	ZNF704	-
13	<b>rs1269705</b>	8	103114108	NCALD	-
14	<b>rs12347952</b>	9	28603702	LINGO2	-
15	<b>rs10826151</b>	10	59525406	-	IPMK
16	<b>rs580545</b>	11	129114448	-	BARX2, TMEM45B
17	<b>rs1486536</b>	11	11008079	-	ZBED5, GALNTL4
18	<b>rs11227097</b>	11	105915188	-	AASDHPPT, GUCY1A2
19	<b>rs876594</b>	12	3531820	PRMT8	-
20	<b>rs17827216</b>	12	65476260	-	GRIP1
21	<b>rs2726336</b>	12	22783326	-	ETNK1
22	<b>rs8041171</b>	15	31653802	RYR3	-
23	<b>rs2030592</b>	15	35102817	MEIS2	-
24	<b>rs3923018</b>	17	86350	RPH3AL	-
25	<b>rs6041692</b>	20	12805733	RPS-1069C8.2	-

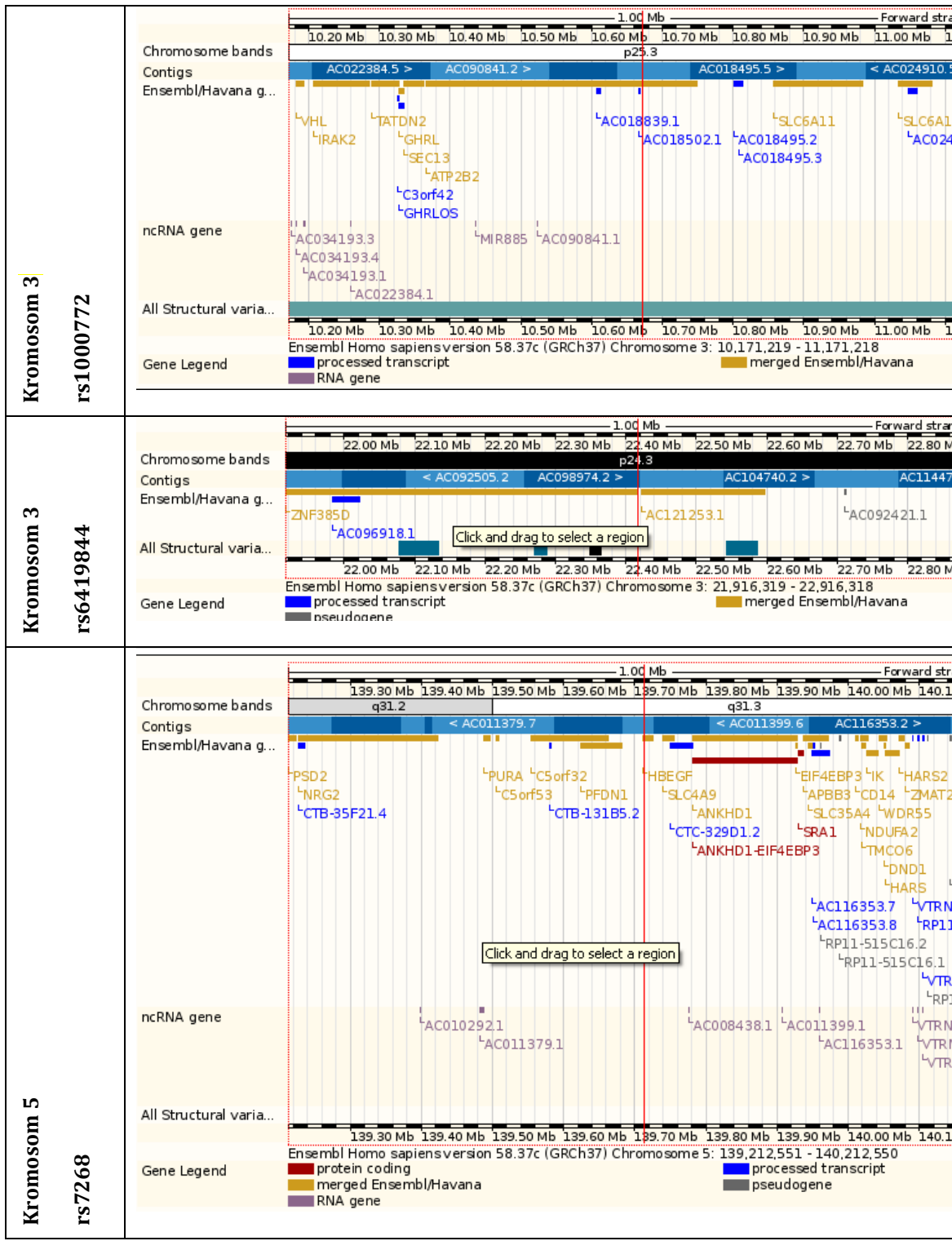
Od svih SNP biljega čija je asocijacija s kortizolom bila nađena u 2 modela, za daljnju analizu odabrani su oni koji su pokazali razinu statističke značajnosti manju od 0.0001 u oba modela: kada je kortizol bio standardiziran na dob i spol, te kada je u standardizaciju uključen i stupanj akutno narušenog psihičkog zdravlja kojem je pojedinac izložen. Tablica 12 prikazuje sve SNP biljege koji su zadovoljili ove uvjete i bili dalje obrađeni. Položaj u genomu i relativni odnos prema najbližim genima, transkriptima i pseudogenima za SNP biljege koji su pokazali najsnažniju povezanost s koncentracijom kortizola prikazan je na Slici 12.

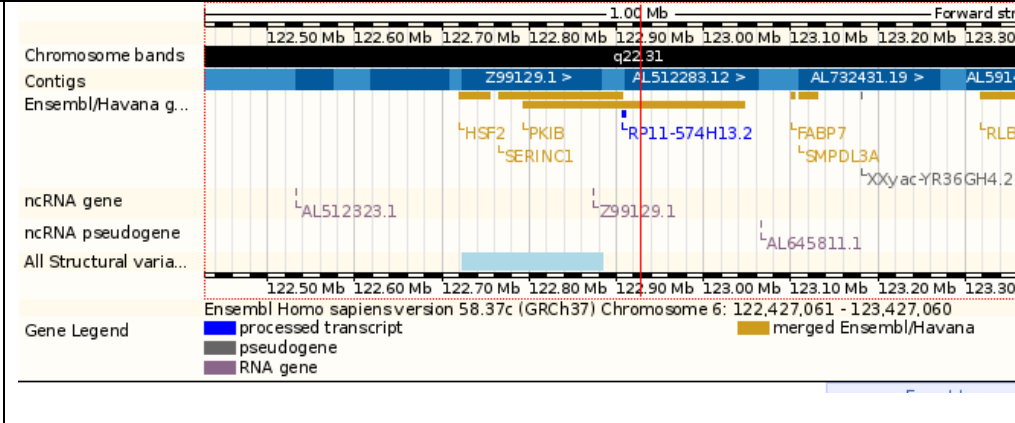
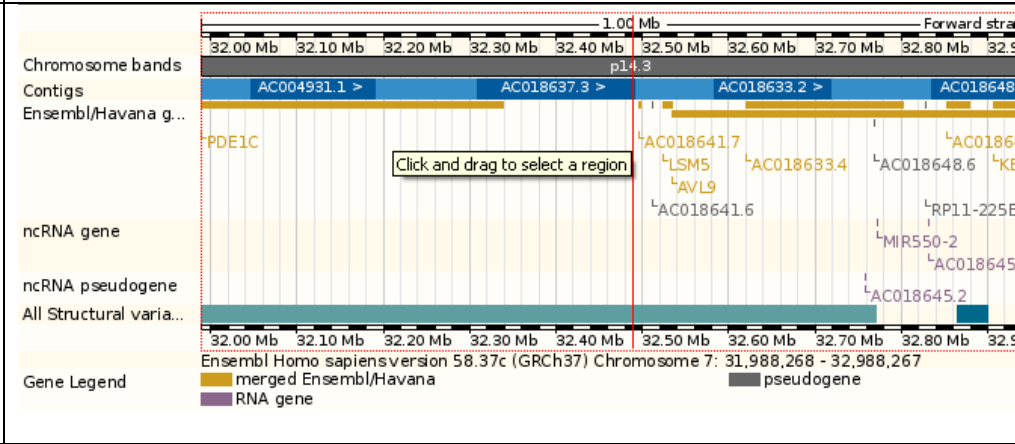
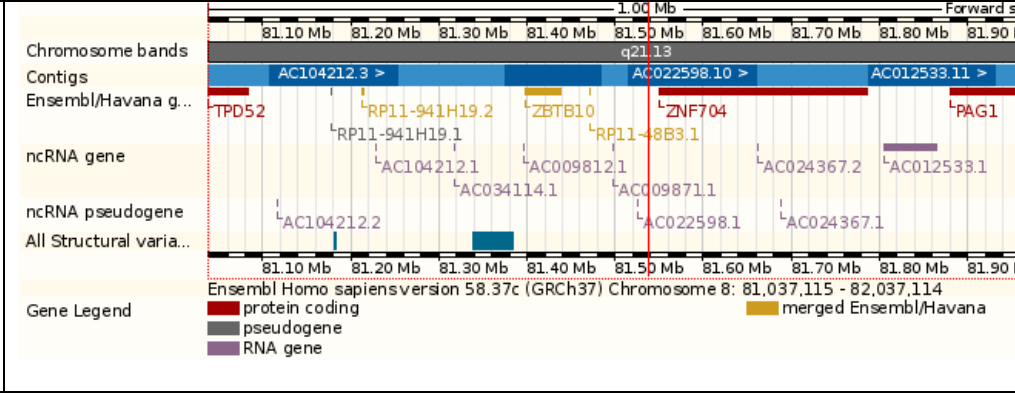
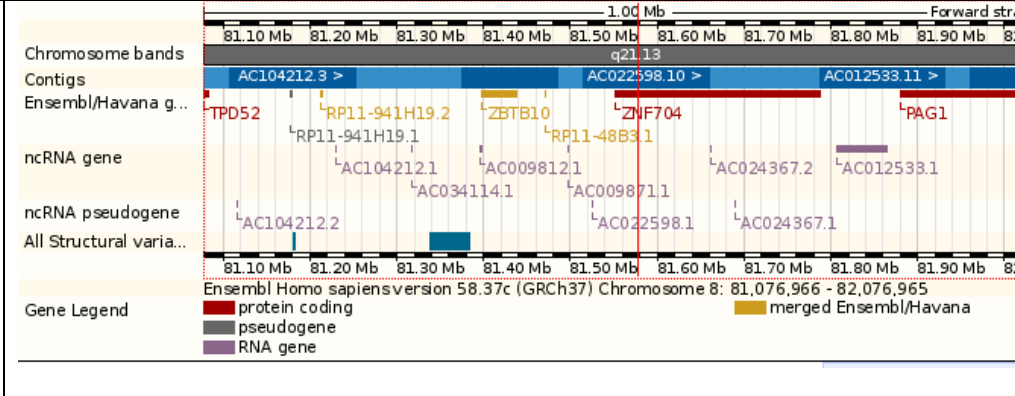
**Slika 12.** Položaj odabranih SNP-ova u genomu i relativni odnos prema susjednim genima i regulatornim elementima.

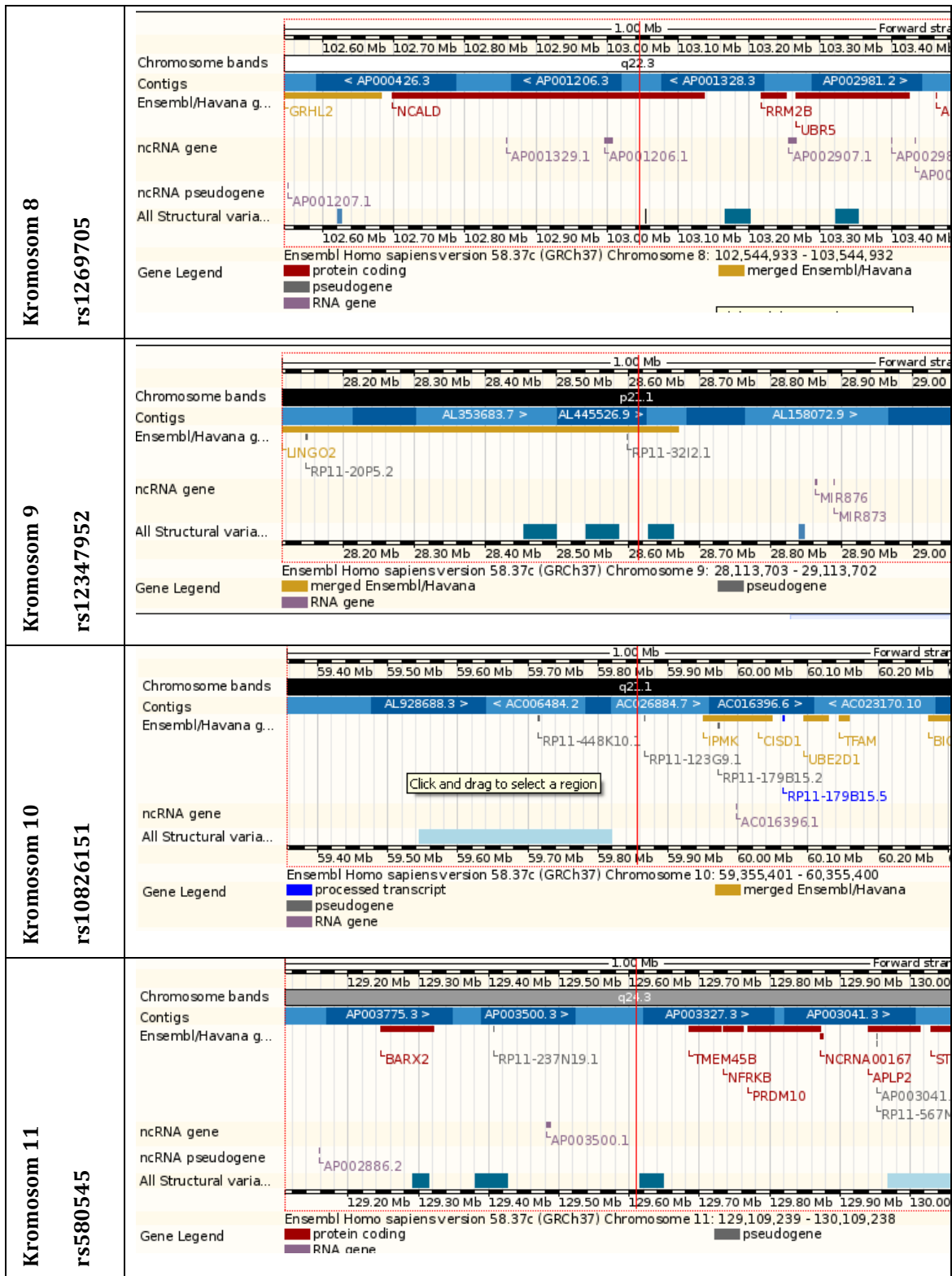


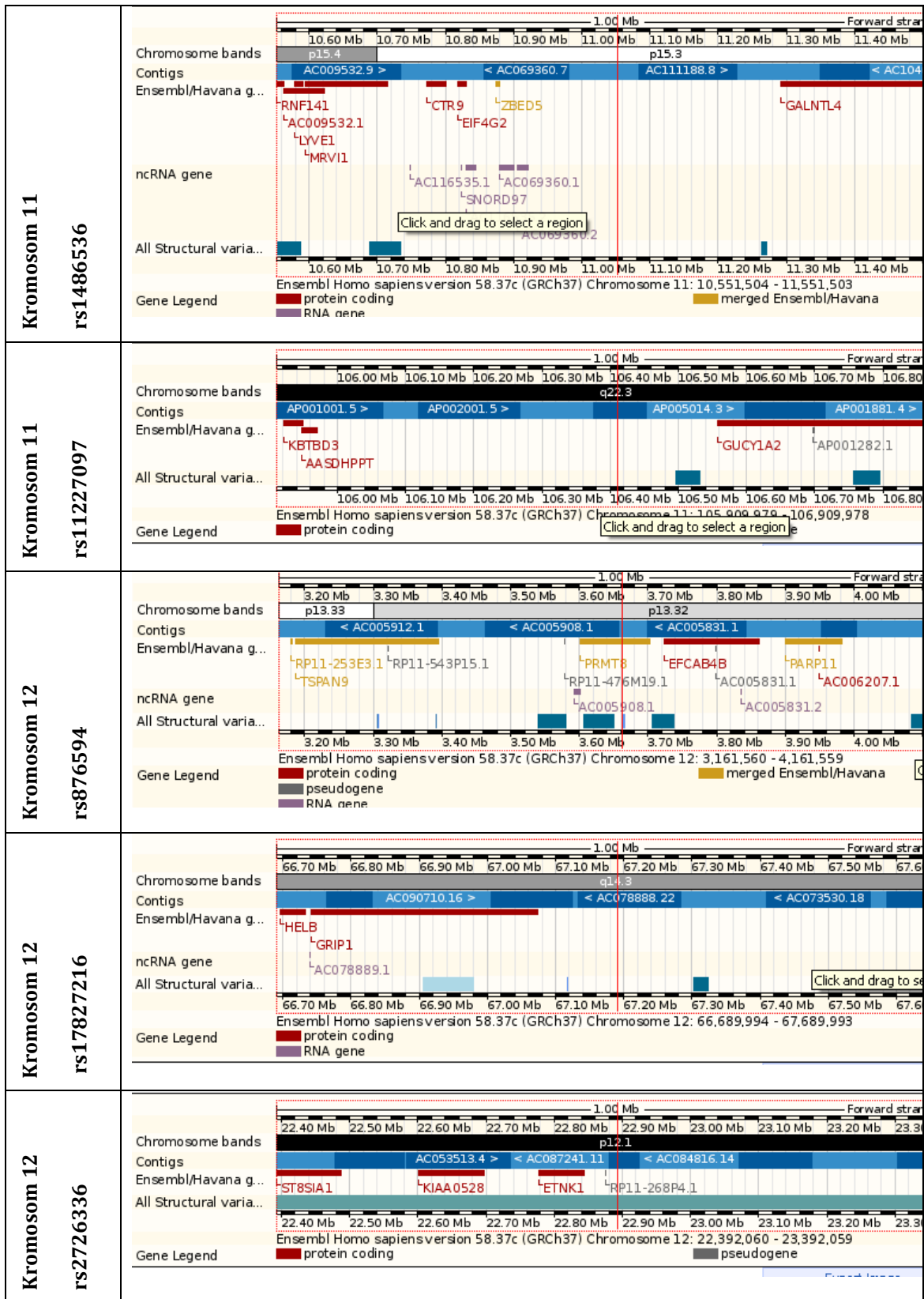
<p><b>Kromosom 1</b> <b>rs1172292</b></p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 1: 182,674,320 - 183,674,319 Click and drag to select a region</p> <p>Legend:  <span style="color:red">■</span> protein coding  <span style="color:yellow">■</span> merged Ensembl/Havana  <span style="color:purple">■</span> RNA gene  <span style="background-color:grey">■</span> pseudogene</p>
<p><b>Kromosom 2</b> <b>rs4973257</b></p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 2: 228,100,613 - 229,100,612 Click and drag to select a region</p> <p>Legend:  <span style="color:red">■</span> protein coding  <span style="color:yellow">■</span> merged Ensembl/Havana  <span style="color:purple">■</span> RNA gene  <span style="color:blue">■</span> processed transcript  <span style="background-color:grey">■</span> pseudogene</p>
<p><b>Kromosom 2</b> <b>rs1512228</b></p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene ncRNA pseudogene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 2: 60,061,932 - 61,061,931 Click and drag to select a region</p> <p>Legend:  <span style="color:blue">■</span> processed transcript  <span style="color:yellow">■</span> merged Ensembl/Havana  <span style="background-color:grey">■</span> pseudogene</p>
<p><b>Kromosom 3</b> <b>rs7651936</b></p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 3: 161,522,960 - 162,522,959 Click and drag to select a region</p> <p>Legend:  <span style="color:blue">■</span> processed transcript  <span style="background-color:grey">■</span> pseudogene</p>

