

# Polimorfizam CLOCK gena kod pacijenata s infarktom miokarda

---

Pfeifer, Vilma

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:827199>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicine**

**Vilma Pfeifer**

**POLIMORFIZAM CLOCK GENA KOD  
PACIJENATA S INFARKTOM  
MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicine**

**Vilma Pfeifer**

**POLIMORFIZAM CLOCK GENA KOD  
PACIJENATA S INFARKTOM  
MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

Istraživanje za ovaj rad provedeno je u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 34 lista, 3 slike i 8 tablica.

# SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA .....</b>	<b>III</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Infarkt miokarda .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Klasifikacija .....	1
1.1.2. Patogeneza .....	1
1.1.2. Klinička slika i postavljanje dijagnoze .....	2
1.1.3. Liječenje.....	3
<b>1.2. Cirkadijani ritam.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Centralni sat .....	6
1.2.2. Periferni satovi .....	6
<b>1.3. <i>CLOCK</i> gen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Utjecaj cirkadijanog ritma na kardiovaskularni sustav .....</b>	<b>8</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>9</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Ustroj studije.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Ispitanici .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Metode .....</b>	<b>11</b>
3.3.1. Anamnestički upitnik .....	11
3.3.2. Izolacija DNA .....	11
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	12
<b>3.4. Statističke metode .....</b>	<b>14</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Rezultati anamnestičkog upitnika.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Analiza polimorfizma <i>CLOCK</i> gena.....</b>	<b>16</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>24</b>

<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>27</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>28</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>29</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>30</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>34</b>

## POPIS KRATICA

NSTEMI – infarkt miokarda bez elevacije ST-segmenta (engl. *non ST-segment elevation myocardial infarction*)

EKG – elektrokardiogram

STEMI – infarkt miokarda s elevacijom ST-segmenta (engl. *ST-elevation myocardial infarction*)

ATP – adenzin trifosfat

ADP – adenzin difosfat

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim

ipRGCs – unutarnje retinalne fotoreceptivne ganglijske stanice (engl. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*)

CLOCK – prema engl. *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

ARNTL1 – prema engl. *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1*

PER – prema engl. *Period*

CRY – prema engl. *Cryptochrome*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

KVB – kardiovaskularne bolesti

MAF – učestalost rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*)

LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)

## 1. UVOD

### 1.1. Infarkt miokarda

Infarkt miokarda definiran je kao smrt miocita uzrokovana značajnom i dugotrajnom ishemijom. Najčešće, ali ne i uvijek, nastaje kao akutno očitovanje aterosklerotske koronarne bolesti. Kardiovaskularne bolesti, uključujući i infarkt miokarda, predstavljaju važan javnozdravstveni problem jer čine 10 % sveukupnog morbiditeta i 30 % sveukupnog mortaliteta (1). Više od polovice svih oboljelih osoba od infarkta miokarda starije je od 65 godina. Do 60. godine incidencija je 4 – 5 puta veća kod muškaraca nego kod žena, a poslije 60. godine incidencija je jednaka za oba spola (2). Infarkt miokarda najčešće zahvaća lijevu klijetku jer je njena masa veća, pa je tako veća i njena potreba za kisikom (3).

#### 1.1.1. Klasifikacija

Infarkt miokarda može se klasificirati u nekoliko tipova na temelju patoloških, kliničkih, prognostičkih i terapijskih razlika. Tip 1 spontani je infarkt miokarda koji nastaje zbog ruptуре, fisure, erozije ili ulceracije aterosklerotskog plaka. Tip 2 infarkt je miokarda koji nastaje zbog poremećaja u odnosu potrebe miocita za kisikom i dopreme kisika. Tip 3 smrt je uzrokovana infarktom miokarda. Na infarkt miokarda kao uzrok smrti posumnja se na temelju simptoma, ali je do smrti došlo prije nego što je razina srčanih biomarkera u krvi stigla porasti ili prije nego što je uzet uzorak krvi. Tip 4 infarkt miokarda povezan je s perkutanom koronarnom intervencijom. Tip 5 infarkt miokarda povezan je s postavljanjem koronarne prenosnice (4).

#### 1.1.2. Patogeneza

Akutni infarkt miokarda dio je akutnog koronarnog sindroma i predstavlja njegov najteži oblik. Akutni koronarni sindrom uključuje nestabilnu anginu u kojoj pacijenti imaju anginozne smetnje, ali bez povišenja srčanih biomarkera, zatim NSTEMI ako na EKG-u nema elevacije ST-segmenta i STEMI u kojemu na EKG-u postoji elevacija ST-segmenta. Kod NSTEMI i STEMI dolazi do povišenja srčanih biomarkera u krvi, što znači da je došlo do nekroze miocita. Najčešći patofiziološki mehanizam nastanka pucanje je aterosklerotskog plaka u obliku ruptуре, fisure ili erozije pokrovne ploče plaka. Nakon pucanja aterosklerotskog plaka dolazi do kontakta sadržaja plaka i krvi, što aktivira proces stvaranja