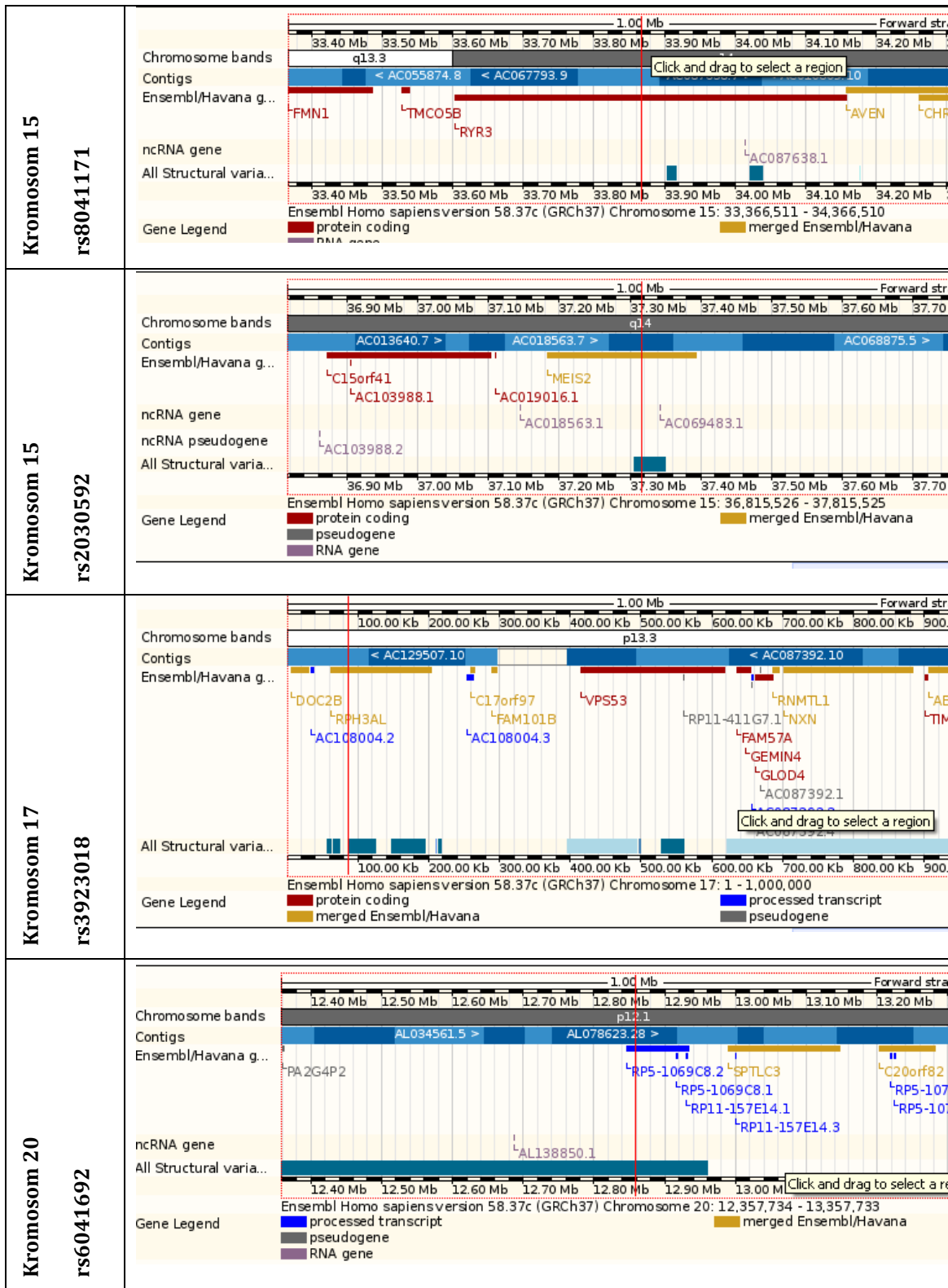




<p><b>Kromosom 6</b> rs13191198</p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene ncRNA pseudogene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 6: 122,427,061 - 123,427,060</p>
<p><b>Kromosom 7</b> rs10276466</p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene ncRNA pseudogene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 7: 31,988,268 - 32,988,267</p>
<p><b>Kromosom 8</b> rs7000234</p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene ncRNA pseudogene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 8: 81,037,115 - 82,037,114</p>
<p><b>Kromosom 8</b> rs7018449</p>	 <p>Chromosome bands Contigs Ensembl/Havana g... ncRNA gene ncRNA pseudogene All Structural varia... Gene Legend</p> <p>Ensembl Homo sapiens version 58.37c (GRCh37) Chromosome 8: 81,076,966 - 82,076,965</p>







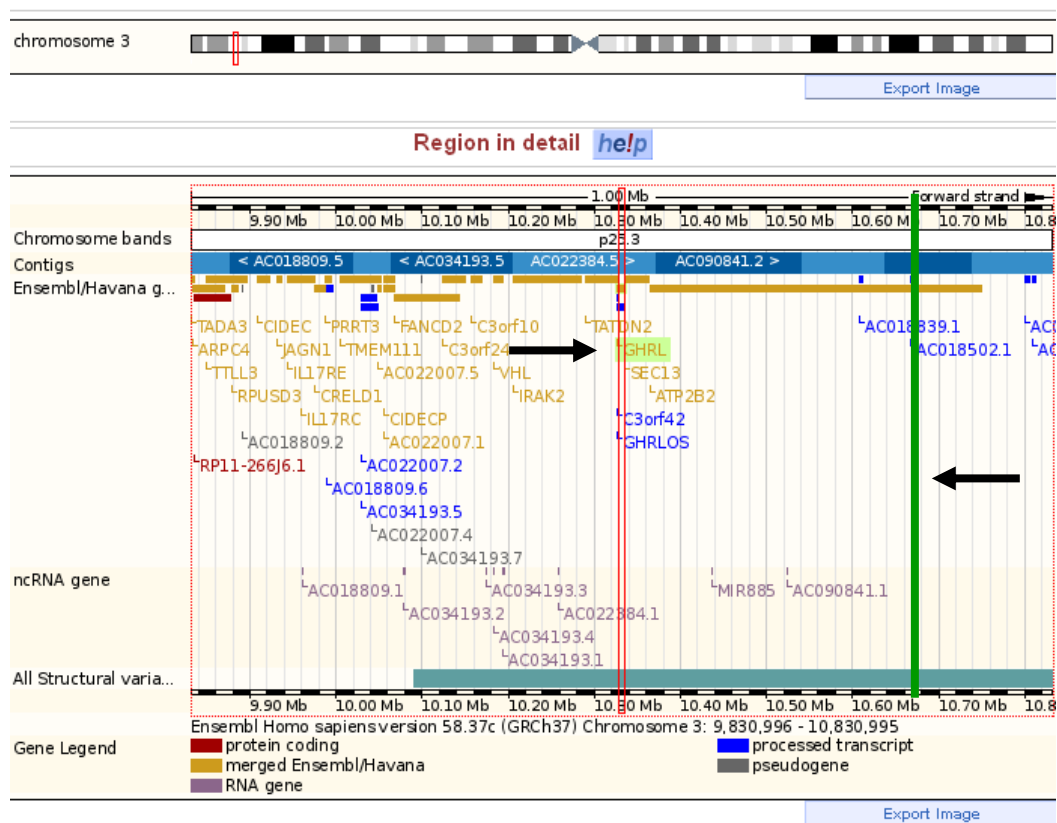
Baza Ensembl pretražena je za sve gene koji su povezani s kortizolom (198). Dobiveno je 8 kandidatnih gena:

1. GHRL gen (ghrelin/obestatin prepropeptid), na kromosomu 3p25.3 (199, 200);
2. SLIT2 gen (slit homolog 2), na kromosomu 4p15 (201);
3. IGFBP7 (engl. insulin-like growth factor binding protein 7), na kromosomu 4q12 (202);
4. SLIT3 (slit homolog 3), na kromosomu 5q34-q35.1 (203);
5. CRH (kortikotropin oslobađajući hormon), na kromosomu 8q13 (204);
6. CYP11B1 (citokrom P450, 11B, polipeptid 1), na kromosomu 8q24.3 (205);
7. PTPN11 (protein tirozin fosfataza), na kromosomu 12q24.13 (206);
8. HSD11B2 (hidroksisteroid (11-beta) dehidrogenaza 2), na kromosomu 16q22.1 (207).

Većina SNP biljega, koje smo prethodno izdvojili na temelju najmanjih *p*-vrijednosti, ne nalazi se u blizini gena za koje je poznato da su uključeni u metabolizam kortizola (200-207). Iznimku čini SNP biljeg rs1000772 na kromosomu 3p25.3, koji se nalazi relativno blizu gena GHRL. Ovaj gen kodira hormon grelin koji je povezan s

regulacijom lučenja kortizola (**Slika 13**). Udaljenost između opisanog gena i rs1000772 biljega je ~0,3 Mb, a biljeg se nalazi u intronu susjednog gena, ATP2B2.

Aleli koje nalazimo na ovom lokusu (rs1000772) su A i G (198). Proporcija alela A za europsku populaciju (ili kod osoba europskog porijekla) je oko 15%, dok je u Africi oko 30%, a kod Japanaca i Kineza više od 70% (198).



**Slika 13.** Genomska regija kromosoma 3p25.3. Crne strelice pokazuju na gen GHRL (obilježen uskim crvenim pravokutnikom) i na poziciju rs1000772 biljega (obilježen zelenom linijom).

Koristeći pretraživač genoma Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) dodatno je istražen biljeg rs1000772 i susjedna regija. Sekvenca oko biljega je:

GCAAAACCACCAACAGAAAGCACACAGATGGGGAAATATGCGGTTACTGC  
ACAGACTGCAGAAGGCACCCCTGCTTATGGGACGAGCTTGAAGCAGGAA  
GGCAGAGCGTCACCTGGCTCGACCTCCGCTGGGAACGCGCTGCGGGCAA  
CTGCCATTTTCCACCTCTGCACACGTCTACAAATCACCGCAAAGCACCA  
TGAGTATTGATCTGGGTATATACATTATCTGGGTACATACATTATCTGGGT  
AAATACATTTTAAGGAGGAGGCAAACCTCGCACATATGGACTCCACAAAG  
AAGGAGGATGTGTTGATCATTCAATTTGTTGATAGGGCACATTTCCCGCCG  
AGGGCCTTCCGTGTGCCACATGCCTCTCCGGTGCTTGGGAGACCACAGGC  
GTCRTCTCAGCCGATCCTCACCTGCCCTGTGGGTAGAGGCTGTTGTTTTTC  
AGAGGCAGAGGCATAGAGGTTTGGTTGCAGGTGGAGGGTCCCACAGCTG  
GGAAGTGGCCGAGTGGGGATGAAACCCAGGGATCCTTCCTCCAGAGTCC  
AGCTCCACTGCCAAGCTTCACCTGCATGCGCTCATTCTAAAAGCTGTTTT  
CACACCAAATCTCCGCAAGCCCTCTTTATTTCCCACTTCCTGCCAAGTAAG  
CAGTTCAGCTCACAACTATATTAATCTCTGGCATAAATTCATTTAAACA  
AAATATTGCCAAGCAACGCAAAGCAGAAATCCTCTTACAACCCACATG  
GGTATCGATGCTGTGCGTGTGGAAGGGCTGAGCCTCTTAGTGTCTGATTG  
TAAA,

a biljeg rs1000772 je podcrtan.



## **5. RASPRAVA**

Važnost heterozigotnosti za održanje homeostaze u uvjetima promjenjivog okoliša prvi je pretpostavio Lerner 1954. godine (72). On je sugerirao da je kompenzacijski kapacitet povećan kod organizama veće heterozigotnosti i to naročito u nestalnom okolišu, te da heterozigotnost pokazuje snažniji pozitivan učinak na karakteristike organizma koje su povezane s fitnessom, nego na karakteristike poput morfologije ili ponašanja (72). U narednim je godinama ispitivana povezanost heterozigotnosti i odabranih fenotipova pri različitim uvjetima okoliša (73), no u literaturi prevladavaju studije provedene na biljnim i životinjskim vrstama dok su studije koje proučavaju učinak heterozigotnosti u ljudi malobrojne.

U ovom istraživanju nastojalo se prikupiti dodatne podatke i produbiti shvaćanje o korelaciji između heterozigotnosti i fitnesa u ljudi pomoću istraživanja u kojem su dobro definirane relevantne varijable: (a) heterozigotnost, (b) okoliš, i (c) svojstvo usko povezano s fitnessom.

### **5.1. Glavni rezultati disertacije**

Prema našem saznanju, ovo je prvo istraživanje koje je proučavalo ulogu heterozigotnosti kao modifikatora u lučenju kortizola. Dok je porast koncentracije kortizola u stresnim situacijama normalan i nužan tjelesni odgovor, taj porast treba biti strogo reguliran. Dugoročno povišene vrijednosti kortizola popraćene su negativnim

posljedicama, pa porast koncentracije treba biti takav da pozitivni učinci budu maksimalno izraženi (npr. privremena hiperglikemija koja omogućava optimalan rad mišića i mozga), a štetne posljedice za organizam minimalne (npr. prigušivanje imunološkog odgovora) (61, 63, 65, 66, 68, 69). Smatramo da manja odstupanja od normalnih vrijednosti pri akutno narušenom psihičkom zdravlju upućuju na bolju regulaciju i primjereno funkcioniranje kompenzacijskih mehanizama, pa označavaju bolji fitness. Ipak, naše razumijevanje djelovanja kortizola je ograničeno. Znamo da su dugoročno povišene vrijednosti kortizola štetne, no sa sadašnjim znanjem ne možemo reći što je optimalni kortizolski odgovor u bilo fizičkom bilo psihičkom stresu. S druge strane, na primjeru oboljelih od Addisonove bolesti vidi se da je i manjak kortizola štetan, te je poznato da za vrijeme infekcije ili kirurške intervencije treba davati znatno veće doze kortikosteroida.

Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi utječe li multilokusna genetska heterozigotnost osobe na veličinu odstupanja jutarnjih koncentracija kortizola, kada je psihičko zdravlje akutno narušeno. Snažniji akutni psihološki stres kojeg trpi pojedinac znači nepovoljni okoliš i postavlja veći izazov pred njegove kompenzacijske mehanizme. U skladu s hipotezom o korelaciji heterozigotnosti i fitnessa, očekivali smo da će kod osoba smanjene heterozigotnosti abnormalni porast jutarnje koncentracije kortizola u odgovoru na akutno narušeno psihičko zdravlje biti veći nego kod osoba povećane heterozigotnosti.

Istraživanje je potvrdilo povezanost koncentracije kortizola s akutno narušenim psihičkim zdravljem ( $p=0,009$ ). Više vrijednosti kortizola opažaju se kod osoba jače

narušenog akutnog psihičkog zdravlja ( $\beta=0,39$  za z-transformiran rezultat na GHQ-30 upitniku), kako bismo i očekivali na temelju brojnih dosadašnjih studija.  $\beta$ -koeficijent nam govori o veličini utjecaja pojedine prediktorne varijable na koncentraciju kortizola i zanimljivo je primijetiti kako je veličina učinka akutno narušenog psihičkog zdravlja na kortizol ( $\beta=0,39$ ) približno jednaka učinku heterozigotnosti ( $\beta=-0,41$ ) (obje varijable su z-standardizirane). Rezultati sugeriraju da standardizirana multilokusna heterozigotnost modificira kortizolski odgovor kada je psihičko zdravlje akutno narušeno u ljudi ( $p=0,005$ ): pri akutno narušenom psihičkom zdravlju, jutarnje koncentracije kortizola kod heterozigotnijih osoba pokazuju manja odstupanja (u smislu porasta) od normale.

Heterozigotnost je objasnila 0,9% varijance kortizola. Ovaj rezultat u skladu je s rezultatima drugih studija korelacije heterozigotnosti i fitnesa: postotak objašnjene varijance tipično je samo nekoliko posto ili manje (na primjer, u meta-analizi koja je obuhvatila studije korelacije heterozigotnosti i fitnesa objašnjena varijanca tipično se kretala u rasponu od 0,07% do 3,3%; u studijama s STR biljezima obično je oko 1%), a korelacija je uobičajeno slaba (17, 21, 78, 79).

Postotak varijance koji objašnjava akutno narušeno psihičko zdravlje, za što je dobro poznat i sa sigurnošću dokazan utjecaj na kortizol (65, 70, 71, 118, 155), samo je malo veći od postotka varijance koji je objašnjen multilokusnom heterozigotnošću i iznosi 1,5%.

Koncentracija kortizola izrazito je varijabilna. Ona proizlazi iz mnogobrojnih čimbenika, na primjer greške mjerenja jer nisu svi ispitanici „uhvaćeni“ u trenutku maksimalne jutarnje vrijednosti ili činjenice da i mnogi drugi čimbenici, od kojim mnogi nisu dostupni mjerenju, utječu na koncentraciju kortizola. U tom svjetlu velike varijabilnosti, objašnjeni se postotak varijance može smatrati bitnim za razumijevanje regulacije lučenja kortizola.

Organizam može kontroliranim kortizolskim odgovorom uspješno kompenzirati okolišni stres, te tako omogućava održanje homeostaze. Važnost ovog mehanizma postaje vidljiva kod bolesnika s Addisonovom bolešću, kod kojih je nemogućnost sinteze pogubna. Čini se da kod osoba smanjene multilokusne heterozigotnosti dolazi do disregulacije i pretjeranog lučenja kortizola pri pokušaju održanja homeostaze koja je narušena psihološkim stresom. Organizam biva izbačen iz ravnoteže, te dolazi do povećanog rizika za razvoj poremećaja i bolesti zbog nepoželjnih posljedica dugoročno pretjerano visokih koncentracija kortizola (61-69, 71, 121).

Dobro su istraženi nepovoljni učinci homozigotnosti na fitnes u smislu preživljenja i uspješnosti reprodukcije, i škodljive posljedice na zdravlje zbog povećane učestalosti inače rijetkih Mendelskih bolesti (77), ali vrlo malo radova istražuje ulogu heterozigotnosti na kompleksna obilježja i bolesti kasnije dobi. Po svojoj prirodi multifaktorijalne bolesti i obilježja imaju složenu etiologiju, pa će učinak heterozigotnosti biti isprepleten s učinkom drugih čimbenika i stoga će ga biti teže identificirati, a takva istraživanja teže dizajnirati.

Nepovoljne posljedice srođivanja i gubitka heterozigotnosti poznate su od povijesnih vremena. Do tih spoznaja davno su došli uzgajivači životinja i poljoprivrednici, a u ljudskim zajednicama već je davno opažena učestala patologija kod potomaka bliskih rođaka. Izbjegavanje srođivanja duboko je ukorijenjeno u ljudskom društvu i privredi, s jedne strane kroz zakone i socijalni pritisak koji obeshrabruju brakove među bliskim srodnicima, a s druge kroz ustaljenu praksu i običaje u poljoprivredi i stočarstvu. Uz laička opažanja, brojni radovi pokazuju štetne učinke srođivanja i smanjene heterozigotnosti na primjeru raznih biljnih i životinjskih vrsta, ali i u ljudi (40-46). Široko rasprostranjeno spolno razmnožavanje samo je po sebi zapravo dokaz za povoljan učinak heterozigotnosti na fitnes i preživljenje.

Tehnološki napredak i druga dostignuća, u zadnjih je 100-200 godina doveli su do fundamentalnih promjena u načinu života i dramatično povećane mobilnosti koja je uslijedila nakon izuma bicikla, vlaka, automobila i aviona (19, 23). Velikom broju ljudi omogućeno je napuštanje rodnog mjesta, te je globalno i lokalno došlo do povećanja heterozigotnosti. Kako je u istom periodu zabilježeno produljenje trajanja života, neki autori sugeriraju da su, uz napretke u medicini i poboljšani stil života, smanjeno srođivanje i povećana heterozigotnost barem dijelom pridonijeli produženju ljudskog vijeka (19, 23, 75, 180). Iako još uvijek ne razumijemo koji je točan mehanizam utjecaja multilokusne heterozigotnosti na biološke procese i zdravlje, dokazi o pozitivnom utjecaju heterozigotnosti se gomilaju.

Prije spomenuta važna studija provedena na morskim lavovima pokazala je kako srođeni organizmi više pobolijevaju od niza zaraznih i nezaraznih bolesti (38).

Istovjetna istraživanja u ljudi potvrdila su povoljan učinak heterozigotnosti kod zaraznih (hepatitis, tuberkuloza, mortalitet od bakterijskih infekcija kod djece, te općeg zdravstvenog stanja) i nezaraznih bolesti (visok krvni tlak, povišeni kolesterol) (23, 24, 30, 47, 74-76).

Dvije studije koje su analizirale povezanost heterozigotnosti i složenih bolesti ili svojstava u ljudi, a po dizajnu i metodama usporedive su s ovim radom, jesu istraživanje Govindaraju-a i sur. (2009) i Campbell-a i sur. (2007).

U prvoj studiji proučavan je utjecaj heterozigotnosti na svojstva koja su povezana s kardiovaskularnom bolesti u Framinghamskoj kohorti (73). Kao fenotip uzet je „rizik za kardiovaskularnu bolest“. Takvim odabirom fenotipa, za koji je sigurno da postoje nepovoljni uvjeti okoliša, kojem su osobe manje ili više izložene, istraživači su osigurali postojanje „izazova“ za kompenzacijske mehanizme organizma. Okolišne stresore predstavlja mnoštvo rizičnih čimbenika za kardiovaskularnu bolest, koje je nemoguće u potpunosti izbjeći (npr. pušenje, stres, premalo kretanja, loša prehrana, slaba fizička aktivnost itd.). Povoljni učinci heterozigotnosti na fitnes posebno dolaze do izražaja kada su uvjeti okoliša nepovoljni, pa ih je zbog toga poželjno „osigurati“ kada istražujemo heterozigotnost. Stresori u ovom istraživanju većinom nisu bili kvantificirani, već je samo bilo osigurano da oni postoje.

Tako su bili zadovoljeni preduvjeti za istraživanje povezanosti između stresora iz okoliša, heterozigotnosti i fenotipskih obilježja povezanih s kardiovaskularnom bolesti. Jednako kao i u našem istraživanju, asocijacija je ispitana regresijskom analizom.

Rezultati su pokazali povoljan učinak heterozigotnosti na sistolički i dijastolički tlak, kao i na promjer i debljinu stjenke lijeve klijetke (73).

Drugo istraživanje proučavalo je utjecaj heterozigotnosti na niz obilježja povezanih s najčešćim ljudskim bolestima (23). Autori sugeriraju mogućnost da se heterozigotnost može smatrati genetskim rizičnim čimbenikom u nastanku bolesti, jer su pronašli da je veća heterozigotnost povezana s nižim krvnim tlakom i nižom koncentracijom LDL kolesterola.

Prema Lernerovoj hipotezi, prednost heterozigotnosti posebno dolazi do izražaja kada su uvjeti okoliša promjenjivi i nepovoljni. U idealnom istraživanju uz heterozigotnost osobe i mjeru fitnesa trebalo bi izmjeriti i uvjete okoliša; odnosno trebalo bi kvantificirati povoljnost/nepovoljnost okoliša u kojem se pojedinac nalazi.

U oba gore navedena istraživanja pretpostavljeno je da su ispitanici izloženi okolišnom stresu zbog prirode odabranog fenotipa (pretpostavljeni stres su u oba istraživanja bili mnogobrojni čimbenici iz okoliša za koje je poznato da pridonose razvoju kardiovaskularne bolesti i nije ih moguće u potpunosti izbjeći), no okolišni stres nije bio kvantificiran za pojedinog ispitanika i samo je nekolicina okolišnih čimbenika bila uzeta u obzir prilikom analize (npr. pušenje i socioekonomski status) (23, 73). Stoga smatramo da u ove dvije studije nije zadovoljavajuće opisana veza između okolišnih stresora i proučavanih fenotipova.

S druge strane, mi smo u našem istraživanju mjerili okolišni stresor (tj. akutno narušeno psihičko stanje), za koji je dobro poznato da utječe na fenotip (tj. koncentracija



kortizola) (59, 60, 62-65, 70, 71). Stoga je u našem istraživanju bilo moguće kvantificirati okolišni stresor, pa smatramo da se naše istraživanje korelacije heterozigotnosti i fitnesa temelji na izravnoj i bolje opisanoj povezanosti stresora i fenotipa negoli istraživanje Campbella i suradnika i Govindaraju i suradnika (23, 73). Ovaj rad također potvrđuje da je moguće dizajnirati istraživanje koje omogućuje mjerenje okolišnog stresa.

Ponudeno je nekoliko mehanizama koji bi mogli objasniti korelaciju heterozigotnosti i fitnesa, no konsenzus još uvijek ne postoji, te zapravo ne razumijemo mehanizam kojim heterozigotnost povećava fitnes organizama (17, 30). Kada se radi o zaraznim bolestima jedno moguće objašnjenje je na primjer da heterozigotnost u MHC lokusu može biti važna za funkcioniranje imunološkog sustava jer su MHC aleli ekspresionirani kodominantno, što znači da će MHC heterozigoti moći detektirati više različitih patogena (30). No, korelacija heterozigotnosti i fitnesa obično se odnosi na standardiziranu multilokusnu heterozigotnost organizma, a ne heterozigotnost pojedinih lokusa i njihov učinak - iako se može očekivati da će heterozigotnost podskupa lokusa donekle odražavati ukupnu heterozigotnost organizma. Teško je razlučiti što je učinak genomske heterozigotnosti, a što je učinak nekog točno određenog lokusa te je time dodatno otežano razumijevanje fenomena korelacije heterozigotnosti i fitnesa (17).

### 5.1.2. Cjelogenomska studija asocijacije kortizola

Genomska heterozigotnost je mjera koja se odnosi na cijeli genom, te ne omogućuje utvrđivanje značaja pojedinog lokusa za fitnes (17). Kako bi se ispitalo da li opažena povezanost posljedica određenih lokusa koji imaju snažan utjecaj na koncentraciju kortizola, istraživanje je upotpunjeno cjelogenomskom studijom koncentracije kortizola. Granica statističke značajnosti utvrđena je Bonferroni korekcijom.

Cjelogenomskom analizom nisu nađeni SNP biljezi koji su statistički značajno povezani s koncentracijom kortizola, no vjerojatno je da je uzorak bio premali za detekciju slabog učinka SNP biljega i tako varijabilnog fenotipa. Za većinu do sada u literaturi opisanih učinaka pojedinog SNP-a na kvantitativna svojstva nađen je omjer šansi (OR, engl. odds ratio) između 1,1 i 1,4, a ti su učinci većinom otkriveni u studijama koje su uključivale nekoliko tisuća, do nekoliko desetaka tisuća osoba (98, 101, 168, 197). Koliki je uzorak potreban da bi se otkrila povezanost SNP biljega s fenotipom ovisi o nekoliko čimbenika. U pravilu, što je učinak (OR) slabiji i što je fenotip lošije definiran, to je potreban veći uzorak (197). Naš uzorak je bio nedovoljne statističke snage za otkrivanje slabih učinaka, kakvi se tipično nalaze u genetičkim asocijacijskim studijama.

Nakon što nije nađena značajna povezanost između niti jednog SNP biljega i koncentracije kortizola kada je analiza uključivala standardizaciju na dob i spol, analiza je ponovljena, pri čemu je akutno narušenje psihičkog zdravlja bilo dodano kao kovarijata. Cilj dodatne analize je bio poboljšati razlučivost genetičkih signala tako da

se kovarijatama objasni veći postotak varijance. No, niti ovom ponovljenom analizom nije nađena niti jedna statistički značajna povezanost.

Bonferroni korekcija se smatra prestrogom, jer zbog neravnoteže vezanja SNP biljezi nisu neovisni jedan od drugoga. Stoga je za podskup SNP biljega koji su pokazali najveću statističku značajnost (čija je  $p$ -vrijednost bila manja od  $10^{-4}$  u obje GWAS analize) opisan položaj u genomu i istraženo je u kojem genu, ili u blizini kojeg gena se nalaze. S obzirom da kortizol nije protein, ne nastaje sintezom na ribosomima prema uputi iz DNK, već djelovanjem niza enzima na kolesterol i druge međuprodukte. Iz toga slijedi da ako postoje genetički čimbenici koji određuju koncentraciju kortizola, očekujemo da se oni nalaze u genima koji kodiraju enzime važne u biosintezi kortizola (ili izdvojeni od gena, možda kao udaljeni regulatorni elementi).

Snaga istraživanja da se otkrije polimorfizam u podlozi bolesti (ili kvantitativnog svojstva) ovisiti će o: (a) veličini uzorka, (b) veličini učinka na svojstvo, i (c) frekvenciji alela u populaciji (84, 96, 168, 208). Učinak SNP-a na svojstvo često se izražava kao OR, odnosno omjer šansi. Radovi iz ovog područja konzistentno pokazuju da:

1. Veći uzorak dramatično poboljšava mogućnost detekcije SNP biljega povezanih s fenotipom (bolesti ili kvantitativnim svojstvom) (96, 97, 168).
2. Mnogo je lakše detektirati SNP-ove koji imaju snažniji učinak na fenotip: pri optimalnoj frekvenciji alela za detekciju povezanosti (frekvencija oba alela oko 50%), potrebno je 4000 ispitanika ako je  $OR=1,2$ , 2000 ispitanika ako je

OR=1,3, 1000 ispitanika ako je OR=1,5 i manje od 500 ispitanika ako je OR=2 (168).

Jedan od razloga zbog kojih je teško utvrditi potrebnu veličinu uzorka za istraživanje je to što na početku istraživanja ne znamo koji je SNP povezan s fenotipom - prema tome ne znamo koja je frekvencija alela, niti koliko je snažan učinak na fenotip. Zbog toga što ne znamo što tražimo, istraživačima jedino preostaje da se orijentiraju pomoću dosadašnjih rezultata. U praksi je veličina uzorka obično ograničena financijskim mogućnostima projekta (84, 208). U budućim cjelogenomskim asocijacijskim studijama koncentracije kortizola trebalo bi osigurati veći uzorak.

Iz podskupa SNP biljega odabranih prema značajnosti, pronašli smo da se biljeg rs1000772 nalazi u blizini gena za grelin (GHRL), za koji je pak poznato da je uključen u metabolizam kortizola. Iako *p*-vrijednost u asocijacijskoj studiji nije bila statistički značajna, ipak je moguće da je učinak ovog biljega na koncentraciju kortizola stvaran, no da granicu statističke značajnosti nije dostignuta zbog: (a) premalog uzorka, (b) slabog učinka SNP biljega na fenotip, i/ili (c) prestrogo postavljenog kriterija statističke značajnost (197).

Biljeg rs1000772 nalazi se u genu ATP2B2, no razmjerno blizu gena GHRL koji kodira za hormon grelin. Dobro su poznate regulatorne regije neposredno u blizini samoga gena, ali također i regulatorne regije koje su udaljene od gena čiju ekspresiju reguliraju.

Navesti ću jedan dobro dokumentirani i temeljito istražen primjer regulacije ekspresije udaljenim elementima. Intolerancija laktoze je stanje kada pojedinac u odrasloj dobi ne

može metabolizirati laktozu, zbog nedostatka enzima laktaze u tankom crijevu, koji cijepa disaharidni šećer laktozu na glukozu i galaktozu (209). U Hrvatskoj je prevalencija intolerancije laktoze oko 50%, a do ovog stanja dovodi manjak laktaze zbog stišane ekspresije gena (LAC). Ovaj fenotip određen je polimorfizmom rs4988235: osobe genotipa CC su laktoza intolerantne, dok su pojedinci genotipa CT i TT laktoza tolerantni (210, 211). Iako se rs4988235 nalazi u genu MCM6 (engl. minichromosome maintenance 6 gene), te je 13,910 baza udaljen od gena koji kodira za laktazu, polimorfizam se nalazi u regulatornoj regiji LAC gena na mjestu gdje se veže transkripcijski faktor Oct-1, te određuje ekspresiju gena (211, 212).

Grelin se smatra hormonom suprotnog djelovanja od leptina: dok leptin signalizira sitost, grelin potiče osjećaj gladi. Breves i sur. (2009) u nedavno objavljenom istraživanju proučavali su hormon grelin i njegovu povezanost s kortizolom (213). Istraživanje je provedeno na ribi list. Injekcija hormona grelina intraperitonealno povisila je koncentraciju kortizola za preko 50%, nakon sat vremena (injekcija 1000 ng grelina po gramu tjelesne mase). Asakawa i sur. (2001) našli su sličan odgovor u miševa: injekcija grelina povisila je koncentraciju kortikosterona (214). Dodatno, ekspresija GHRL gena bila je pojačana u želucu miševa koji su bili izloženi stresu, te autori sugeriraju mogućnost da grelin ima ulogu medijatora u neuroendokrinom odgovoru na stres (214).

Studija na ljudima potvrdila je da grelin stimulira lučenje glukokortikoida, te je pokazala da grelin izrazito snažno potiče lučenje hormona rasta, čak i više nego sam GHRH (growth hormone releasing hormone) (215). Giordano i sur. (2004) pokazali su

da, unatoč tome što postoji negativna sprega između kortizola i grelina, u oboljelih od Cushingovog sindroma grelin i dalje ima stimulacijski učinak na lučenje kortizola (216). Broglio i sur. (2003) pokazali su da utjecaj grelina na sekreciju kortizola i ACTH nije funkcija dobi i spola (217).

Tek će daljnja istraživanja, u smislu replikacije rezultata u drugim populacijama i funkcionalne studije, omogućiti potpunije razumijevanje učinka polimorfizma rs1000772 i gena GHRL na koncentraciju kortizola u ljudi.

## **5.2. Prednosti i nedostaci istraživanja**

Ovaj rad proveden je u skladu sa smjernicama za istraživanje korelacije heterozigotnosti i fitnesa koje su predložili Szulkin i suradnici (17). Prvo, proučavani fenotip treba biti povezan s fitnessom, a s obzirom na dobro opisanu povezanost kortizola s imunološkim sustavom zaključujemo da je koncentracija kortizola valjan fenotip za istraživanje korelacije heterozigotnosti i fitnesa. Drugo, korištena je standardizirana multilokusna heterozigotnost, što je mjera koju autori smjernica preporučaju.

Prema našem saznanju, ovo je jedno od rijetkih istraživanja u ljudi koje je kvantificiralo uvjete okoliša. Koristili smo stupanj akutno narušenog psihičkog zdravlja, koji kao kontinuirana varijabla opisuje nepovoljan okoliš kojem je pojedinac izložen.

Nadalje, ovo je prvo istraživanje koje proučava ulogu heterozigotnosti kada je izazov okoliša psihološke prirode. Izrazito je zanimljivo opažanje da prednost heterozigotnosti

dolazi do izražaja i kada je „nepovoljan okoliš“ akutni psihološki stres, a ne samo kada se radi o fiziološkim izazovima u smislu ograničenog izvora hrane, obrane od patogena i drugih bolesti.