ugruška. Ugrušak može nepotpuno (nestabilna angina), potpuno i prolazno (NSTEMI) ili potpuno i trajno (STEMI) okludirati lumen koronarne krvne žile (5). Postoje dvije vrste plakova: stabilni i nestabilni. Stabilni imaju debelu pokrovnu ploču i malo lipidnog sadržaja, najčešće značajno sužavaju lumen i rijetko pucaju, a obično se očituju stabilnom anginom. Do rupture plaka najčešće dolazi kod nestabilnih plakova s tankom pokrovnom pločom i obilnim kašastim lipidnim sadržajem. Nakon potpune okluzije koronarne arterije dolazi do prekida cirkulacije i nedostatne opskrbe miocita kisikom, odnosno ishemije (5, 6). Ishemični miokard prelazi na iskorištavanje glukoze kao izvora energije za razliku od normalnog miokarda koji primarno koristi masne kiseline. Kada se ishemija produži, aerobni metabolizam prelazi u anaerobni, kojim se stvara mnogo manje energije. Zbog prelaska na anaerobni metabolizam dolazi do nakupljanja mliječne kiseline i drugih metabolita anaerobnog metabolizma u citosolu, što koči glikolizu. Konačno iscrpljenje anaerobne glikolize događa se kada tkivni ATP, koji je nužan za proces glikolize, dosegne vrijednost manju od 1  $\mu\text{mol}$  po gramu suhe mase i tada dolazi do smrti stanice (3). Ishemija dovodi do nekroze miocita u opskrbnom području okludirane arterije distalno od okluzije. Gubitak od 20 do 25 % mase lijeve klijetke očituje se klinički, a gubitak više od 40 % mase vodi u kardiogeni šok. Akutna ishemija srčanog mišića uzrokuje električnu nestabilnost miocita i posljedično može doći do po život opasnih aritmija poput ventrikularne tahikardije i fibrilacije koje su i glavni uzrok smrti od infarkta miokarda (7). Ostali uzroci smrti jesu smanjenje srčanog minutnog volumena, plućni edem koji nastaje zbog zastoja krvi u plućnim krvnim žilama, a ponekad i srčana ruptura (8).

### 1.1.3. Klinička slika i postavljanje dijagnoze

Akutni infarkt miokarda najčešće se očituje simptomima ishemije koji uključuju nelagodu i bol u prsima, gornjim udovima, području donje čeljusti i epigastrija koja je jednaka i u mirovanju i naporu. Bol povezana s infarktom miokarda obično traje dulje od 20 minuta i ima difuzni karakter (4). Uz bol karakteristično je da su pacijenti lošeg općeg stanja (9). Infarkt miokarda u nekim se slučajevima očituje atipičnim simptomima poput palpitacija, kardijalnog aresta, a ponekad može biti i potpuno asimptomatski, najčešće kod žena i kod pacijenata koji imaju šećernu bolest (4). Većina pacijenata anksiozna je i nemirna zbog boli. Često je prisutno bljedilo lica uz znojenje i hladnoću ekstremiteta. Obično pacijenti imaju normalan puls i krvni tlak, međutim kod nekih pacijenata javlja se hipotenzija ili hipertenzija (10).

Osnovni kriteriji za postavljanje dijagnoze infarkta miokarda uključuju prisutnost boli, patološki nalaz na EKG-u i povišenje srčanih biomarkera u krvi. Promjene na EKG-u uključuju za milimetar ili više podignutu ST-spojnicu u dvama susjednim odvodima (samo kod STEMI), negativni T-val i Q zubac koji se pojavljuje tek za nekoliko sati, a mora biti prisutan u barem dvama susjednim odvodima i dubok više od 1 mm (7, 11). Mjesto infarkta ovisi o tome u kojoj je koronarnoj arteriji došlo do okluzije, a to se može utvrditi EKG-om. Opisane promjene javljaju se u određenim odvodima na EKG-u ovisno o tome koja je krvna žila okludirana. Okluzija lijeve silazne koronarne arterije uzrokuje infarkt prednje stjenke, što se na EKG-u očituje promjenama u odvodima V1 – V4. Tromboza desne koronarne arterije uzrokuje infarkt stražnje stjenke, što se na EKG-u vidi kao promjena u obliku denivelacije ST-segmenta u V1 i V2 i dijafragmalni infarkt, što se vidi u II, III i aVF odvodu. Okluzija lijeve cirkumfleksne arterije uzrokuje lateralni infarkt, što dovodi do promjene u odvodu I, aVL, V5 i V6 (2, 12). Srčani biomarkeri, koji rastu u krvi nakon infarkta miokarda, jesu srčani troponin I i T, kreatin kinaze, laktat dehidrogenaza i brojni drugi. Srčani troponin (I ili T) specifičan je za miocite i visoko je osjetljiv te se pomoću njega mogu detektirati i mikroskopske zone nekroze miokarda. Za postavljanje dijagnoze vrijednost srčanog troponina u krvi mora biti viša od 99. percentile referentne kontrolne skupine (13). Do povišenja troponina dolazi 2 – 4 sata od pojave simptoma, a povišen ostaje još nekoliko dana (14).