Veliki broj podataka o navikama i okolišnim faktorima, bolestima i lijekovima, genetičkim biljezima i biokemijskim parametrima omogućio je da se analiziraju mogući čimbenici posredne povezanosti (npr. bilo je moguće identificirati i isključiti ispitanike koji uzimaju kortikosteroide u terapiji), te da se analize standardiziraju na bitne čimbenike. Ipak, ispitanici su bili izrazito heterogeni, što je moglo smanjiti snagu istraživanja.

Iako u literaturi postoje brojna istraživanja korelacije heterozigotnosti i fitnesa, malobrojna su proučavala ovu korelaciju u ljudi. Uzrok dijelom leži u tome što je u većini populacija koje su dostupne istraživačima srođivanje rijetkost, pa tako ispitanici imaju slične vrijednosti multilokusne heterozigotnosti, što oslabljuje snagu statističke analize.

Moguće pogreške ovog rada proizlaze iz činjenice da istraživanje nije planirano prije početka terenskog rada, već je plan istraživanja napravljen naknadno. Ipak, glavne varijable (heterozigotnost, kortizol i akutno narušeno psihičko zdravlje) mjerene su na jednak način i neovisno, bez znanja istraživača o vrijednostima ostalih parametara, pa je mogućnost sistemske pogreške minimalna.

Iako rezultati ovog istraživanja potkrepljuju opaženu korelaciju heterozigotnosti i fitnesa, oni ne pridonose razumijevanju ove korelacije, niti pojašnjavaju mehanizam

kako heterozigotnost utječe na obilježja bitna za fitnes organizma. Nadalje, ova i druge slične studije prikazuju asocijaciju između heterozigotnosti i različitih obilježja, no sa sadašnjim znanjem ne možemo utvrditi je li ova povezanost uzročno-posljedična.

Rezultati ovog istraživanja vrijede za opću populaciju otoka Visa. Prije nego što se zaključak generalizira, statistički značajnu korelaciju heterozigotnosti i kortizolskog odgovora pri akutno narušenom psihičkom zdravlju treba replicirati u drugim populacijama.

### **5.2.1. Pogreške mjerenja**

Koncentracija kortizola je vrlo zahtjevan fenotip za mjerenje. Ispitanicima u našem istraživanju krv je vađena između 8 i 9 sati ujutro, no podaci o tome koliko je to vremena nakon buđenja nisu bili dostupni. Kako se najviše vrijednosti kortizola obično izmjere pola sata do 45 minuta nakon buđenja (218), za očekivati je da nisu svi ispitanici „uhvaćeni“ u trenutku vršnih vrijednosti. Moguće je da su neki ispitanici bili budni duže od 45 minuta prije vađenja krvi, a također je moguće da su neki ispitanici bili budni kraće od 45 minuta. U oba slučaja izmjerena koncentracija je niža od maksimalne dnevne vrijednosti koju se nastoji izmjeriti.

Zanimljivo, istraživanja su pokazala da je razina kortizola ujutro 45 minuta nakon buđenja statistički značajno povezana s psihičkim stanjem mjerenim upitnikom GHQ-30, no ostale razine kortizola izmjerene tokom dana nisu bile povezane s psihičkim zdravljem procijenjenim ovim upitnikom (115). Dakle, kako su jutarnja mjerenja kortizola općenito najsnažnije povezana s blagostanjem i psihičkim zdravljem, čak i ako



kortizol nije mjereno točno 30-45 minuta nakon buđenja (127, 128, 149, 151, 219), vjerujemo da su vrijednosti dobivene za naše ispitanike prikladne za istraživanje.

Dok su u istraživanje uzeti u obzir parametri poput BMI, socio-ekonomskog statusa, navika (pušenje), lijekova te dobi i spola, postoji još mnogo poznatih i nepoznatih čimbenika koji su mogli utjecati na rezultate, a nisu bili prikupljeni. Na primjer, Edwards i sur. (2001) su pokazali da je koncentracija kortizola 45 minuta nakon buđenja (i tokom ostatka dana) povezana s vremenom buđenja (218). Osobe koje se bude najranije imale su više vrijednosti kortizola 45 minuta nakon buđenja i tokom dana (218). Nažalost, podatak o vremenu buđenja nije nam bio dostupan.

Zatim, ispitanici koji su sudjelovali u istraživanju izbačeni su iz svoje uobičajene rutine i stoga možda u blagom stresu. Kako je vrijeme vađenja krvi bilo dogovoreno za 8 ujutro, neke su se osobe trebale probuditi ranije nego inače, a kraće trajanje sna također utječe na razinu kortizola (220). Sam postupak vađenja krvi je također stresan (ponekad je dovoljna i sama pomisao na odlazak kod liječnika), što je moglo biti dovesti do povišenih koncentracija kortizola kod nekih osoba. Smatramo da istraživanje nije kompromitirano te da ne postoji sustavna pogreška, jer su sve osobe bile podvrgnute jednakom tretmanu. S druge strane, ponovljena mjerenja kortizola u iste osobe pokazuju visoku korelaciju, tako da smatramo da su mjerenja dovoljno pouzdana (220).

Iako bi bilo zanimljivo imati podatke o cirkadijanom profilu lučenja, studije su pokazale kako mjerenje dinamike lučenja kortizola tokom dana slabo korelira s blagostanjem i

psihičkim stanjem u usporedbi s izoliranim vrijednostima jutarnjeg kortizola, tako da nedostatak profila cirkadijanog ritma lučenja nije od važnosti za ovo istraživanje (115).

Dok je kortizol dobar pokazatelj tjelesnog odgovora na stres, to ne vrijedi u slučaju kroničnog stresa, kada dolazi do iscrpljivanja kompenzacijskih i drugih mehanizama. Kod pojedinaca pod snažnim kroničnim stresom zabilježeno je svojevrsno otupljivanje (engl. burn-out) pa, iako pod stresom, osobe nemaju povišene vrijednosti jutarnjeg kortizola (126). U naše istraživanje uključeni su zdravi ispitanici iz opće populacije, tako da očekujemo da je udio osoba koje pate od burn-out sindroma mali, te da ne utječe značajno na rezultate istraživanja.

Nezavisno je pitanje odražava li multilokusna heterozigotnost skupa lokusa ukupnu heterozigotnost genoma. Iako se intuitivno očekuje da multilokusna heterozigotnost skupa lokusa vjerno opisuje ukupnu heterozigotnost cijelog genoma, pokazano je da to zapravo nije uvijek slučaj (221). Stoga smo svjesni pretpostavke ovog istraživanja da sMLH služi kao procjena ukupne heterozigotnosti, ali da možda nije u potpunosti korelirana s ukupnom genomskom heterozigotnosti (221).

Da se koristio drugi panel STR biljega moguće je da bi se dobile drugačije vrijednosti multilokusne heterozigotnosti, no vjerujemo da bi utjecaj na rezultate bio beznačajan. Set biljega koji je odabran za ovo istraživanje omogućio je dobru pokrivenost cijelog genoma, te su - proporcionalno svojoj veličini - zastupljeni svi kromosomi (osim spolnih kromosoma). Iako su STR biljezi ravnomjerno raspoređeni po genomu, moguće je da njihov izbor nije idealan za određivanje heterozigotnosti.

STR biljezi odabrani su tako da budu što više polimorfni u populaciji, te su isključeni oni biljezi koji su bili monomorfni (tj. isključeni su svi biljezi koji su biti jednaki kod svih ispitanika). To znači da je heterozigotnost umjetno povećana, no razlike u heterozigotnosti kod ispitanika su ostale jednake.

GHQ-30 upitnik je izrazito dobar alat za procjenu akutno narušenog psihičkog zdravlja u općoj populaciji. Sposobnost upitnika da ispravno ocijeni stupanj akutne narušenosti psihičkog zdravlja može biti smanjena kod osoba koje su kronično fizički ili psihički bolesne, ili pod kroničnim psihičkim stresom, jer upitnik mjeri promjenu od normale i to u zadnja tri do četiri tjedna. U ovom istraživanju sudjelovale su osobe iz opće populacije, pa se s može pretpostaviti da je udio kronično oboljelih mali, te da ne utječe bitno na rezultate istraživanja.

### **5.3. Značenje dobivenih rezultata i smjernice za buduća istraživanja**

Ovo istraživanje nadopunjava postojeće znanje u području koje proučava korelaciju između heterozigotnosti i fitnesa. Prvo, istraživanje je na novom nezavisnom primjeru potvrdilo korelaciju; drugo, slične studije u ljudi su malobrojne pa je time vrijednost ovog istraživanja veća; i treće, mjeri se nepovoljni okoliš, a nepovoljni okoliš predstavlja psihološki stres.

Mogućnost korištenja psiholoških stanja kao čimbenika čiji je učinak dovoljno snažan da bi bio mjerljiv mogao bi biti važan u praksi, jer su nepovoljni uvjeti okoliša (npr.

gladi i opasnosti) u ljudskim populacijama smanjeni, pa je teško stvoriti uvjete koji značajnije izazivaju kompenzacijske mehanizme organizma i stvaraju preuvjete u kojima prednost heterozigota dolazi do izražaja. Razvojem i napretkom ljudskog društva uspješno se smanjuju glad i bolest, brine se o kvalitetnom stanovanju i radu, razvija se infrastruktura itd., te se tako sve većem broju ljudi omogućava dobra kvaliteta života. U isto vrijeme, psihološko zdravlje je poprilično zanemareno te nas ne bi trebalo čuditi ako u budućnosti preostanu upravo psihički čimbenici kao glavni izvor „nepovoljnog okoliša“.

Osim na ljudsko zdravlje, korelacija heterozigotnosti i fitnesa izrazito je važna za očuvanje ugroženih biljnih i životinjskih vrsta. Fitnes je najuže povezan s preživljenjem i reprodukcijom, pa je za programe očuvanja vrsta izrazito bitno razumijevanje utjecaja i očuvanja heterozigotnosti, jer heterozigotnije jedinke imaju veću šansu preživljenja i povećanu plodnost, u usporedbi s jedinkama smanjene heterozigotnosti (38). Buduća istraživanja trebala bi objasniti mehanizam kako povećana heterozigotnost utječe na fitnes. Do tada možemo samo govoriti o statističkoj korelaciji, ali ne i o uzročno-posljedičnoj povezanosti.

Regulacija koncentracije kortizola je složena. Prema ovom istraživanju standardizirana multilokusna heterozigotnost utječe na koncentraciju kortizola i moguće je da je polimorfizam u genu za hormon grelin povezan s koncentracijom kortizola.

Iako je povezanost heterozigotnosti s kortizolom statistički značajna u našem uzorku, bilo bi vrijedno kada bi se ta asocijacija replicirala u drugoj populaciji.

Povezanost polimorfizma u genu za grelin i koncentracije kortizola lako se može biološki objasniti. Ipak, ova povezanost u cjelogenomskoj studiji asocijacije nije dosegla razinu statističke značajnosti. Potrebno je ponoviti analizu na većem uzorku, kako bi se asocijacija potvrdila ili odbacila, te kako bi se identificirali drugi polimorfizmi i drugi geni povezani s koncentracijom kortizola. Vrijednost cjelogenomskih studija asocijacije leži u identifikaciji elemenata (pato)fizioloških putova. Naša studija sugerira hormon grelin kao čimbenik u regulaciji kortizola, a drugi povezani polimorfizmi (ako postoje) mogli bi ukazati na još neke, možda dosad neidentificirane čimbenike.

Stres je poznati rizični čimbenik u etiologiji mnogih bolesti u ljudi. Bolje razumijevanje patofizioloških mehanizama, kao i poznavanje ostalih čimbenika koji su uključeni u taj (pato)fiziološki put ima mogućnost pridonijeti poboljšanju zdravlja u ljudi kroz identifikaciju ključnih čimbenika i ključnih procesa u nastanku bolesti. Bolje razumijevanje patofiziološkog puta može otvoriti i priliku za prevenciju ili farmakološku intervenciju.

Ovo istraživanje ukazalo je na važnu i neosporivu ulogu psihičkih čimbenika na zdravlje, te je zorno pokazalo blisku isprepletenost psihičkih čimbenika (tj. akutno narušenog psihičkog zdravlja) s genetičkim (tj. heterozigotnosti) i biokemijskim čimbenicima (tj. koncentracijom kortizola). Možda zbog toga što su apstraktniji i teže

shvatljivi ljudskom umu, psihički čimbenici često su zanemareni čimbenik u epidemiološkim studijama. Smatramo da je utjecaj akutno narušenog psihičkog zdravlja na koncentraciju kortizola, a koji je modificiran heterozigotnošću dokaz paradigme prema kojoj su psihički, genetički i okolišni čimbenici blisko isprepleteni te zajedno sudjeluju u održavanju zdravlja ili pak nastanku bolesti u ljudi.

## 6. ZAKLJUČAK

Analizom psihičkog zdravlja u populaciji otoka Visa upitnikom GHQ-30 nađena je prevalencija akutno narušenog psihičkog zdravlja od 37% u žena i 18% u muškaraca. Akutno izrazito narušenog psihičkog zdravlja bilo je 6% žena i 3% muškaraca. Dob, spol, socio-ekonomski status i obrazovanje ispitanika statistički su značajno povezani s rezultatom upitnika GHQ-30, dok bračno stanje nije pokazalo značajan utjecaj.

Ukupno je 154 ispitanika imalo koncentraciju kortizola višu od 800 nmol/L. Multivarijatna analiza je pokazala da su dob, BMI, obrazovanje, akutno psihičko stanje i heterozigotnost (sMLH) značajno povezani s koncentracijom kortizola.

Nađeno je da prilikom akutno narušenog psihičkog zdravlja kod osoba smanjene heterozigotnosti dolazi do disregulacije lučenja kortizola, odnosno nalaze se nenormalno povišene vrijednosti kortizola. S druge strane, porast koncentracije kortizola je manji kod osoba povećane heterozigotnosti. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju mogućnost da multilokusna heterozigotnost ima ulogu modifikatora pri lučenju kortizola u odgovoru na akutno narušeno psihičko zdravlje. U skladu s drugim studijama koje se bave analizom korelacije između heterozigotnosti i fitnesa, ovo je istraživanje pokazalo pozitivan utjecaj heterozigotnosti na održanje homeostaze prilikom izloženosti nepovoljnom okolišu, ukazavši na mogućnost da heterozigotnost modificira kortizolski odgovor na akutno narušeno psihičko zdravlje te da tako indirektno povećava fitnes. Prema našem saznanju, po prvi puta je pokazana korelacija

između heterozigotnosti i fitnesa, kada je okolišni stres mjeran i kada je on psihološke prirode.

Cjelogenomskom asocijacijskom studijom nađena je sugestibilna povezanost polimorfizma rs1000772 i (jutarnje) koncentracije kortizola ( $p < 0.00001$ ). Ovaj biljeg nalazi se na kromosomu 3p25.3 u blizini gena GHRL koji kodira hormon grelin. Pregledom literature utvrđeno je kako je grelin uključen u regulaciju sekrecije kortizola, svojim utjecajem na os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Kako bi se potvrdila uzročna povezanost polimorfizma rs1000772 s jutarnjom koncentracijom kortizola, potrebno je napraviti cjelogenomsku analizu na većem uzorku, replicirati rezultate u drugim (genetički drugačijim) populacijama te ako je moguće potvrditi rezultate eksperimentalnom studijom.

Ovo istraživanje je još jedan primjer korelacije heterozigotnosti i fitnesa, iako i dalje ne možemo govoriti o uzročno-posljedičnoj vezi već samo o statističkoj povezanosti. Heterozigotnost se, uz druge genetičke varijable, može smatrati nezavisnim genetičkim čimbenikom koji može utjecati na kvantitativna svojstva ili razvoj bolesti. Pokazana je i povezanost genetičkih i okolišnih faktora s psihičkim čimbenicima čiji se doprinos tek počeo prihvaćati i razumijevati.



## 7. SAŽETAK

**Uvod.** Mnogobrojne su studije pokazale kako heterozigotnost povećava fitnes i to osobito kada je jedinka izložena stresu ili kada su okolišni uvjeti nepovoljni. **Cilj** je ovog istraživanja utvrditi modificira li standardizirana multilokusna heterozigotnost porast jutarnjih vrijednosti kortizola do kojih dolazi u sklopu odgovora na akutno narušenje psihičkog zdravlja. Dodatni je cilj rada napraviti cjelogenomsku asocijacijsku studiju koncentracije kortizola kako bi se identificirali genetički čimbenici koji utječu na koncentraciju kortizola.

**Metode.** Upitnikom su prikupljeni opći podaci i informacije o stilu života za 924 ispitanika s otoka Visa, a upitnikom GHQ-30 ispitano je njihovo psihičko zdravlje. DNK je izolirana iz krvi te je napravljena genotipizacija STR i SNP biljezima. Standardizirana multilokusna heterozigotnost izračunata je iz udjela heterozigotnih STR biljega za svakog ispitanika.

**Rezultati.** Multivarijantnom analizom je pokazano da su dob, BMI, obrazovanje, akutno psihičko stanje i heterozigotnost (sMLH) statistički značajno povezani s koncentracijom kortizola. Viša standardizirana multilokusna heterozigotnost povezana je s nižom koncentracijom kortizola ( $p=0,005$ ). Cjelogenomskom analizom nađena je sugestibilna povezanost polimorfizma rs1000772 i jutarnje koncentracije kortizola ( $p<0.00001$ ). Pregledom baze podataka „Ensembl“ utvrđeno je da se spomenuti SNP nalazi na kromosomu 3p25.3, u blizini gena GHRL. Ovaj gen kodira hormon grelin za koji je pregledom literature nađeno da je uključen u regulaciju lučenja kortizola.

**Zaključak.** Nađeno je da osobe smanjene heterozigotnosti pokazuju veći odklon vrijednosti kortizola od normale (tj. veći porast), dok je poremećaj koncentracije kortizola kod osoba povećane heterozigotnosti manji. Ovi rezultati upućuju na mogućnost da osobe povećane heterozigotnosti imaju bolji kapacitet kompenzacije akutno narušenog psihičkog zdravlja i održanja homeostaze, te posljedično i bolji fitness. Rezultati cjelogenomske asocijacijske studije sugeriraju da polimorfizam rs1000772 modificira ekspresiju gena za grelin te tako utječe na koncentraciju kortizola, no rezultate je potrebno potvrditi dodatnim istraživanjima.

**Ključne riječi:** heterozigotnost, standardizirana multilokusna heterozigotnost, fitness, kortizol, GHQ-30, akutno narušeno psihičko zdravlje, grelin

## 8. SUMMARY

### **The effect of genome heterozygosity on compensation of acute psychological distress**

**Lina Zgaga, 2011**

**Background.** Many studies have shown correlation between heterozygosity and fitness; particularly when organism is exposed to stress or when environmental conditions are detrimental. The **aim** of this study was to investigate if standardized multi-locus heterozygosity is associated to morning cortisol concentration in response to acute psychological distress. Additional aim of the study was to perform genome-wide association study (GWAS) of cortisol, in order to identify genetic factors that affect cortisol concentration.

**Methods.** Custom-made questionnaire was used to collect general and lifestyle information of 924 study participants from the island of Vis. GHQ-30 was used to assess participants' psychological state. DNA was extracted from blood and all samples were genotyped with STR and SNP markers. Standardized multilocus heterozygosity was calculated from the proportion of heterozygous STR markers for each individual.

**Results.** Multivariate analysis has shown statistically significant association of age, BMI, education, psychological distress and heterozygosity to cortisol concentration. Standardized multilocus heterozygosity is inversely associated to morning cortisol concentration ( $p=0.005$ ). Genome-wide association study of cortisol has revealed a suggestive association of rs1000772 to morning cortisol concentration ( $p<0.00001$ ).

Searching the Ensembl database revealed that this SNP marker is located on chromosome 3p25.3 near GHRL. Literature search revealed that this gene codes for hormone ghrelin that is involved in regulation of cortisol secretion.

**Conclusion.** Individuals with lower standardized multi-locus heterozygosity exhibit greater deviation in cortisol concentration following acute psychological distress (higher values), while the deviation from the normal values is smaller in more heterozygous individuals. These results suggest the possibility that more heterozygous individuals have a better ability to compensate psychological distress and better ability to retain homeostasis; hence they may also exhibit better fitness. There is suggestive evidence that SNP rs1000772 affects GHRL gene expression and thereby affects cortisol concentration, but additional studies are required.

**Key words:** heterozygosity, standardized multi-locus heterozygosity, fitness, cortisol, GHQ-30, psychological distress, grelin

## 9. LITERATURA

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, i sur. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
2. Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 2005;437:69-87.
3. Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST. Genetic traces of ancient demography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1961-7.
4. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, i sur. Global variation in copy number in the human genome.
5. Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res* 2001;29:320-2.
6. Yuan B, Vaske D, Weber JL, Beck J, Sheffield VC. Improved set of short-tandem-repeat polymorphisms for screening the human genome. *Am J Hum Genet* 1997;60:459-60.
7. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.
8. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 1992;8:288-94.
9. Lewin B. Chromatin and gene expression: constant questions, but changing answers. *Cell* 1994;79:397-406.
10. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851-861.
11. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001;27:234-6.
12. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-796.
13. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008;118:1590-605.
14. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 2005;15:1592-3.
15. Ridley M. *Evolution*. 3rd ed: Blackwell Science Ltd., 2004.
16. Falconer D, Mackay T. *Introduction to quantitative genetics*. 4. ed: Pearson Education Limited, 1996.
17. Szulkin M, Bierne N, David P. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution* 2010;64:1202-17.
18. Balloux F, Amos W, Coulson T. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Mol Ecol* 2004;13:3021-31.
19. Rudan I, Carothers AD, Polasek O, i sur. Quantifying the increase in average human heterozygosity due to urbanisation. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1097-102.
20. Coltman DW, Bancroft DR, Robertson A, Smith JA, Clutton-Brock TH, Pemberton JM. Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. *Mol Ecol* 1999;8:1199-209.
21. Coltman DW, Slate J. Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. *Evolution* 2003;57:971-83.
22. Kerkeni E, Monastiri K, Saket B, Rudan D, Zgaga L, Ben Cheikh H. Association among education level, occupation status, and consanguinity in Tunisia and Croatia. *Croat Med J* 2006;47:656-61.

23. Campbell H, Carothers AD, Rudan I, i sur. Effects of genome-wide heterozygosity on a range of biomedically relevant human quantitative traits. *Hum Mol Genet* 2007;16:233-41.
24. Lyons EJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hill AV, Amos W. Consanguinity and susceptibility to infectious diseases in humans. *Biol Lett* 2009;5:574-6.
25. Sotak M, Petrejčikova E, Bernasovska J, i sur. Genetic variation analysis of 15 autosomal STR loci in Eastern Slovak Caucasian and Romany (Gypsy) population. *Forensic Sci Int Genet* 2008;3:e21-5.
26. Tariq MA, Ullah O, Riazuddin SA, Riazuddin S. Allele frequency distribution of 13 X-chromosomal STR loci in Pakistani population. *Int J Legal Med* 2008;122:525-8.
27. Easwarkhanth M, Dubey B, Ramakodi Meganathan P, Noor S, Haque I. Microsatellite diversity delineates genetic relationships of Shia and Sunni Muslim populations of Uttar Pradesh, India. *Hum Biol* 2009;81:427-45.
28. Shazia A, Nithya P, Seshadri M. Genetic variation of polymorphic NOS STR locus in ten Indian population groups. *Genetika* 2009;45:271-4.
29. Phillips C, Rodriguez A, Mosquera-Miguel A, i sur. D9S1120, a simple STR with a common Native American-specific allele: forensic optimization, locus characterization and allele frequency studies. *Forensic Sci Int Genet* 2008;3:7-13.
30. Lie HC, Simmons LW, Rhodes G. Does genetic diversity predict health in humans? *PLoS One* 2009;4:e6391.
31. Krithika S, Trivedi R, Kashyap VK, Vasulu TS. Allele frequency distribution at 15 autosomal STR loci in Panggi, Komkar and Padam sub tribes of Adi, a Tibeto-Burman speaking population of Arunachal Pradesh, India. *Leg Med (Tokyo)* 2007;9:210-7.
32. Zhu BF, Shen CM, Wang HD, i sur. Genetic diversities of 21 non-CODIS autosomal STRs of a Chinese Tibetan ethnic minority group in Lhasa. *Int J Legal Med*.
33. Charlesworth D, Willis JH. The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet* 2009;10:783-96.
34. Charlesworth D, Charlesworth B. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences.
35. Bittles AH, Mason WM, Greene J, Rao NA. Reproductive behavior and health in consanguineous marriages. *Science* 1991;252:789-94.
36. Bittles AH, Neel JV. The costs of human inbreeding and their implications for variations at the DNA level. *Nat Genet* 1994;8:117-21.
37. Charlesworth B, Charlesworth D. The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res.* 1999 74:329-40.
38. Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos W. Inbreeding: Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 2003;422:35.
39. Ferreira AG, Amos W. Inbreeding depression and multiple regions showing heterozygote advantage in *Drosophila melanogaster* exposed to stress. *Mol Ecol* 2006;15:3885-93.
40. Barrett SC, Charlesworth D. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 1991;352:522-4.
41. Cornelius PL, Dudley JW. Effects of Inbreeding by Selfing and Full-sib Mating In a Maize Population. *Crop Sci* 1974;14:815-819.
42. McCarthy JC. The effects of inbreeding on the components of litter size in mice. *Genet Res* 1967;10:73-80.

43. White JM. Inbreeding Effects upon Growth and Maternal Ability in Laboratory Mice. *Genetics* 1972;70:307-317.
44. Casellas J, Piedrafita J, Caja G, Varona L. Analysis of founder-specific inbreeding depression on birth weight in Ripollesa lambs. *J Anim Sci* 2009;87:72-9.
45. Rails K, Ballou J. Effects of inbreeding on infant mortality in captive primates. *International Journal of Primatology* 1982;3:491-505.
46. Smith LA, Cassell BG, Pearson RE. The effects of inbreeding on the lifetime performance of dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998;81:2729-37.
47. Rudan I, Rudan D, Campbell H, et al. Inbreeding and risk of late onset complex disease. *J Med Genet* 2003;40:925-32.
48. Darwin GH. Marriages between first cousins in England and their effects. *Int J Epidemiol* 2009;38:1429-39.
49. Neel JV, Schull WJ. The effect of inbreeding on mortality and morbidity in two Japanese cities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:573-82.
50. Schull WJ. Empirical risks in consanguineous marriages: sex ratio, malformation, and viability. *Am J Hum Genet* 1958;10:294-343.
51. Schull WJ, Nagano H, Yamamoto M, Komatsu I. The effects of parental consanguinity and inbreeding in Hirado, Japan. I. Stillbirths and prereproductive mortality. *Am J Hum Genet* 1970;22:239-62.
52. Tanaka K. Genetic studies on inbreeding in some Japanese populations. XI. Effects of inbreeding on mortality in Shizuoka. *Jinrui Idengaku Zasshi* 1973;17:319-31.
53. Bittles AH, Grant JC, Shami SA. Consanguinity as a determinant of reproductive behaviour and mortality in Pakistan. *Int J Epidemiol* 1993;22:463-7.
54. Shami SA, Iqbal I. Consanguineous marriages in the population of Sheikhpura (Punjab), Pakistan. *Biologia* 1983;29:231-44.
55. Scott-Emuakpor AB. The mutation load in an African population. I. An analysis of consanguineous marriages in Nigeria. *Am J Hum Genet* 1974;26:674-82.
56. Rao PS, Inbaraj SG. Inbreeding effects on human reproduction in Tamil Nadu of South India. *Ann Hum Genet* 1977;41:87-98.
57. Bashi J. Effects of inbreeding on cognitive performance. *Nature* 1977;266:440-2.
58. Lutes AA, Neaves WB, Baumann DP, Wiegand W, Baumann P. Sister chromosome pairing maintains heterozygosity in parthenogenetic lizards. *Nature* 2009;464:283-6.
59. Kaye TB, Crapo L. The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1990;112:434-44.
60. Oldfeld EH. Cushing disease. *J Neurosurg* 2003;98:948-51.
61. Vileikyte L. Stress and wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:49-55.
62. Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:61-98.
63. Dunser MW, Hasibeder WR. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med* 2009;24:293-316.
64. Johnson EO, Kostandi M, Moutsopoulos HM. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in Sjogren's syndrome: mechanisms of neuroendocrine and immune system homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:41-51.
65. Truckenmiller ME, Bonneau RH, Norbury CC. Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. *Brain Behav Immun* 2006;20:210-8.

66. Buford TW, Willoughby DS. Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: a brief review. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;33:429-33.
67. Buske-Kirschbaum A. Cortisol responses to stress in allergic children: interaction with the immune response. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:325-32.
68. Rook GA. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999;13:567-81.
69. Vanitallie TB. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism* 2002;51:40-5.
70. Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006;5:523-7.
71. Marques AH, Silverman MN, Sternberg EM. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol. *Neuroimmunomodulation*;17:205-8.
72. Lerner I. *Genetic Homeostasis*.: Edinburgh: Oliver and Boyd, 1954.
73. Govindaraju DR, Larson MG, Yin X, Benjamin EJ, Rao MB, Vasan RS. Association between SNP heterozygosity and quantitative traits in the Framingham Heart Study. *Ann Hum Genet* 2009;73:465-73.
74. Lyons EJ, Amos W, Berkley JA, i sur. Homozygosity and risk of childhood death due to invasive bacterial disease. *BMC Med Genet* 2009;10:55.
75. Rudan I, Biloglav Z, Vorko-Jovic A, i sur. Effects of inbreeding, endogamy, genetic admixture, and outbreeding on human health: a (1001 Dalmatians) study. *Croat Med J* 2006;47:601-10.
76. Rudan I, Campbell H. Five reasons why inbreeding may have considerable effect on post-reproductive human health. *Coll Antropol* 2004;28:943-50.
77. Saftic V, Rudan D, Zgaga L. Mendelian diseases and conditions in Croatian island populations: historic records and new insights. *Croat Med J* 2006;47:543-52.
78. Chapman JR, Nakagawa S, Coltman DW, Slate J, Sheldon BC. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Mol Ecol* 2009;18:2746-65.
79. David P. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* 1998;80:531-7.
80. Allison AC. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1954;48:312-8.
81. Hartl DL, Clark AG. *Principles of population genetics*. 4. ed: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2007.
82. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, i sur. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 2002;359:1311-2.
83. Greaves JH, Redfern R, Ayres PB, Gill JE. Warfarin resistance: a balanced polymorphism in the Norway rat. *Genet Res* 1977;30:257-63.
84. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33:177-82.
85. Pritchard JK, Cox NJ. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Human Molecular Genetics* 2002;11:2417-2423.
86. Noah L. Pharmacogenetics. *N Engl J Med* 2003;348:2041-3.
87. Padriani R, Ferrari M. Pharmacogenetics. *N Engl J Med* 2003;348:2041-3.
88. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*;11:415-25.



89. Heard E, Tishkoff S, Todd JA, i sur. Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading? *Nat Rev Genet*;11:723-33.
90. Najem GR, Seebode JJ, Samady AJ, Feuerman M, Friedman L. Stressful life events and risk of symptomatic kidney stones. *Int J Epidemiol* 1997;26:1017-23.
91. Ranjit N, Diez-Roux AV, Shea S, i sur. Psychosocial factors and inflammation in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arch Intern Med* 2007;167:174-81.
92. Tsikunov SG, Klyueva NN, Kusov AG, Vinogradova TV, Klimenko VM, Denisenko AD. Changes in the lipid composition of blood plasma and liver in rats induced by severe psychic trauma. *Bull Exp Biol Med* 2006;141:636-8.
93. Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Yamaoka M. Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:517-20.
94. Ware WR. Psychological stress, insulin resistance, inflammation and the assessment of heart disease risk. Time for a paradigm shift? *Med Hypotheses* 2008;71:45-52.
95. Zoppo A, Asteria C, Podesta F, Baggi L. Underestimate psychological impact of diet intervention. *Stroke* 2007;38:e65.
96. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005;6:95-108.
97. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4:45-61.
98. Lettre G, Jackson AU, Gieger C, i sur. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet* 2008;40:584-91.
99. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, i sur. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 2010;42:436-40.
100. Vitart V, Rudan I, Hayward C, i sur. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 2008;40:437-42.
101. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, i sur. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008;40:638-45.
102. Demiral Y, Soysal A, Can Bilgin A, i sur. The association of job strain with coronary heart disease and metabolic syndrome in municipal workers in Turkey. *J Occup Health* 2006;48:332-8.
103. Glover DA, Stuber M, Poland RE. Allostatic load in women with and without PTSD symptoms. *Psychiatry* 2006;69:191-203.
104. Centonza L, Castoldi G, Busca G, Stella A, Zanchetti A, Golin R. Behavioural stress blunts the creatinine clearance increase induced by a protein load in healthy subjects. *J Nephrol* 2001;14:403-9.
105. Dressler WW, Balieiro MC, Ribeiro RP, Dos-Santos JE. Depressive symptoms and C-reactive protein in a Brazilian urban community. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1013-9.
106. Persson R, Orbaek P, Kecklund G, Akerstedt T. Impact of an 84-hour workweek on biomarkers for stress, metabolic processes and diurnal rhythm. *Scand J Work Environ Health* 2006;32:349-58.
107. Rief W, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, Pung MA, Dimsdale JE. Overnight changes of immune parameters and catecholamines are associated with mood and stress. *Psychosom Med*;72:755-62.

108. Dekaris D, Sabioncello A, Mazuran R, i sur. Multiple changes of immunologic parameters in prisoners of war. Assessments after release from a camp in Manjaca, Bosnia. *Jama* 1993;270:595-9.
109. Inui A, Kitaoka H, Majima M, i sur. Effect of the Kobe earthquake on stress and glycemic control in patients with diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1998;158:274-8.
110. Violanti JM, Fekedulegn D, Hartley TA, i sur. Police trauma and cardiovascular disease: association between PTSD symptoms and metabolic syndrome. *Int J Emerg Ment Health* 2006;8:227-37.
111. Elliott TR. The action of adrenalin. *J Physiol* 1905;32:401-467.
112. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 1993;28:76-81.
113. Ockenfels MC, Porter L, Smyth J, Kirschbaum C, Hellhammer DH, Stone AA. Effect of chronic stress associated with unemployment on salivary cortisol: overall cortisol levels, diurnal rhythm, and acute stress reactivity. *Psychosom Med* 1995;57:460-7.
114. Smyth J, Ockenfels MC, Porter L, Kirschbaum C, Hellhammer DH, Stone AA. Stressors and mood measured on a momentary basis are associated with salivary cortisol secretion. *Psychoneuroendocrinology* 1998;23:353-70.
115. Evans P, Forte D, Jacobs C, i sur. Cortisol secretory activity in older people in relation to positive and negative well-being. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:922-30.
116. Jacobs N, Myin-Germeys I, Derom C, Delespaul P, van Os J, Nicolson NA. A momentary assessment study of the relationship between affective and adrenocortical stress responses in daily life. *Biol Psychol* 2007;74:60-6.
117. Hanson EK, Maas CJ, Meijman TF, Godaert GL. Cortisol secretion throughout the day, perceptions of the work environment, and negative affect. *Ann Behav Med* 2000;22:316-24.
118. Peeters F, Nicholson NA, Berkhof J. Cortisol responses to daily events in major depressive disorder. *Psychosom Med* 2003;65:836-41.
119. Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:14-22.
120. Gallagher TF, Yoshida K, Roffwarg HD, Fukushima DK, Weitzman ED, Hellman L. ACTH and cortisol secretory patterns in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36:1058-68.
121. Cutolo M, Straub RH. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:277-82.
122. Drouin J, Bilodeau S, Vallette S. Of old and new diseases: genetics of pituitary ACTH excess (Cushing) and deficiency. *Clin Genet* 2007;72:175-82.
123. Labeur M, Theodoropoulou M, Sievers C, i sur. New aspects in the diagnosis and treatment of Cushing disease. *Front Horm Res* 2006;35:169-78.
124. Stratakis CA. Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotropin- independent Cushing syndrome). *Endocr Dev* 2008;13:117-32.
125. Wan WH, Ang BT, Wang E. The Cushing Response: a case for a review of its role as a physiological reflex. *J Clin Neurosci* 2008;15:223-8.
126. Clow A, Thorn L, Evans P, Hucklebridge F. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress* 2004;7:29-37.