#### 1.1.4. Liječenje

Akutni infarkt miokarda predstavlja hitno stanje koje je potrebno odmah zbrinuti. Bol se najčešće smanjuje sublingvalnim davanjem nitroglicerina, a kasnije se prelazi na intravensku te intravensku primjenu morfija. Aspirin je lijek koji se daje zbog svog antitrombotskog učinka u prvom kontaktu s pacijentom neovisno o daljnjoj strategiji terapije. Konačna je terapija infarkta miokarda reperfuzija i potrebno ju je što ranije osigurati. Tri su oblika reperfuzijske terapije, a to su fibrinolitička terapija, perkutana koronarna intervencija i kirurška revaskularizacija (7). Fibrinolitička terapija podrazumijeva farmakološku razgradnju tromba. Lijekovi koji se za to koriste nazivaju se fibrinolitici i primjenjuju se intravenski. Neki su od njih streptokinaza, tenekteplaza, alteplaza i reteplaza (15). Prednost se daje perkutanoj koronarnoj intervenciji ako je pacijentu unutar 90 minuta dostupan centar u kojem se to provodi. Perkutana koronarna intervencija postupak je mehaničke reperfuzije. U tom postupku radi se dilatacija okludirane koronarne arterije i nakon toga najčešće postavlja se stent koji lumen krvne žile drži trajno otvorenim i većim (16). Kirurška reperfuzija može se

provoditi uz stroj za izvantjelesnu cirkulaciju ili na kucajućem srcu. Kirurškim postupkom ugrađuje se premosnica koja preuzima ulogu okludirane koronarne arterije i dovodi krv u zahvaćeni dio miokarda (17). Nakon oporavka pacijenti su pod povećanim rizikom od ponovnog infarkta zbog čega ih je potrebno pratiti, uvesti određenu terapiju i savjetovati o promjeni životnih navika. Nakon infarkta miokarda pacijentu se prepisuje dvojnja antiagregacijska terapija, najčešće aspirin u dozi od 75 – 100 mg na dan i jedan od blokatora ADP-receptora (klopidogrel ili tiklopidin) 9 – 12 mjeseci. Pacijentima se savjetuje regulacija tjelesne težine, promjena načina prehrane, prestanak pušenja i konzumacije alkohola, više fizičke aktivnosti, bolja kontrola krvnog tlaka, bolja regulacija glikemije kod osoba koje imaju šećernu bolest i smanjenje razine kolesterola u krvi. B-blokatori preporučuju se u terapiji nakon akutnog infarkta miokarda jer ako se s njihovom primjenom počne dovoljno rano, smanjuju veličinu infarkta i ranu smrtnost, a dugoročnim korištenjem također smanjuju rizik od smrtnog ishoda (18, 19).

## 1.2. Cirkadijani ritam

Cirkadijani ritam psihološki je i bihevioralni ciklus koji traje približno 24 sata, a generiran je unutarnjim biološkim predvodnikom, suprahijazmatskom jezgrom (20). Cirkadijani ritam predstavlja evolucijsku prilagodbu organizma na okoliš (21). Njegova je uloga velika jer on regulira brojne fiziološke procese poput ciklusa spavanja i budnosti, tjelesne temperature, hranjenja, hormonske sekrecije, homeostaze glukoze i ciklusa regeneracije stanica. Cirkadijani ritam sinkroniziran je sa Zemljinom rotacijom tako što svaki dan na temelju podražaja koji signaliziraju koje je doba dana podešava unutarnje vrijeme suprahijazmatske jezgre. Ti podražaji nazvani su *Zeitgebers*, a od njih najvažnija je svjetlost. Osim svjetla, raspored hranjenja, aktivnost tijekom dana i sekrecija melatonina također mogu utjecati na cirkadijani ritam (20). Melatonin je hormon koji svojim obrascem lučenja kod sisavaca signalizira koje je doba dana. Njegovo lučenje događa se u odsutnosti svjetla i predstavlja „biološku noć“, a svjetlost suprimira njegovo lučenje. Melatonin je najbolji periferni marker ljudskog cirkadijanog ritma. Njegova koncentracija u krvi počinje rasti otprilike 2 sata prije prirodnog vremena za spavanje, a najveća je oko ponoći (21, 22). Receptori za melatonin MT1 i MT2 nalaze se na membranama neurona suprahijazmatske jezgre, ali i u nekim perifernim tkivima. Aktivacija MT1 receptora povezana je s pospanosti, a aktivacija MT2 odgovorna je za sinkronizaciju ciklusa svjetlo i mrak s unutrašnjim biološkim satom. Melatonin je uključen i u energijski metabolizam i pretilost, ali njegova uloga u tome zasad