127. Ryff CD, Singer BH, Dienberg Love G. Positive health: connecting well-being with biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:1383-94.
128. Steptoe A, Wardle J. Positive affect and biological function in everyday life. *Neurobiol Aging* 2005;26 Suppl 1:108-12.
129. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444-8.
130. Campbell A, Walker J, Farrell G. Confirmatory factor analysis of the GHQ-12: can I see that again? *Aust N Z J Psychiatry* 2003;37:475-83.
131. Tait RJ, French DJ, Hulse GK. Validity and psychometric properties of the General Health Questionnaire-12 in young Australian adolescents. *Aust N Z J Psychiatry* 2003;37:374-81.
132. Whittington J, Huppert FA. Creating invariant subscales of the GHQ-30. *Soc Sci Med* 1998;46:1429-40.
133. Goldberg D, Williams P. A user's guide to the general health questionnaire. London: nferNelson, 2005.
134. Goldberg D. The Detection of Psychiatric Illness by Questionnaire. Oxford University Press., 1972.
135. Goldberg D, Rickels K, Downing R, Hesbacher P. A comparison of two psychiatric screening tests. *Br J Psychiatry*. 1976:61-7.
136. Huppert F, Walters D, Day N, Elliott B. The factor structure of the General Health Questionnaire (GHQ-30). A reliability study on 6317 community residents. *Br J Psychiatry*. 1989 178-85.
137. Goldberg D. The validity of two versions of the GHQ in the WHO study of mental illness in general health care. . *Psychological Medicine* 1997;27.
138. Huppert FA, Walters DE, Day NE, Elliott BJ. The factor structure of the General Health Questionnaire (GHQ-30). A reliability study on 6317 community residents. *Br J Psychiatry* 1989;155:178-85.
139. Firth-Cozens J. Emotional distress in junior house officers. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;295:533-6.
140. Winefield HR, Goldney RD, Winefield AH, Tiggemann M. The General Health Questionnaire: reliability and validity for Australian youth. *Aust N Z J Psychiatry* 1989;23:53-8.
141. Goodchild M, Duncan-Jones P. Chronicity and the General Health Questionnaire. *Br J Psychiatry*. 1985 55-61.
142. Urnes J, Johannessen T, Farup PG, Lydersen S, Petersen H. Digestive symptoms and their psychosocial impact: validation of a questionnaire. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:1019-27.
143. Mosaku KS, Erhabor GE, Morakinyo O. Implications of psychosocial factors as precipitant of asthma attack among a sample of asthmatics. *J Asthma* 2006;43:601-5.
144. Dale B, Saevareid HI, Soderhamn O. Testing and using Goldberg's General Health Questionnaire: Mental health in relation to home nursing, home help, and family care among older, care-dependent individuals. *Int J Ment Health Nurs* 2009;18:133-43.
145. Ukpong DI, Owolabi AT. Postpartum emotional distress: a controlled study of Nigerian women after caesarean childbirth. *J Obstet Gynaecol* 2006;26:127-9.
146. Evans JR, Fletcher AE, Wormald RP. Depression and anxiety in visually impaired older people. *Ophthalmology* 2007;114:283-8.

147. Ng P, Chan KF, Ho WC. A study on mental health of secondary school students in three metropolitan cities in China: Hong Kong, Shanghai, and Beijing. *Int J Adolesc Med Health* 2008;20:53-62.
148. Huppert FA, Whittington JE. Evidence for the independence of positive and negative well-being: implications for quality of life assessment. *Br J Health Psychol* 2003;8:107-22.
149. Steptoe A, O'Donnell K, Badrick E, Kumari M, Marmot M. Neuroendocrine and inflammatory factors associated with positive affect in healthy men and women: the Whitehall II study. *Am J Epidemiol* 2008;167:96-102.
150. Diener E, Emmons RA. The independence of positive and negative affect. *J Pers Soc Psychol* 1984;47:1105-17.
151. Lai JC, Evans PD, Ng SH, i sur. Optimism, positive affectivity, and salivary cortisol. *Br J Health Psychol* 2005;10:467-84.
152. Seeman TE, McEwen BS. Impact of social environment characteristics on neuroendocrine regulation. *Psychosom Med* 1996;58:459-71.
153. Linkowski P, Van Onderbergen A, Kerkhofs M, Bosson D, Mendlewicz J, Van Cauter E. Twin study of the 24-h cortisol profile: evidence for genetic control of the human circadian clock. *Am J Physiol* 1993;264:E173-81.
154. Federenko IS, Nagamine M, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wust S. The heritability of hypothalamus pituitary adrenal axis responses to psychosocial stress is context dependent. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6244-50.
155. Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Hellhammer DH. Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress-further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:199-211.
156. Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, i sur. A psychobiological perspective on genetic determinants of hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1032:52-62.
157. Steptoe A, van Jaarsveld CH, Semmler C, Plomin R, Wardle J. Heritability of daytime cortisol levels and cortisol reactivity in children. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:273-80.
158. Spijker AT, van Rossum EF. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Focus on glucocorticoid sensitivity and neurocognitive functioning. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1179:199-215.
159. Derijk RH. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:340-52.
160. Keavney B, Mayosi B, Gaukrodger N, i sur. Genetic variation at the locus encompassing 11-beta hydroxylase and aldosterone synthase accounts for heritability in cortisol precursor (11-deoxycortisol) urinary metabolite excretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1072-7.
161. Alexander N, Osinsky R, Schmitz A, Mueller E, Kuepper Y, Hennig J. The BDNF Val66Met polymorphism affects HPA-axis reactivity to acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:949-53.
162. Armbruster D, Mueller A, Moser DA, Lesch KP, Brocke B, Kirschbaum C. Interaction effect of D4 dopamine receptor gene and serotonin transporter promoter polymorphism on the cortisol stress response. *Behav Neurosci* 2009;123:1288-95.

163. Nakamura T, Okamura N, Yagi M, i sur. Effects of ABCB1 3435C>T genotype on serum levels of cortisol and aldosterone in women with normal menstrual cycles. *Genet Mol Res* 2009;8:397-403.
164. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
165. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, i sur. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 2010;42:105-16.
166. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, i sur. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447:1087-93.
167. Kurina LM, Weiss LA, Graves SW, i sur. Sex differences in the genetic basis of morning serum cortisol levels: genome-wide screen identifies two novel loci specific to women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4747-52.
168. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;6:109-18.
169. Kudielka BM, Hellhammer DH, Wust S. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:2-18.
170. Kajantie E, Phillips DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:151-78.
171. Navarro P, Vitart V, Hayward C, i sur. Genetic comparison of a Croatian isolate and CEPH European founders. *Genet Epidemiol* 2010;34:140-5.
172. Barac L, Pericic M, Klaric IM, i sur. Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. *Eur J Hum Genet* 2003;11:535-42.
173. Rudan I, Campbell H, Rudan P. Genetic epidemiological studies of eastern Adriatic Island isolates, Croatia: objective and strategies. *Coll Antropol* 1999;23:531-46.
174. Rudan P, Simic D, Smolej-Narancic N, i sur. Isolation by distance in Middle Dalmatia-Yugoslavia. *Am J Phys Anthropol* 1987;74:417-26.
175. Vitart V, Biloglav Z, Hayward C, i sur. 3000 years of solitude: extreme differentiation in the island isolates of Dalmatia, Croatia. *Eur J Hum Genet* 2006;14:478-87.
176. Rudan P, Sujoldzic A, Simic D, Bennett L, Roberts D. Population structure in the Eastern Adriatic: The influence of historical processes, migration patterns, isolation and ecological pressures, and their interaction. In: Roberts DF FN, Torizuka K, ed. *Isolation, Migration and Health*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992:204-218.
177. Smolej Narancic N. Population structure of Middle Dalmatia, Croatia: Analysis of physiological traits. *Homo* 1996;47:283-304.
178. Waddle DM, Sokal RR, Rudan P. Factors affecting population variation in eastern Adriatic isolates (Croatia). *Hum Biol* 1998;70:845-64.
179. Smolej-Narancic N, Rudan I. Endogamy and Variation in Blood Pressure Levels in Croatian Island Isolates. *Journal of PHYSIOLOGICAL ANTHROPOLOGY and Applied Human Science* 2001;20:85-94.
180. Pulanic D, Polasek O, Petroveckii M, i sur. Effects of isolation and inbreeding on human quantitative traits: an example of biochemical markers of hemostasis and inflammation. *Hum Biol* 2008;80:513-33.

181. Aulchenko Y, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid I, Pramstaller P. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009;41:47-55.
182. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson A. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2010;42:105-16. .
183. Heid I, Jackson A, Randall J, i sur. Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat Genet.* 2010;42:949-60. .
184. Köttgen A, Pattaro C, Böger C, Fuchsberger C, Olden M, Glazer N. New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2010;42:376-84.
185. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, i sur. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature.* 2010;467:832-8.
186. Liu J, Tozzi F, Waterworth D, i sur. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet.* 2010;42:436-40. .
187. Speliotes E, Willer C, Berndt S, Monda K, Thorleifsson G, al. E. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet.* 2010;42:937-48.
188. Teslovich T, Musunuru K, Smith A, i sur. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466:707-13.
189. Voight B, Scott L, Steinthorsdottir V, i sur. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010;42:579-89.
190. Repapi E, Sayers I, Wain L, Burton P, Johnson T, Obeidat M. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet.* 2010;42:36-44.
191. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem* 2009;42:1205-17.
192. Vrhovac B, Francetic I, Jaksic B, Labar B, Vucelic B. *Interna medicina: Naklada LJEVAK, 2003.*
193. Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of beta-like globin genes. *Hemoglobin* 1982;6:27-36.
195. Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* 2007;23:1294-6.
196. Jussi S A, Kaisa V, Juha M. Rhh: an R extension for estimating multilocus heterozygosity and heterozygosity correlation. *Molecular Ecology Resources*;10:720-722.
197. Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN. Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genet Epidemiol* 2007;31:358-62.
198. Ensembl. Ensembl Genome Browser.
199. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, i sur. The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update. *Obesity* 2005;13:381-490.
200. Senaris RM, Lago F, Coya R, Pineda J, Dieguez C. Regulation of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing hormone, and growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids. *Endocrinology* 1996;137:5236-5241.

201. Hu H. Chemorepulsion of Neuronal Migration by Slit2 in the Developing Mammalian Forebrain. *Neuron* 1999;23:703-711.
202. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* 2008;132:363-374.
203. Yuan W, Rao Y, Babiuk RP, Greer J, Wu JY, Ornitz DM. A genetic model for a central (septum transversum) congenital diaphragmatic hernia in mice lacking Slit3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5217-5222.
204. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. A polymorphism in the regulatory region of the corticotropin-releasing hormone gene in relation to cortisol secretion, obesity, and gene-gene interaction. *Metabolism* 2001;50:1059-1062.
205. Curnow KM, Mulatero P, Emeric-Blanchouin N, Aupetit-Faisant B, Corvol P, Pascoe L. The amino acid substitutions Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. *Nat Struct Biol* 1997;4:32-5.
206. Bauer AJ, Stratakis CA. The lentiginoses: cutaneous markers of systemic disease and a window to new aspects of tumorigenesis. *Journal of Medical Genetics* 2005;42:801-810.
207. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, i sur. Mutations in the genes encoding 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 2003;34:434-439.
208. de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005;37:1217-23.
209. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005;81:167-73.
210. Enattah NS, Trudeau A, Pimenoff V, i sur. Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *Am J Hum Genet* 2007;81:615-25.
211. Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 2009;124:579-91.
212. Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, i sur. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet* 1995;4:657-62.
213. Breves JP, Veillette PA, Specker JL. Ghrelin in the summer flounder: immunolocalization to the gastric glands and action on plasma cortisol levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2009;152:268-72.
214. Asakawa A, Inui A, Kaga T, i sur. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 2001;74:143-7.
215. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, i sur. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1169-74.
216. Giordano R, Picu A, Broglio F, i sur. Ghrelin, hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and Cushing's syndrome. *Pituitary* 2004;7:243-8.
217. Broglio F, Benso A, Castiglioni C, i sur. The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1537-42.

218. Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:613-22.
219. Steptoe A, Gibson EL, Hamer M, Wardle J. Neuroendocrine and cardiovascular correlates of positive affect measured by ecological momentary assessment and by questionnaire. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:56-64.
220. Wust S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C. The cortisol awakening response - normal values and confounds. *Noise Health* 2000;2:79-88.
221. Chakraborty R. The Distribution of the Number of Heterozygous Loci in an Individual in Natural Populations. *Genetics* 1981;98:461-466.



## 11. ŽIVOTOPIS

Lina Zgaga rođena je 1981. godine u Zagrebu. Pohađala je prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Studij medicine započinje 1999. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, te ubrzo postaje stipendist Grada Zagreba. Tijekom fakulteta bila je tajnik studentske udruge CroMSIC, demonstrator na katedrama za fiziologiju i patofiziologiju te je sudjelovala na nekoliko znanstvenih projekata. Diplomirala je 2005., a stručni ispit za doktora medicine položila je 2006. Kao znanstveni novak počela je raditi u svibnju 2006., a nedugo zatim započinje specijalizaciju iz epidemiologije.

Magistrirala je genetičku epidemiologiju 2009. Sveučilištu u Edinburgu (Škotska, UK). Dobila je „Douglas Falconer“ nagradu za najbolju magistarsku disertaciju. Autorica je 24 znanstvena članaka, te od 2006. redovito sudjeluje i prezentira na kongresima iz humane genetike. Sudjelovala je na tečajevima iz genetičke epidemiologije koji su se održavali na Broad Institutu Harvarda i MIT-a (Boston, USA) i na Sanger Institutu (Cambridge, UK).

## 12. PRILOZI

### Prilog 1. Lista STR biljega, nakon kontrole kvalitete genotipizacije.

#### KROMOSOM 1.

ukupno STR biljega: 62

D1S468	D1S2797	D1S2726	D1S2692
D1S2660	D1S2890	D1S252	D1S245
D1S214	D1S2873	D1S498	D1S425
D1S450	D1S2737	D1S2635	D1S227
D1S2667	D1S2846	D1S484	D1S213
D1S434	D1S230	D1S2878	D1S2833
D1S507	D1S198	D1S196	D1S2709
D1S2697	D1S2841	D1S452	D1S2800
D1S2644	D1S500	D1S218	D1S2850
D1S199	D1S207	D1S2818	D1S2670
D1S2864	D1S2766	D1S238	D1S2785
D1S234	D1S435	D1S2877	D1S304
D1S233	D1S2868	D1S412	D1S2842
D1S255	D1S2793	D1S413	D1S423
D1S2892	D1S206	D1S249	D1S2836
D1S2713	D1S495		

#### KROMOSOM 2.

ukupno STR biljega: 57

D2S323	D2S337	D2S151	D2S2382
D2S319	D2S2368	D2S2241	D2S163
D2S2166	D2S303	D2S142	D2S126
D2S2211	D2S2110	D2S306	D2S133
D2S162	D2S286	D2S2330	D2S2354
D2S168	D2S2333	D2S335	D2S362
D2S149	D2S388	D2S2188	D2S396
D2S305	D2S2216	D2S364	D2S2344
D2S2150	D2S2264	D2S118	D2S206

D2S165	D2S293	D2S117	D2S2202
D2S352	D2S160	D2S2358	D2S338
D2S367	D2S347	D2S325	D2S2285
D2S2163	D2S2271	D2S2321	D2S125
D2S2259	D2S112	D2S2361	D2S140
D2S391			

### **KROMOSOM 3.**

**ukupno STR biljega: 55**

D3S1270	D3S3521	D3S3574	D3S1614
D3S1297	D3S3685	D3S2496	D3S3725
D3S3630	D3S1581	D3S1278	D3S1565
D3S3706	D3S1289	D3S1558	D3S3715
D3S1304	D3S1300	D3S1267	D3S3609
D3S3728	D3S1600	D3S3606	D3S3592
D3S1597	D3S1285	D3S1292	D3S1262
D3S1263	D3S3697	D3S3637	D3S3686
D3S2338	D3S1566	D3S1309	D3S1580
D3S3659	D3S3681	D3S1569	D3S1601
D3S1266	D3S1276	D3S1593	D3S2748
D3S1609	D3S3634	D3S1555	D3S1265
D3S3567	D3S1603	D3S1279	D3S1311
D3S1277	D3S1271	D3S3668	

### **KROMOSOM 4.**

**ukupno STR biljega: 45**

D4S2936	D4S2971	D4S1572	D4S2952
D4S412	D4S428	D4S406	D4S1597
D4S3023	D4S1592	D4S402	D4S1595
D4S2935	D4S398	D4S1615	D4S1539
D4S403	D4S3004	D4S1575	D4S415
D4S419	D4S392	D4S1579	D4S2920
D4S2994	D4S3042	D4S424	D4S1535

D4S3022	D4S2964	D4S1586	D4S2924
D4S391	D4S1534	D4S2962	D4S3051
D4S2912	D4S414	D4S413	D4S426
D4S1587	D4S2986	D4S3046	D4S2930
D4S405			

**KROMOSOM 5.**

**ukupno STR biljega: 41**

D5S1981	D5S418	D5S644	D5S2090
D5S417	D5S1969	D5S495	D5S410
D5S2088	D5S407	D5S433	D5S2049
D5S406	D5S427	D5S2084	D5S422
D5S416	D5S647	D5S2027	D5S2040
D5S2031	D5S424	D5S2055	D5S2050
D5S419	D5S672	D5S471	D5S400
D5S1993	D5S641	D5S2115	D5S1960
D5S674	D5S428	D5S2011	D5S2073
D5S426	D5S618	D5S436	D5S408
D5S2021			

**KROMOSOM 6.**

**ukupno STR biljega: 43**

D6S1617	D6S1610	D6S462	D6S441
D6S1574	D6S1575	D6S300	D6S1577
D6S309	D6S1549	D6S1671	D6S1581
D6S470	D6S282	D6S287	D6S305
D6S1721	D6S1650	D6S262	D6S1599
D6S259	D6S452	D6S1656	D6S1719
D6S289	D6S272	D6S270	D6S264
D6S422	D6S1573	D6S292	D6S1697
D6S1660	D6S257	D6S1569	D6S281
D6S276	D6S460	D6S308	D6S446
D6S291	D6S1609	D6S1654	

**KROMOSOM 7.****ukupno STR biljega: 35**

D7S531	D7S2496	D7S2476	D7S684
D7S517	D7S2252	D7S1870	D7S2513
D7S641	D7S484	D7S669	D7S661
D7S2464	D7S510	D7S630	D7S636
D7S513	D7S691	D7S657	D7S483
D7S664	D7S2427	D7S515	D7S798
D7S2557	D7S519	D7S2459	D7S2465
D7S493	D7S506	D7S530	D7S2423
D7S516	D7S502	D7S640	

**KROMOSOM 8.****ukupno STR biljega: 34**

D8S264	D8S1734	D8S1705	D8S1799
D8S277	D8S1771	D8S275	D8S1720
D8S503	D8S1820	D8S270	D8S284
D8S520	D8S1769	D8S1778	D8S256
D8S550	D8S505	D8S1762	D8S272
D8S552	D8S532	D8S1784	D8S1837
D8S1827	D8S285	D8S1779	D8S1743
D8S549	D8S260	D8S514	D8S1836
D8S258	D8S543		

**KROMOSOM 9.****ukupno STR biljega: 39**

D9S1858	D9S259	D9S1843	D9S289
D9S1779	D9S169	D9S167	D9S1776
D9S288	D9S161	D9S1812	D9S1682
D9S1810	D9S1853	D9S283	D9S290
D9S286	D9S1817	D9S1796	D9S164
D9S168	D9S1874	D9S1781	D9S1818
D9S269	D9S273	D9S287	D9S1826
D9S285	D9S175	D9S1690	D9S158
D9S157	D9S1834	D9S271	D9S1838
D9S171	D9S1674	D9S1677	

**KROMOSOM 10.****ukupno STR biljega: 37**

D10S249	D10S197	D10S210	D10S597
D10S1745	D10S213	D10S537	D10S1693
D10S591	D10S208	D10S580	D10S587
D10S189	D10S1780	D10S1730	D10S1656
D10S1649	D10S578	D10S1686	D10S575
D10S547	D10S196	D10S1765	D10S217
D10S570	D10S1790	D10S185	D10S1655
D10S191	D10S1652	D10S1709	D10S1651
D10S1653	D10S581	D10S192	D10S212
D10S548			

**KROMOSOM 11.****ukupno STR biljega: 35**

D11S4046	D11S904	D11S4207	D11S4127
D11S4146	D11S914	D11S937	D11S925
D11S1760	D11S935	D11S901	D11S4094
D11S1338	D11S4102	D11S4147	D11S4151
D11S4149	D11S905	D11S4175	D11S912
D11S4116	D11S4191	D11S917	D11S4126
D11S902	D11S987	D11S898	D11S1320
D11S4190	D11S4162	D11S4090	D11S968
D11S915	D11S1314	D11S908	

**KROMOSOM 12.****ukupno STR biljega: 35**

D12S352	D12S1617	D12S1708	D12S86
D12S1725	D12S1640	D12S351	D12S304
D12S99	D12S345	D12S346	D12S324
D12S336	D12S1663	D12S78	D12S1675
D12S1697	D12S85	D12S1613	D12S1659
D12S358	D12S368	D12S1583	D12S367
D12S364	D12S83	D12S1646	D12S1723
D12S310	D12S313	D12S79	D12S1638
D12S1682	D12S326	D12S1718	

**KROMOSOM 13.****ukupno STR biljega: 25**

D13S1236	D13S219	D13S156	D13S158
D13S175	D13S218	D13S1306	D13S1322
D13S1243	D13S263	D13S170	D13S173
D13S1304	D13S153	D13S265	D13S1265
D13S217	D13S1320	D13S1241	D13S285
D13S289	D13S1296	D13S159	D13S293
D13S171			

**KROMOSOM 14.****ukupno STR biljega: 27**

D14S261	D14S70	D14S258	D14S1050
D14S1023	D14S75	D14S1036	D14S1054
D14S283	D14S288	D14S74	D14S65
D14S990	D14S276	D14S1037	D14S985
D14S972	D14S980	D14S68	D14S292
D14S275	D14S274	D14S1044	D14S1007
D14S1040	D14S63	D14S280	

**KROMOSOM 15.****ukupno STR biljega: 26**

D15S128	D15S1040	D15S1033	D15S979
D15S986	D15S118	D15S1036	D15S127
D15S975	D15S1012	D15S153	D15S130
D15S1002	D15S994	D15S988	D15S1014
D15S1019	D15S978	D15S131	D15S212
D15S165	D15S1016	D15S205	D15S120
D15S1007	D15S117		

**KROMOSOM 16.****ukupno STR biljega: 29**

D16S521	D16S3103	D16S3034	D16S515
D16S3027	D16S3041	D16S415	D16S3049
D16S423	D16S3046	D16S3140	D16S516
D16S418	D16S403	D16S3057	D16S3040
D16S404	D16S3100	D16S514	D16S505
D16S3075	D16S3068	D16S503	D16S3091
D16S3102	D16S3136	D16S3066	D16S520
D16S500			

**KROMOSOM 17.****ukupno STR biljega: 27**

D17S849	D17S799	D17S1795	D17S1807
D17S831	D17S921	D17S787	D17S785
D17S1828	D17S1857	D17S957	D17S1847
D17S1876	D17S1824	D17S944	D17S836
D17S938	D17S798	D17S1816	D17S784
D17S1791	D17S927	D17S949	D17S928
D17S1852	D17S1868	D17S1862	

**KROMOSOM 18.****ukupno STR biljega: 25**

D18S59	D18S453	D18S474	D18S465
D18S476	D18S1107	D18S1127	D18S61
D18S1132	D18S478	D18S1129	D18S469
D18S452	D18S1102	D18S64	D18S1161
D18S464	D18S468	D18S1147	D18S462
D18S1150	D18S450	D18S68	D18S70
D18S53			



**KROMOSOM 19.****ukupno STR biljega: 21**

D19S886	D19S226	D19S420	D19S888
D19S209	D19S566	D19S903	D19S921
D19S894	D19S931	D19S902	D19S572
D19S216	D19S414	D19S904	D19S418
D19S884	D19S220	D19S571	D19S210
D19S221			

**KROMOSOM 20.****ukupno STR biljega: 24**

D20S117	D20S851	D20S195	D20S887
D20S906	D20S186	D20S107	D20S196
D20S842	D20S898	D20S861	D20S902
D20S889	D20S112	D20S119	D20S100
D20S882	D20S912	D20S891	D20S171
D20S115	D20S871	D20S178	D20S173

**KROMOSOM 21.****ukupno STR biljega: 11**

D21S1911	D21S1922	D21S263	D21S1255
D21S1904	D21S1884	D21S1252	D21S266
D21S1899	D21S1914	D21S1919	

**KROMOSOM 22.****ukupno STR biljega: 13**

D22S420	D22S1154	D22S277	D22S274
D22S539	D22S1163	D22S283	D22S1170
D22S1174	D22S280	D22S423	D22S1169
D22S315			



## STANDARDNI ANKETNI UPITNIK ZA TERENSKA ISTRAZIVANJA

### I. PODACI O RODOSLOVLJU

**1. PREZIME:**

\_\_\_\_\_

**2. IME:**

\_\_\_\_\_

**3. DATUM ROĐENJA:**

\_\_\_\_\_

**4. OTAC:**

(4a) Ime i prezime oca:

\_\_\_\_\_

(4b) Godina rođenja oca:

\_\_\_\_\_

(4c) Mjesto rođenja oca:

\_\_\_\_\_

(4d) Ime i prezime djeda (očevog oca):

\_\_\_\_\_

(4e) Godina rođenja djeda (očevog oca):

\_\_\_\_\_

(4f) Mjesto rođenja djeda (očevog oca):

\_\_\_\_\_

(4g) Ime i djevojačko prezime bake (očeve majke):

\_\_\_\_\_

(4h) Godina rođenja bake (očeve majke):

\_\_\_\_\_

(4i) Mjesto rođenja bake (očeve majke):

\_\_\_\_\_

**5. MAJKA:**

(5a) Ime i djevojačko prezime majke:

\_\_\_\_\_

(5b) Godina rođenja majke:

\_\_\_\_\_

(5c) Mjesto rođenja majke:

\_\_\_\_\_

(5d) Ime i prezime djeda (majčinog oca):

\_\_\_\_\_

(5e) Godina rođenja djeda (majčinog oca):

\_\_\_\_\_

(5f) Mjesto rođenja djeda (majčinog oca):

\_\_\_\_\_

(5g) Ime i djevojačko prezime bake (majčine majke)

\_\_\_\_\_

(5h) Godina rođenja bake (majčine majke):

\_\_\_\_\_

(5i) Mjesto rođenja bake (majčine majke):

\_\_\_\_\_

**6. REDOSLIJED ROĐENJA (KOJE STE PO REDU DIJETE):** \_\_\_\_\_

**7. BROJ BRAĆE I SESTARA (NE UKLJUČUJUĆI ISPITANIKA):**

(7a) Živih \_\_\_\_\_

(7b) Umrlih \_\_\_\_\_

**8. BROJ DOSADAŠNJIH BRAKOVA:** \_\_\_\_\_

**9. IME I (DJEVOJAČKO) PREZIME BRAČNOG DRUGA, MJESTO  
ILI GODINA ROĐENJA (navesti i: neoženjen / oženjen / rastavljen / udovac):**

\_\_\_\_\_

**10. DOB PRI SKLAPANJU BRAKA:**

(10a) Ispitanika \_\_\_\_\_

(10b) Bračnog partnera \_\_\_\_\_

**11. BROJ DJECE:** \_\_\_\_\_

**12. IME I PREZIME DJECE, GODINA ROĐENJA, IME I PREZIME NJIHOVOG  
BRAČNOG DRUGA, GODINA I MJESTO ROĐENJA:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**13. IME I PREZIME BRAĆE I SESTARA ISPITANIKA, GODINA ROĐENJA, IME I  
PREZIME NJIHOVOG BRAČNOG DRUGA, GODINA I MJESTO ROĐENJA:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## II. ANTROPOMETRIJA, IMPEDANCIJA I KRVNI TLAK

14. VISINA TIJELA \_\_\_\_\_ mm
15. BIKONDILARNA ŠIRINA NADLAKTICE \_\_\_\_\_ mm
16. OPSEG TRBUHA \_\_\_\_\_ mm
17. OPSEG KUKOVA \_\_\_\_\_ mm
18. OPSEG NADLAKTICE \_\_\_\_\_ mm
19. KOŽNI NABOR
- (19a) Biceps \_\_\_\_\_ mm x 10<sup>-1</sup>
- (19b) Triceps \_\_\_\_\_ mm x 10<sup>-1</sup>
- (19c) Subskapularni \_\_\_\_\_ mm x 10<sup>-1</sup>
- (19d) Suprailijačni ma. \_\_\_\_\_ mm x 10<sup>-1</sup>
- (19e) Trbuha \_\_\_\_\_ mm x 10<sup>-1</sup>
20. TEŽINA TIJELA \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ kg
21. DOMINANTNA RUKA:
- (1) Lijeva (2) Desna \_\_\_\_\_
22. IMPEDANCIJA:
- (22a) Rezistencija (Rx) \_\_\_\_\_ Ω
- (22b) Reaktancija (Xc) \_\_\_\_\_ Ω
23. KRVNI TLAK U MIROVANJU:
1. mjerenje
- (23a) Sistolički \_\_\_\_\_ mmHg
- (23b) Dijastolički \_\_\_\_\_ mmHg
2. mjerenje
- (23c) Sistolički \_\_\_\_\_ mmHg
- (23d) Dijastolički \_\_\_\_\_ mmHg

### III. OPĆI ZDRAVSTVENI PODACI

24. Datum anketiranja: \_\_\_\_\_

25. Anketar: \_\_\_\_\_

26. Ime i prezime ispitanika: \_\_\_\_\_

27. Spol ispitanika: \_\_\_\_\_

28. Mjesto rođenja: \_\_\_\_\_

29. Broj medicinskog kartona: \_\_\_\_\_

30. Liječnik: \_\_\_\_\_

31. Adresa ispitanika: \_\_\_\_\_

32. Zanimanje ispitanika: \_\_\_\_\_

Da li Vi osobno imate neku od ovih bolesti:

	(a) Da/Ne	(b)God. Dg.	(c) Uzima lijekove:
33. Povišen krvni tlak:	_____	_____	_____
34. Koronarnu bolest srca:	_____	_____	_____
35. Moždani udar:	_____	_____	_____
36. Shizofreniju:	_____	_____	_____
37. Maniju / depresiju:	_____	_____	_____
38. Zloćudni tumor:	_____	_____	_____
39. Šećernu bolest:	_____	_____	_____
40. Giht:	_____	_____	_____
41. Glaukom:	_____	_____	_____
42. Upalu zglobova:	_____	_____	_____
43. Bubrežnu bolest:	_____	_____	_____
44. Ulkusnu bolest (čir):	_____	_____	_____

45. Ostale bolesti (na koje se tuži ispitanik):

\_\_\_\_\_

46. Ostali lijekovi koje uzima (za dijabetes precizirati: dijeta / biljni / oralni / injekc. inzulin):

\_\_\_\_\_

**47. Jeste li ikada liječeni u bolnici i zbog čega? (navesti redoslijed i eventualne operacije):**

---

---

---

---

---

---

---

**48. Bila kakva druga zapažanja anketara (npr. usporen, nekomunikativan, upadljiv, nagluh, nesuradljiv, tikovi, neobičan naglasak, i sl.): (MOGUĆE POPUNITI I NA KRAJU ANKETIRANJA)**

---

---

---

---

---

---

---

#### IV. ANKETNI UPITNIK WHO ZA ANGINU PECTORIS

**49. Da li ikada osjećate bol ili nelagodu u prsištu?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

*(ako je odgovor "ne", prijeći na pitanje broj 56)*

**50. Da li se ta bol ili nelagoda pojavljuje kada hodate uz brijeg ili žurite?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

*(ako je odgovor "ne", prijeći na pitanje broj 56)*

**51. Da li se bol pojavljuje i kada hodate normalnim ritmom na ravnoj površini?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**52. Što činite kada osjetite pojavu boli ili nelagode u prsištu?** \_\_\_\_\_

(1) Stanete na mjestu (2) Usporite hod (3) Nastavite hodati u istom ritmu

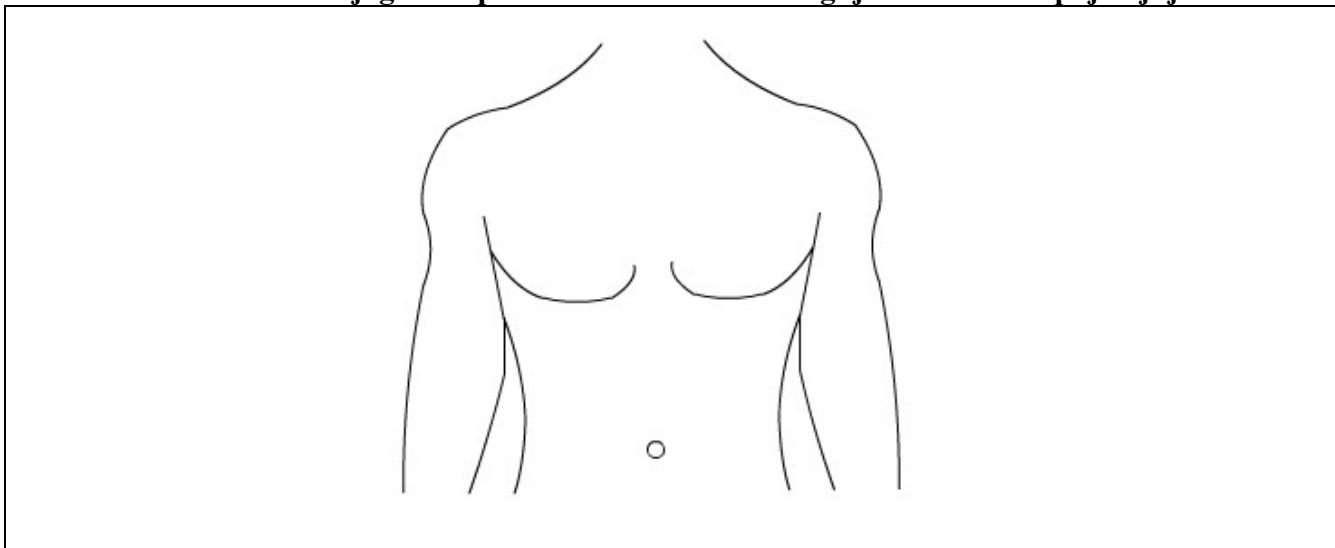
**53. Da li bol ili nelagoda prođu kada stanete u mjestu ili sjednete?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**54. Ako da, nakon koliko vremena?** \_\_\_\_\_

(1) Više od 10 minuta (2) 10 minuta ili manje

**55. Možete li na ovom dijagramu prsišta označiti križićem gdje se bol točno pojavljuje?**



**56. Jeste li ikada imali izrazitu bol preko cijelog prednjeg dijela prsišta koja je trajala dulje od pola sata?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**57. Što je bio uzrok tome?**

---

## V. ANKETNI UPITNIK WHO ZA KLAUDIKACIJU

**58. Da li ikada tijekom hoda osjetite bol u jednoj ili obje noge?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

*(ako je odgovor "ne", prijeći na pitanje broj 65)*

**59. Da li ova bol ikada započinje dok stojite na mjestu ili sjedite?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**60. Da li ikada osjećate bol u listu (listovima) noge?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**61. Da li ikada osjećate bol dok hodate normalnim ritmom?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**62. Da li bol ikada prestane dok hodate?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**63. Što činite ako osjetite pojavu boli tijekom hoda?** \_\_\_\_\_

(1) Stanete na mjestu (2) Usporite hod (3) Nastavite hodati u istom ritmu

**64. Što se dogodi kada stanete u mjestu?** \_\_\_\_\_

(1) obično potraje dulje od 10 minuta (2) obično prođe za deset minuta ili manje

**65. Jeste li ikada imali operaciju na arterijama ili živcima vaših nogu, uz iznimku varikoziteta (proširenih vena)?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**66. Ako jeste, koji je bio razlog:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**67. Jeste li ikada imali operaciju kojom vam je odstranjen:**

(67a) Nožni prst (ili više njih) \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

(67b) Dio noge ispod koljena \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

(67c) Dio noge iznad koljena \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne



## VI. ANKETNI UPITNIK EU O RESPIRATORNOM ZDRAVLJU

- 68. Jeste li tijekom proteklih 12 mjeseci ikada imali "teško disanje" ili zviždanje u prsnom košu?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne  
*(ako je odgovor "ne", prijeći na pitanje broj 71)*
- 69. Jeste li ostajali bez daha kada biste čuli zviždanje?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 70. Jeste li imali "teško disanje" ili zviždanje i dok niste imali prehladu, ili drugu upalu dišnih puteva?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 71. Jeste li se tijekom proteklih 12 mjeseci ikada probudili s osjećajem da su vam dišni putovi "suženi"?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 72. Jeste li se tijekom proteklih 12 mjeseci ikada probudili zbog osjećaja da ste ostali bez daha?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 73. Jeste li se tijekom proteklih 12 mjeseci ikada probudili zbog napadaja kašlja?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 74. Jeste li tijekom proteklih 12 mjeseci doživjeli napadaj astme?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 75. Da li trenutno uzimate bilo kakav lijek protiv astme (uključujući inhalatore, aerosole ili tablete)?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 76. Imate li bilo kakve alergije gornjih dišnih putova ili peludnu groznicu?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 77. Da li kašljete 3 mjeseca u godini?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 78. Da li iskašljavate 3 mjeseca u godini?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 79. Da li kašljete i/ili iskašljavate više od 2 godine?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne
- 80. Da li ste preboljeli neku bolest pluća ili upalu porebrice?** \_\_\_\_\_  
(1) Da (2) Ne