nije dovoljno razjašnjena (23). Supresija lučenja melatonina zbog svjetlosti tijekom noći mogla bi biti uzrokom velikog broja različitih bolesti (22). Sintetski oblik melatonina, ralmeteon, primjenjuje se u terapiji nesanice kod osoba koje imaju problema s usnivanjem. Ralmeteon je učinkovit lijek koji smanjuje latenciju do pojave sna, ne remeti normalnu arhitekturu spavanja, ne izaziva ovisnost i ne uzrokuje značajne simptome u slučaju prekida terapije (24). Poremećaji spavanja povezani s cirkadijanim ritmom mogu nastati zbog promjene u vanjskom okolišu, ali i zbog oštećenja aferentnih ili eferentnih puteva cirkadijanog ritma (20). Alzheimerova bolest primjer je u kojem dolazi do promjena u neuralnim putevima koji omogućuju spavanje, te se kod takvih osoba javljaju poremećeni obrasci spavanja. Osobe s Alzheimerovom bolesti mogu imati obrnuti ciklus spavanja i budnosti koji rezultira nesanicom i dnevnom pospanošću (25). Kod određenog broja slijepih osoba primijećen je poremećaj cirkadijanog ritma zbog izostanka svjetlosnih podražaja koji suprahijazmatskoj jezgri signaliziraju doba dana (20). Rad u noćnoj smjeni i opstruktivna apnea mogu dovesti do promjena u funkciji cirkadijanog ritma, te je kod takvih osoba primijećena veća učestalost kardiovaskularnih, gastrointestinalnih i reproduktivnih bolesti (22, 26). Usklađenost cirkadijanog ritma s okolišem može se dobro opisati u sindromu brze promjene vremenske zone (engl. *jet lag*), a javlja se kod putovanja zrakoplovom kroz nekoliko vremenskih zona. Poremećaj traje 1 do 2 dana, dok se unutrašnji sat ne prilagodi novom okolišu, odnosno novoj vremenskoj zoni. Putnici imaju simptome u obliku nesanice, pospanosti tijekom dana, slabog apetita, depresivnog raspoloženja, iritabilnosti i uzrujanosti. Kako bi se umanjili simptomi, osobe koje putuju na istok trebale bi izbjegavati jako svjetlo rano ujutro i trebale bi se izložiti jakom svjetlu u kasno prijepodne i poslijepodne. Putnici prema zapadu trebaju ostati budni do kraja dana na novoj destinaciji (20). Utjecaj cirkadijanog ritma na ponašanje ljudi može se dobro zamijetiti i u povećanoj učestalosti nesreća u prometu i industriji te grešaka na radu u drugoj polovici noći. U tom razdoblju smanjuje se koncentracija i tada mozak šalje najviše informacija o potrebi za spavanjem (26). Unutrašnji cirkadijani ritam održan je i u odsutnosti okolišnog ciklusa odnosno u izoliranim uvjetima u kojima nema podražaja koji upućuju na to koje je doba dana. Unutrašnji ritam održava ciklus aktivnosti i odmaranja unatoč tome što nema vanjskih signala (27). Na razini organizma cirkadijani ritam odvija se u centralnom i perifernim satovima koji su hijerarhijski organizirani i komuniciraju neuralnim i humoralnim putevima (28, 29).

### 1.2.1. Centralni sat

Suprahijzamska jezgra djeluje kao centralni sat odnosno središnji regulator koji usklađuje vanjski dnevni ciklus s unutrašnjim. Suprahijzamska jezgra prima informacije iz okoliša i šalje informacije u druge dijelove tijela (20). Svjetlo na retini podražuje unutarnje retinalne fotoreceptivne ganglijske stanice (ipRGCs). Fotoreceptori u ipRGCs imaju sporu kinetiku i relativno visok prag za svjetlo, što ih čini idealnim fotoreceptorima za cirkadijani ritam jer moraju relativno dugo prenositi informaciju o svjetlosti i moraju biti neosjetljivi na prolazne svjetlosne signale koji nisu povezani sa sunčevom svjetlošću (21). Svjetlosni se podražaj zatim putem retinotalamičkog trakta prenosi do suprahijzamske jezgre. Kod sisavaca je funkcija supranuklearne jezgre i možda retine izravno povezana sa svjetlosnim podražajem. Pinealna žlijezda ili epifiza nije izravno fotosenzitivna, ali utječe na suprahijzamsku jezgru jer luči melatonin (28). Suprahijzamska jezgra prima i neke druge informacije iz jezgre rafe, ponsa i stražnjeg dijela hipotalamusa. Eferentne projekcije suprahijzamska jezgra šalje u paraventricularnu jezgru hipotalamusa, dorzomedijalni hipotalamus, talamus, preoptičko i retrohijzamsko područje, u striju terminalis i genikulatne jezgre. Osim neuralnim putevima, s ostatkom mozga komunicira humoralnim putem izlučujući transformirajući čimbenik rasta alfa, citokine i prokinetin 2 (20).

### 1.2.2. Periferni satovi

Revolucionarno otkriće u kronobiologiji bilo je da se u ostatku mozga izvan suprahijzamske jezgre i u gotovo svim stanicama organizma nalaze periferni cirkadijani satovi (20). Ritam gena cirkadijanog sata i njihovih proteinskih produkata proučavani su i dokazani na raznim stanicama u kulturi (21). Većina tkiva u organizmu posjeduje iste molekularne mehanizme ekspresije gena cirkadijanog ritma kao i suprahijzamska jezgra. Prema tome, tkivo može samostalno regulirati dnevni ritam, a uloga suprahijzamske jezgre jest da uskladi dnevni ritam u svim tkivima. Gubitak funkcije suprahijzamske jezgre rezultira neusklađenošću perifernih satova (28). Suprahijzamska jezgra usklađuje cirkadijani ritam svih stanica neuralnim putem koji uključuje autonomni živčani sustav, odnosno simpatički i parasimpatički sustav i humoralnim putevima koji uključuju lučenje hormona, od kojih se glukokortikoidima pridaje najveća važnost. Simpatička inervacija iz suprahijzamske do paraventricularne jezgre i na kraju jetre utječe na dnevni ritam glukoneogeneze, a time i na koncentraciju glukoze u krvi. Simpatička inervacija povećava osjetljivost nadbubrežne