## VII. ANKETNI UPITNIK WHO O ŠEĆERNOJ BOLESTI I DRUGIM KNB

**81. Da li pušite duhan?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne (3) Bivši pušač

**82. Ako pušite, da li su to:** \_\_\_\_\_

(1) Cigarete (2) Lula (3) Cigare

**83. Koliko ih popušite dnevno?** \_\_\_\_\_

**84. Tijekom koliko godina?** \_\_\_\_\_

**85. Ako trenutno niste pušač, jeste li ikada pušili?** \_\_\_\_\_

(1) Da (2) Ne

**86. Ako ste bivši pušač:**

(86a) koliko ste godina bili pušač? \_\_\_\_\_

(86b) koliko ste pušili dnevno? \_\_\_\_\_

(86c) prije koliko godina ste prestali pušiti? \_\_\_\_\_

**87. Koliko tjedno jedinica alkohola konzumirate? (odgovoriti se može i opisno)**

---

**88. Tjelesna aktivnost tijekom svakodnevnog rada:** \_\_\_\_\_

(1) sjedeća (2) laka (3) umjerena (4) teška

**89. Tjelesna aktivnost tijekom preostalog dijela dana:** \_\_\_\_\_

(1) sjedeća (2) laka (3) umjerena (4) teška

**90. Upitnik za žene:**

(90a) Dob menarhe: \_\_\_\_\_

(90b) Imate li još uvijek redovite menstruacije? \_\_\_\_\_

(90c) Ako nemate, u kojoj su dobi prestale? \_\_\_\_\_

(90d) Koliko ste djece rodili? \_\_\_\_\_

(90e) Jeste li imali mrtvorodenčad i koliko puta? \_\_\_\_\_

(90f) Koliko ste imali spontanih pobačaja? \_\_\_\_\_

(90g) Koliko ste imali kirurški učinjenih pobačaja? \_\_\_\_\_

## VIII. POKAZATELJI SOCIO-EKONOMSKOG STATUSA

**91. Koliko imate završenih razreda škole?** \_\_\_\_\_

**92. Kakav je Vaš radni status?** \_\_\_\_\_

- (1) zaposlen
- (2) samostalno zaposlen
- (3) nezaposlen
- (4) umirovljenik
- (5) domaćica
- (6) student
- (7) uzdržavana osoba
- (8) drugo, molimo Vas, navedite поближе \_\_\_\_\_

**93. Kako biste procjenili svoje materijalno stanje, odnosno materijalno stanje Vaše obitelji?** \_\_\_\_\_

- (1) Mnogo je lošije od drugih (prosjeaka)
- (2) Nešto je lošije od drugih
- (3) Isto je kao kod drugih
- (4) Nešto je bolje od drugih
- (5) Mnogo je bolje od drugih

**94. Koliki je broj soba u stanu/kući gdje živite (uključujući i dnevni boravak)?** \_\_\_\_\_

**95. Da li u stanu ili kući gdje živite imate (navedite sve što imate)?** **Skor:** \_\_\_\_\_

vodovod	1	dva TV	1
WC s ispiranjem	1	stroj za pranje suđa	1
kupaonicu	1	kompjuter	1
centralno ili plinsko grijanje	1	biblioteku (više od 100 knjiga)	1
drvene podove	1	umjetničke slike/predmete	1
telefon	1	automobil	1
videorekorder	1	vikendicu/drugi stan	1
škrinja za zamrzavanje	1	brod	1

## IX. ANKETNI UPITNIK O PREHRAMBENIM NAVIKAMA

**96. Hranite li se:** \_\_\_\_\_

(1) isključivo u vlastitom domu (2) u restoranima društvene prehrane (3) kombinirano

**97. Koliko najčešće obroka dnevno jedete:** \_\_\_\_\_

(1) jedan (2) dva (3) tri (4) četiri (5) pet i više

**98. Da li redovito doručkujete?** \_\_\_\_\_

(1) da (2) ne

**99. Ako preskačete obroke, navedite koje:**

	(1) uvijek	(2) ponekad	(3) nikada
(99a) zajutrak	_____	_____	_____
(99b) doručak	_____	_____	_____
(99c) ručak	_____	_____	_____
(99d) užina	_____	_____	_____
(99e) večera	_____	_____	_____

**100. Koje vrste masnoće pri pripremanju obroka najčešće koristite?**

	(1) uvijek	(2) ponekad	(3) nikada
(100a) biljna ulja (suncokretovo, bučino i sl.)	_____	_____	_____
(100b) maslinovo ulje	_____	_____	_____
(100c) maslac	_____	_____	_____
(100d) svinjsku mast ili drugu životinjsku masnoću	_____	_____	_____
(100e) uopće ne upotrebljavam masnoće	_____	_____	_____

**101. Kod pripremanja obroka, povrće najčešće:** \_\_\_\_\_

(1) kuhate (2) pirjate (dinstano) (3) pržite (4) pečete

**102. Uzimate li svaki dan svježe pripremljene obroke?** \_\_\_\_\_

(1) da (2) ne

**103. Koliko često upotrebljavate smrznuto povrće za pripremu obroka?** \_\_\_\_\_

(1) svakodnevno (2) ponekad (3) nikada

**104. Koliko često pripremate smrznuto meso za pripremu obroka?** \_\_\_\_\_

(1) svakodnevno (2) ponekad (3) nikada

**105. Kako često konzumirate "fast food"?** \_\_\_\_\_

(1) svakodnevno (2) 2-3 puta tjedno (3) 1 puta tjedno (4) rijetko

**106. Koliko dnevno pijete tekućine (pitku vodu, mineralnu i gaziranu vodu, čaj, kava, juha i sl.)?** \_\_\_\_\_  
(1) manje od 1 litre (2) između 1 i 2 litre (3) više od 2 litre

**107. Koliko šećera dnevno uzimate (za kavu, bijelu kavu, čaj, pri pripremi sokova)?** \_\_\_\_\_  
(1) jednu žličicu (2) jednu žlicu (3) više od 1 žlice

**108. Jeste li na dijeti?** \_\_\_\_\_  
(1) ne (2) stalno (3) trenutno (4) ponekad

**109. Ako ste na dijeti, navedite razlog:** \_\_\_\_\_  
(1) zdravstveni (2) osobni

**110. Ako ste na dijeti, navedite kojoj:** \_\_\_\_\_  
(1) za mršavljenje (2) radi dijabetesa (3) radi srca ili tlaka (4) radi problema s jetrom  
(5) radi gastritisa ili čira (6) bubrežni problemi (7) zbog drugih zdravstvenih problema

**111. Jeste li vegetarijanac:** \_\_\_\_\_  
(1) da (2) ne

**112. Uzimate li dodatno vitamine?** \_\_\_\_\_  
(1) svakodnevno (2) ponekad (3) nikada

**113. Ako uzimate dodatno vitamine, navedite koje:**

	(1) DA	(2) NE
(113a) A	_____	_____
(113b) B-kompleks	_____	_____
(113c) C	_____	_____
(113d) D	_____	_____
(113e) E	_____	_____
(113f) Multivitamini	_____	_____

**114. Uzimate li dodatno minerale?**

	(1) svaki dan	(2) ponekad	(3) nikada
(114a) zajutak	_____	_____	_____
(114b) doručak	_____	_____	_____
(114c) ručak	_____	_____	_____
(114d) užina	_____	_____	_____
(114e) večera	_____	_____	_____

**115. Ako uzimate dodatno minerale, navedite koje:**

	(1) DA	(2) NE
(115a) kalcij	_____	_____
(115b) magnezij	_____	_____
(115c) željezo	_____	_____
(115d) ostalo	_____	_____

**116. Ako ste zaposleni, kako odlazite na posao?**

(a) pješke (b) biciklom/motorom (c) javnim prijevozom (d) automobilom

**117. Bavite li se sportom (vježbanjem)?**

(a) ne (b) rekreativno (c) aktivno

**118. Ako vježbate, koliko često?**

(a) svakodnevno (b) 2-3 puta tjedno (c) jednom tjedno (d) ponekad

**119. Koliko sati dnevno vježbate?**

(a) manje od 1 sata (b) 1-2 sata (c) više od 2 sata

**120-143. Upitnik o učestalosti konzumiranja pojedinih vrsta prehrambenih namirnica ("food frequency questionnaire"):**

NAMIRNICE	(1) Svaki dan	(2) 2-3 x tjedno	(3) 1 x tjedno	(4) Rijetko	(5) Nikada
<b>MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI</b>					
120. Mlijeko					
121. Jogurt, AB kultura, kefir					
122. Vrhnje					
123. Sir - svježi					
124. Sir - topljeni					
125. Sir - tvrdi					
<b>MESO I MESNE PRERADEVINE</b>					
126. Svinjetina					
127. Govedina					
128. Teletina					
129. Janjetina					
<b>ORGANI I IZNUTRICE</b>					
130. Jetra, mozak, pluća itd.					
<b>MESNE PRERADEVINE</b>					
131. Slanina, čvarci					
132. Hrenovke, kobasice					
133. Salame					
134. Mesne konzerve (pašteta, ragu)					
<b>DIVLJAČ</b>					
135. Zec, vepar, smetina itd.					
<b>PERAD</b>					
136. Piletina					
137. Patka, puretina					
<b>RIBE I RIBLJE PRERADEVINE</b>					
138. Bijela riba					
139. Plava riba					
140. "Plodovi mora" (školjke, rakovi i sl.)					
141. Lignje, hobotnica					
142. Sušena riba, slane srdele					

143. Riblje prerađevine					
-------------------------	--	--	--	--	--

**144-175. Upitnik o učestalosti konzumiranja pojedinih vrsta prehrambenih namirnica ("food frequency questionnaire"):**

<b>JAJA</b>					
144. Jaja					
<b>POVRĆE</b>					
145. Lisnato (salata, kelj, špinat, blitva)					
146. Korjenasto (mrkva, cikla, mladi luk)					
147. Cvjetasto (brokula, cvjetača)					
148. Plodasto (patlidžan, rajčica)					
149. Leguminoze (grah, grašak, soja, bob)					
150. Konzervirano i ukiseljeno povrće					
151. Krumpir					
152. Gljive					
<b>VOĆE I PROIZVODI</b>					
153. Svježe voće					
154. Orasi i orašasti proizvodi					
155. Voćni kompoti					
156. Sušeno voće					
<b>ŽITARICE I ŽITNI PROIZVODI</b>					
157. Bijeli kruh i peciva					
158. Integralni kruh i peciva					
159. Muesli i sl.					
160. Tjestenina i riža					
161. Kolači					
<b>KONDITORSKI PROIZVODI</b>					
162. Čokolada					
163. Keksi					
164. Bomboni					
165. Džem, marmelada, žele, puding					
<b>INDUSTRIJSKI PROIZVODI</b>					
166. Industrijske (koncentrirane) juhe					
<b>PIĆA I NAPICI</b>					
167. Sokovi od povrća					
168. Voćni sokovi i sirupi					
169. Cedevita					
170. Osvježavajuća bezalkoholna pića					
171. Pivo					
172. Vino					
173. Žestoka alkoholna pića					
174. Kava					
175. Čaj					

## X. UPITNIK O OPĆEM ZDRAVSTVENOM STANJU – “GHQ-30”

**176. Jeste li u posljednje vrijeme bili u stanju koncentrirati se na ono što radite?** \_\_\_\_\_

(1) Bolje nego inače (2) Isto kao inače (3) Manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**177. Jeste li u posljednje vrijeme imali problema sa spavanjem zbog briga?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**178. Jeste li u posljednje vrijeme imali nemirne noći, tijekom kojih ste se često budili?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**179. Jeste li u posljednje vrijeme uspijevali održati se zaposlenim i punim posla?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Nešto manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**180. Jeste li u posljednje vrijeme izlazili iz kuće jednako često kao inače?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Nešto manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**181. Je li vam u posljednje vrijeme išlo jednako kao i većini drugih ljudi u vašoj situaciji?** \_\_\_\_\_

(1) Bolje nego većini njih (2) Otprilike isto kao i drugima (3) Nešto lošije (4) Znatno lošije

**182. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali da sve u svemu dobro činite to što činite?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Nešto lošije nego inače (4) Znatno lošije

**183. Jeste li u posljednje vrijeme bili zadovoljni načinom na koji ste izvršavali svoje zadatke?**

(1) Više zadovoljan (2) Otprilike isto kao inače (3) Manje zadovoljan no inače (4) Znatno manje

**184. Jeste li u posljednje vrijeme bili u mogućnosti osjećati toplinu i naklonost za ljude oko sebe?** \_\_\_\_\_

(1) Bolje nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Lošije nego inače (4) Znatno lošije no inače

**185. Je li vam u posljednje vrijeme bilo lako slagati se s drugim ljudima?** \_\_\_\_\_

(1) Lakše nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Teže nego inače (4) Znatno teže nego inače

**186. Jeste li u posljednje vrijeme proveli mnogo vremena u neobaveznom razgovoru s drugim ljudima?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Manje vremena nego inače (4) Mnogo manje



**187. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali da imate korisnu ulogu u stvarima koje se zbivaju?**

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Manje korisnu nego inače (4) Mnogo manje korisnu

**188. Jeste li se u posljednje vrijeme osjećali sposobnim donositi odluke u vezi stvari koje se zbivaju?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Lošije nego inače (4) Mnogo lošije sposoban

**189. Jeste li se u posljednje vrijeme stalno osjećali ograničeno?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**190. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali kako ne možete prevladati vaše poteškoće?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**191. Je li vam se u posljednje vrijeme činilo da je život naporna borba čitavo vrijeme?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**192. Jeste li u posljednje vrijeme bili sposobni uživati u vašim normalnim svakodnevnim aktivnostima?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**193. Jeste li u posljednje vrijeme primali događaje teška srca?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**194. Jeste li u posljednje vrijeme postajali uplašeni ili panični bez valjanog razloga?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**195. Jeste li u posljednje vrijeme bili sposobni suočiti se sa svojim problemima?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Isto kao inače (3) Manje sposoban no inače (4) Znatno manje sposoban

**196. Da li vam se u posljednje vrijeme čini da vas sve opterećuje?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**197. Jeste li se u posljednje vrijeme osjećali nesretno i depresivno?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**198. Jeste li u posljednje vrijeme gubili samopouzdanje?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**199. Jeste li u posljednje vrijeme razmišljali o sebi kao o bezvrijednoj osobi?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**200. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali da je život potpuno beznadan?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**201. Jeste li u posljednje vrijeme bili puni nade za vašu budućnost?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**202. Jeste li u posljednje vrijeme bili razmjerno sretni, sve u svemu?** \_\_\_\_\_

(1) Više nego inače (2) Otprilike isto kao inače (3) Manje nego inače (4) Znatno manje nego inače

**203. Jeste li se u posljednje vrijeme osjećali nervozni i napeti čitavo vrijeme?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**204. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali da život nije vrijedan življenja?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

**205. Jeste li u posljednje vrijeme osjećali povremeno da ne možete ništa učiniti jer vam živci nisu u redu?** \_\_\_\_\_

(1) Uopće ne (2) Ne više nego inače (3) Nešto više nego inače (4) Znatno više nego inače

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Građa ljudskog genoma.....	2
1.2. Heterozigotnost – mjera genetske raznolikosti .....	5
1.2.1. Mjere heterozigotnosti .....	7
1.2.3. Dosadašnja istraživanja multilokusne heterozigotnosti s STR biljezima .....	9
1.3. Srođivanje i fitnes .....	11
1.3.1. Primjeri suprotstavljanja gubitku heterozigotnosti.....	15
1.3.2. Korelacija heterozigotnosti i fitnesa - smjernice za istraživanje .....	16
1.3.3. Istraživanja korelacije između heterozigotnosti i fitnesa .....	17
1.4. Prednost heterozigota .....	23
1.5. Uloga okolišnih i genetičkih čimbenika u nastanku bolesti .....	26
1.6. Hormoni stresa i kortizol.....	32
1.6.1. Jutarnja koncentracija kortizola. ....	38
1.7. Instrumenti za mjerenje psihičkog stanja: GHQ-30 .....	39
1.7.1. Načini bodovanja GHQ-30 upitnika .....	43
1.7.2. GHQ-30 u istraživanjima .....	45
1.8. Povezanost genetskih čimbenika i koncentracije kortizola.....	48
1.9. Dosadašnja istraživanja hrvatskih otoka .....	51
2. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA .....	56
3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	59
3.1. Ispitanici i terensko istraživanje.....	60
3.2. Analizirane varijable .....	61
3.2.1. Opći podaci .....	61
3.2.2. Kortizol .....	62
3.2.3. Upitnik o općem zdravstvenom stanju: GHQ-30 .....	63
3.2.4. Genetički podaci i analize .....	64
3.2.4.1. Izolacija DNK, genotipiziranje i priprema podataka.....	64
3.2.4.2. Određivanje standardizirane multilokusne heterozigotnosti .....	66
3.3. Priprema podataka za analizu.....	68

3.4. Statistička analiza.....	70
3.5. Genetičke analize .....	73
4. REZULTATI.....	75
4.1. Opis populacije.....	76
4.1.1. Opći podaci .....	76
4.1.2. Kortizol .....	77
4.1.3. GHQ-30.....	78
4.1.4. Standardizirana multilokusna heterozigotnost (sMLH) .....	83
4.2. Determinante jutarnjih vrijednosti kortizola .....	84
4.3. Cjelogenomski test asocijacije za kortizol .....	87
5. RASPRAVA .....	102
5.1. Glavni rezultati disertacije .....	103
5.1.2. Cjelogenomska studija asocijacije kortizola .....	111
5.2. Prednosti i nedostaci istraživanja .....	115
5.2.1. Pogreške mjerenja .....	117
5.3. Značenje dobivenih rezultata i smjernice za buduća istraživanja .....	120
6. ZAKLJUČAK .....	124
7. SAŽETAK .....	126
8. SUMMARY .....	128
9. LITERATURA.....	130
10. ŽIVOTOPIS.....	142
11. PRILOZI .....	143