žlijezde na podražaj adrenokortikotropnim hormonom i tako izravno utječe na otpuštanje glukokortikoida. Osim simpatičkom inervacijom dnevni ritam otpuštanja glukokortikoida ovisi i o dnevnom ritmu lučenja kortikotropin oslobađajućeg hormona i adrenokortikotropnog hormona (21). Glukokortikoidi utječu na niz različitih procesa poput glukoneogeneze, metabolizma lipida, kardiovaskularnog tonusa, a imaju ulogu i u procesu upale i u funkcioniranju imunološkog sustava. Predstavljaju jedan od ključnih humoralnih medijatora cirkadijanog ritma (28). Osim glukokortikoida, i drugi humoralni čimbenici imaju ulogu u sinkronizaciji cikradijanog ritma poput melatonina, katekolamina, hormona rasta, atrijskog natriuretskog peptida, angiotenzina II, aldosterona i renina, koji također pokazuju dnevnu varijaciju u izlučivanju (30).

### 1.3. *CLOCK* gen

*CLOCK* gen jedan je od gena uključenih u molekularnu regulaciju cirkadijanog ritma. Gen se nalazi na dugom kraku 4. kromosoma, a veličine je 119.238 parova baza (31). *CLOCK* gen kodira protein koji je transkripcijski čimbenik s motivom uzvojnica-okret-uzvojnica i ima unutrašnju acetiltransferaznu aktivnost (30, 31). Proteinski produkt *CLOCK* gena ima središnju ulogu u upravljanju cirkadijanim ritmom. Osim *CLOCK* gena, ulogu u cirkadijanom ritmu imaju i drugi geni poput *ARNTL*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1* i *CRY2* gena kao i njihovi proteinski produkti (32). Molekularni mehanizam funkcioniranja cirkadijanog ritma sastoji se od sustava pozitivnih i negativnih povratnih sprega u kojima i *CLOCK* gen ima svoju ulogu. *CLOCK* gen uz *ARNTL* gen aktivator je transkripcije, a *PER* i *CRY* inhibitori su transkripcije (33). Proteinski produkti *CLOCK* i *ARNTL* gena formiraju heterodimer koji se veže na *E-box* element u promotorskoj regiji uzvodno od *CRY* i *PER* gena te tako potiče njihovu ekspresiju (32). *Per1*, *per2* i *per3* mRNA odlazi iz jezgre u citoplazmu i dolazi do stvaranja *PER1*, *PER2* i *PER3* proteinskih produkata. Kako se njihova količina povećava tako dolazi do stvaranja *PER1* i *PER2* heterodimera koji ulaze ponovno u jezgru. *CRY1* i *2* proteinski produkti inhibiraju prijenos *PER1* i *PER2* heterodimera, dok *PER 3* proteinski produkt djeluje tako da pospješuje ulazak *PER1* i *PER2* heterodimera u jezgru (34). Proteinski produkti *PER* i *CRY* gena također formiraju heterodimere koji djeluju tako da inhibiraju ekspresiju *CLOCK* i *ARNTL* gena, a na taj način neizravno inhibiraju i vlastitu ekspresiju (33). Smanjenjem ekspresije *CRY* i *PER* te razgradnjom njihovih proteinskih produkata tijekom noći prestaje inhibicijsko djelovanje na *CLOCK* i *ARNTL*, pa ciklus može opet početi (20, 35). Cijeli taj proces aktivacije i inhibicije traje oko 24 sata. *CLOCK* i *ARNTL* heterodimer veže se i na *E-*

*box* gena koji su nazvani „geni pod kontrolom cirkadijanog ritma“ i tako potiču oscilacije biološkog sata i promjenu metaboličkih i humoralnih funkcija tijekom dana (33). Polimorfizam *CLOCK* gena mogao bi biti povezan s promjenom ponašanja u određenim populacijama, pretilošću i metaboličkim sindromom (31).

#### **1.4. Utjecaj cirkadijanog ritma na kardiovaskularni sustav**

Veća pojava akutnih kardiovaskularnih događaja u određeno doba dana upućuje na povezanost cirkadijanog ritma i funkcije kardiovaskularnog sustava. Pokazalo se da je najveća incidencija infarkta miokarda ujutro između šest i dvanaest sati, a najniža u noći između tri i šest sati. Ruptura i disekcija aorte najčešće se događa između osam i jedanaest sati, dok je najveća incidencija fibrilacije atrijske poslijepodne (30, 32). Nekoliko čimbenika utječe na veću incidenciju akutnog infarkta miokarda u jutarnjim satima poput porasta simpatičke aktivnosti i smanjenja fibrinolitičke aktivnosti (36). Vrijednosti krvnog tlaka mijenjaju se tijekom dana, najniže vrijednosti krvni tlak pokazuje tijekom noći kada dolazi do prevlasti parasimpatikusa nad simpatikusom. Krvni tlak počinje rasti nešto prije vremena buđenja, ima više vrijednosti tijekom dana i ponovno počinje padati u večernjim satima prije spavanja. Normalni krvni tlak obično je tijekom noći manji za 10 % i udarno raste prije buđenja (30). Buđenjem i dizanjem iz ležećeg položaja dolazi do naglog porasta aktivnosti simpatikusa i lučenja katekolamina koji povećavaju vaskularni tonus krvnih žila, pa tako i tonus koronarnih arterija (37). Porast krvnog tlaka povećava potrebu miokarda za kisikom, a istovremeni porast tonusa koronarnih krvnih žila i broja otkucaja srca dodatno pogoršavaju neravnotežu između dotoka i potrebe miokarda za kisikom (31). Cirkadijani ritam ima utjecaj i na agregaciju trombocita te ostale komponente koagulacijskog sustava (30). Agregacija trombocita i koagulabilnost krvi povišena je u jutarnjim satima, dok je fibrinolitička aktivnost smanjena. Ujutro u krvi dolazi do porasta inhibitora aktivacije plazminogena i porasta aktivnosti faktora VIII. Stanje hiperkoagulabilnosti i smanjene fibrinolitičke aktivnosti povećava incidenciju trombotskih događaja (31, 38). U jutarnjim satima povišena je i vrijednost kortizola i angiotenzina II. Kortizol povećava osjetljivost koronarnih arterija na katekolamine i tako povećava njihov vazokonstriktivni učinak (36).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ispitati postoji li povezanost polimorfizama *CLOCK* gena cirkadijanog ritma i infarkta miokarda.



### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao studija slučaja i kontrola (39).

#### 3.2. Ispitanici

Provedeno je istraživanje polimorfizma *CLOCK* gena na 200 pacijenata s preboljenim infarktom miokarda i 200 kontrolnih ispitanika. Ispitanici iz obiju skupina prikupljeni su od svibnja 2015. do prosinca 2016. godine. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Skupinu pacijenata s preboljenim infarktom miokarda činili su pacijenti hospitalizirani na Kliničkom odjelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u skupinu pacijenata s infarktom miokarda bili su:

- preboljen infarkt miokarda tipa 1 (4)
- povišeni biokemijski marker troponin T (veći od 0,05; iznad 99. percentile)
- bol u prsištu duža od 30 minuta
- promjene elektrokardiograma.

Kriteriji za isključenje ispitanika iz skupine pacijenata s infarktom miokarda bili su:

- dekompenzacija
- valvularne greške
- ugrađeni električni uređaj (engl. *pacemaker*).

Kontrolnu skupinu čine osobe iz ambulanti obiteljske medicine koje je prikupio njihov liječnik obiteljske medicine. Kontrolna je skupina prema dobi i spolu izjednačena sa skupinom pacijenata s infarktom miokarda.

Kriteriji za isključenje ispitanika u kontrolnu skupinu bili su:

- troponin manji od 0,05
- negativna anamneza na infarkt miokarda, težu kardiovaskularnu bolest i šećernu bolest tipa 2

Kriteriji za isključenje ispitanika iz kontrolne skupine bili su rođaci osoba iz skupine pacijenata s infarktom miokarda zbog složene nasljedne osnove čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti (40).

### 3.3. Metode

U istraživanju su korišteni anamnestički upitnici radi prikupljanja općih i medicinskih podataka ispitanika te uzorci krvi iz vene. Svakom je ispitaniku uzeto 3 ml krvi u epruvetu s podtlakom (*Vacutainer, Becton Dickinson*) s antikoagulansom etilendiamintetraoctena kiselina. Svaki uzorak krvi posebno je šifriran i pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  do postupka izolacije DNA. Izolacija DNA rađena je na mini spin kolonama prema standardnom protokolu proizvođača (*QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany*). Nakon toga, metodom lančane reakcije polimerizacije u stvarnom vremenu i primjenom TaqMan kompleta reagensa, učinjena je analiza triju polimorfizama jednog nukleotida u *CLOCK* genu.

#### 3.3.1. Anamnestički upitnik

Anamnestičkim upitnikom prikupljeni su podatci o svim ispitanicima. Iz upitnika su dobiveni podatci o spolu, životnoj dobi, razini obrazovanja, zaposlenju, konzumaciji kofeina, povijesti pušenja, obiteljskoj povijesti infarkta miokarda, prijašnjim kardiovaskularnim bolestima, hipertenziji, dislipidemiji, respiratornim bolestima, šećernoj bolesti tipa 1 i 2, bolestima štitne žlijezde, bubrega i jetre.

Obiteljska anamneza kardiovaskularnih bolesti određena je postojanjem bolesti koronarnih arterija kod rođaka u prvom koljenu prije 60.-e godine života. Prijašnje kardiovaskularne bolesti utvrđene su postojanjem angine pektoris, infarkta miokarda, aritmije ili moždanog udara u grupi pacijenta.

#### 3.3.2. Izolacija DNA

Za postupak izolacije DNA korištene su komercijalne kolone sa silika-membranom pomoću kompleta reagensa *QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen Company)*.

Postupak izolacije DNA započinje inkubacijom 20  $\mu\text{l}$  *QIAGEN Protease*, 200  $\mu\text{l}$  nekoagulirane krvi i 200  $\mu\text{l}$  odgovarajućeg pufera. Inkubacija traje 10 minuta i radi se na

56 °C. Nakon inkubacije, u uzorak se dodaje 200 µl 100 %-tnog etanola. Dobivena se smjesa pipetira u *DNeasy Mini spin column* (koja je u tubici od 2 ml) i potom se centrifugira na 6000 g jednu minutu. DNA se veže na membranu, a ostatak smjese prolazi kroz pore membrane. Zatim se *DNeasy Mini spin column* prenosi u novu tubicu, a tubica s filtratom odbacuje se. Izolirana DNA ostaje u *DNeasy Mini spin column* i dodatno se pročišćava dodavanjem različitih pufera. Prvo se dodaje 500 µl AW1 pufera i centrifugira se na 6000 g 1 minutu. *DNeasy Mini spin column* prebacuje se u novu tubicu, a ona koja sadrži filtrat odbacuje se. Potom se u *DNeasy Mini spin column* dodaje 500 µl AW2 pufera i centrifugira se na 20000 g 3 minute. Nakon centrifugiranja *DNeasy Mini spin column* prebacuje se u novu tubicu od 1,5 ml i dodaje 200 µl AE pufera izravno na membranu. Izolirana DNA čuva se u AE puferu pohranjena na -20 °C do daljnje analize (41).

### 3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom vrlo je učinkovita metoda u molekularnoj biologiji koja se može upotrijebiti za dobivanje velikih količina određenog fragmenta DNA koji se želi analizirati. U svakom ciklusu dolazi do udvostručenja ciljanog fragmenta DNA i njegova količina eksponencijalno raste. Produkti svakog ciklusa mjere se pomoću fluorescentnog signala koji je jači što je više novonastalih PCR produkata. Da bi se određeni fragment DNA umnožio, potrebne su dvije oligonukleotidne početnice od 20 parova baza, jedna za segment uzvodno, a druga za segment nizvodno od dijela koji želimo umnožiti. Prvo dolazi do denaturacije dvolančane DNA na koju se vežu početnice. DNA polimeraza produljuje lance na koje se vezala početnica. Ponavljanjem denaturacije i ponovnog vezanja početnica te produljenja lanca dolazi do stvaranja novih kopija željenog dijela DNA (42).

Genotipizacija je učinjena primjenom TaqMan metodologije. TaqMan metodologija temelji se na 5'-3' egzonuklearnoj aktivnosti Taq DNA-polimeraze. Ona zbog svoje egzonuklearne aktivnosti može razgraditi TaqMan probu ako je ona vezana na ciljni dio DNA, odnosno ako se TaqMan proba vezala između uzvodne i nizvodne početnice. TaqMan proba na svojem 5' kraju ima vezanu reportersku fluorescentnu boju FAM<sup>TM</sup> ili VIC<sup>TM</sup>, dok na svom 3' kraju ima vezan nefluorescentni prigušivač. Ako Taq DNA polimeraza razgradi TaqMan probu, dolazi do razdvajanja receptorske fluorescentne boje i prigušivača, što dovodi do nastanka fluorescentnog signala određene valne duljine. Intenzitet odašiljanja fluorescentnog signala ovisi o količini novonastalog PCR produkta. Primjenom različitih početnica i proba koje su

obilježene različitim fluorescentnim bojama omogućena je višestruka analiza. Ako ne dođe do fluorescencije, znači da nije došlo do vezanja TaqMan probe za ciljani odsječak DNA, odnosno da ciljana sekvenca nije komplementarna probi ili da ciljana sekvenca nije umnožena (43).

U istraživanju su upotrijebljene probe za SNP-e (polimorfizme jednog nukleotida) prikazane u Tablici 1. Odabir SNP-a utemeljen je na poznatoj uključenosti *CLOCK* gena u molekularni mehanizam regulacije cirkadijanog ritma te na povezanosti polimorfizma *CLOCK* gena s rizičnim čimbenicima za kardiovaskularne bolesti.

Tablica 1. Analizirani polimorfizmi jednog nukleotida *CLOCK* gena cirkadijanog ritma

SNP	Promjena u DNA	Funkcija
rs11932595	A / G	intronska supstitucija
rs6811520	C / T	intronska supstitucija
rs13124436	A / G	intronska supstitucija

Sastojci PCR smjese, i njihovi volumeni, koji su korišteni u postupku genotipizacije pomoću TaqMan metodologije prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Sastojci i volumeni reagensa potrebni za genotipizaciju TaqMan metodom

Sastojci	Volumeni
V (PCR Master Mix 2 x)	6,25 $\mu$ L
V (SNP Taqman probe mix 40 x)	0,31 $\mu$ L
V (d. d. H <sub>2</sub> O)	3,44 $\mu$ L
V (DNA / H <sub>2</sub> O)	2,5 $\mu$ L
<b>Ukupni volumen</b>	<b>12,5 <math>\mu</math>L</b>

Postupak genotipizacije rađen je prema PCR protokolu. Prvo dolazi do početne denaturacije 10 minuta na 95 °C. Potom denaturacije tijekom 40 ciklusa 15 sekundi na 92 °C te vezanje i sinteza tijekom 40 ciklusa 1 minutu na 60 °C.

Analiza dobivenih rezultata genotipizacije napravljena je na uređaju *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*).

### 3.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišten je program Statistica 12.7 (StatSoft Inc. TULSA, OK, USA). Napravljena je deskriptivna statistička obrada podataka. Razlike numeričkih varijabli između dviju skupina ispitanika testirane su t-testom za nezavisne uzorke ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o njihovoj distribuciji, dok su razlike između kategoričkih varijabli testirane Pearsonovim  $\chi^2$  testom.

Razlike u distribuciji i frekvenciji javljanja alela ispitane su  $\chi^2$  testom. Određeni su omjeri izgleda (OR, engl. *odds ratio*) i 95 %-tni intervali pouzdanosti (95 % CI, engl. *confidence intervals*) za usporedbu raspodjele alela i genotipova među pacijentima i kontrolama. Napravljen je i  $\chi^2$  test o pretpostavljenom obliku raspodjele genotipova zbog mogućeg odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, što predstavlja dodatan korak u procjeni kontrole genotipova. Analize su napravljene pomoću mrežnog alata SHEsi (44). Frekvencije haplotipova te povezanost haplotipova s infarktom miokarda procijenjena je pomoću mrežnog alata SHEsis ili SNPStats programom (44, 45), kao i razlike u haplotipovima između pacijenata s infarktom miokarda i kontrolne skupine. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ . Sve P vrijednosti prilagođene su prema Bonferronijevom testu za višestruko testiranje.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati anamnestičkog upitnika

Analizirano je ukupno 400 ispitanika, od kojih je 200 preboljelo infarkt miokarda i 200 koji nisu preboljeli infarkt miokarda. Aritmetička sredina dobi ispitivane populacije iznosila je 64 godine sa standardnom devijacijom od 13 godina. 54,5 % ispitanika čine muškarci, a 44,5 % čine žene. Opći podatci ispitanika prikazani su u Tablici 3., a učestalost rizičnih čimbenika za razvoj kardiovaskularnih bolesti prikazana je u Tablici 4.

Tablica 3. Opći podatci ispitanika uključenih u istraživanje

	<b>Pacijenti</b>	<b>Kontrole</b>
<b>Dob, aritmetička sredina (standardna devijacija)</b>	67 (12)	62 (13)
	Broj ispitanika (%)	Broj ispitanika (%)
<b>Pušenje</b>		
Nepušači	98 (49,5)	151 (75,5)
Pušači	41 (20,5)	39 (19,5)
Bivši pušači	60 (30)	10 (5)
<b>Obrazovanje</b>		
Osnovna škola	70 (35)	53 (26,5)
Srednja škola	106 (53)	114 (57)
Viša/fakultet	24 (12)	33 (16,5)
<b>Radni status</b>		
Zaposlen	32 (16)	57 (28,5)
Nezaposlen	23 (11,5)	13 (6,5)
Umirovljen	145 (72,5)	130 (65)
<b>Konzumacija kofeina</b>		
Da	171 (85,5)	149 (74,5)
Ne	29 (14,5)	51 (25,5)

Tablica 4. Učestalost kardiovaskularnih čimbenika rizika među ispitanicima

Kardiovaskularni čimbenici rizika	Pacijenti	Kontrole	P*
	Broj ispitanika (%)	Broj ispitanika (%)	
Hipertenzija	107 (53,5)	59 (29,5)	0,892
Dislipidemija	26 (13)	23 (11,5)	<b>0,048</b>
Respiratorne bolesti	2 (1,8)	8 (4)	0,772
Šećerna bolest tipa 1	1 (1)	2 (1,9)	0,886
Šećerna bolest tipa 2	44 (22)	0	-
Bolesti štitne žlijezde	8 (4)	6 (6,3)	0,612
Bolesti bubrega	15 (7,5)	12 (6)	0,910
Bolesti jetre	10 (5)	9 (4,5)	0,481
Pozitivna obiteljska anamneza KVB†	47 (23,5)	27 (13,5)	0,754
Prijašnje KVB†	143 (71,5)	14 (7)	0,221
Infarkt miokarda	57 (28,5)	0	-
Drugo (aritmije, angina pektoris, moždani udar)	86 (43)	14 (7)	-
Ništa	57 (28,5)	186 (93)	-

\*Pearsonov  $\chi^2$  test

†Kardiovaskularne bolesti

#### 4.2. Analiza polimorfizma *CLOCK* gena

Učestalost genotipova istraživanih polimorfizama u ispitivanoj i kontrolnoj skupini u skladu je s predviđenima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi. Raspodjela alela polimorfizama *CLOCK* gena kao i učestalost dominantnih i recesivnih modela genotipova prikazana je u Tablici 5. Učestalost genotipova polimorfizama *CLOCK* gena prikazana je na Slici 1. Raspodjela i učestalost genotipova *CLOCK* gena cirkadijanog ritma prikazani su u Tablici 6.

Statistički značajna razlika nije pronađena kod polimorfizama rs11932595 i rs13124436 *CLOCK* gena i infarkta miokarda, ali je pronađena kod rs6811520 i infarkta miokarda. Razlike u učestalosti alela i genotipova, nakon korekcije za višestruko testiranje prema Bonferroniju, nisu dosegle zadani prag značajnosti.

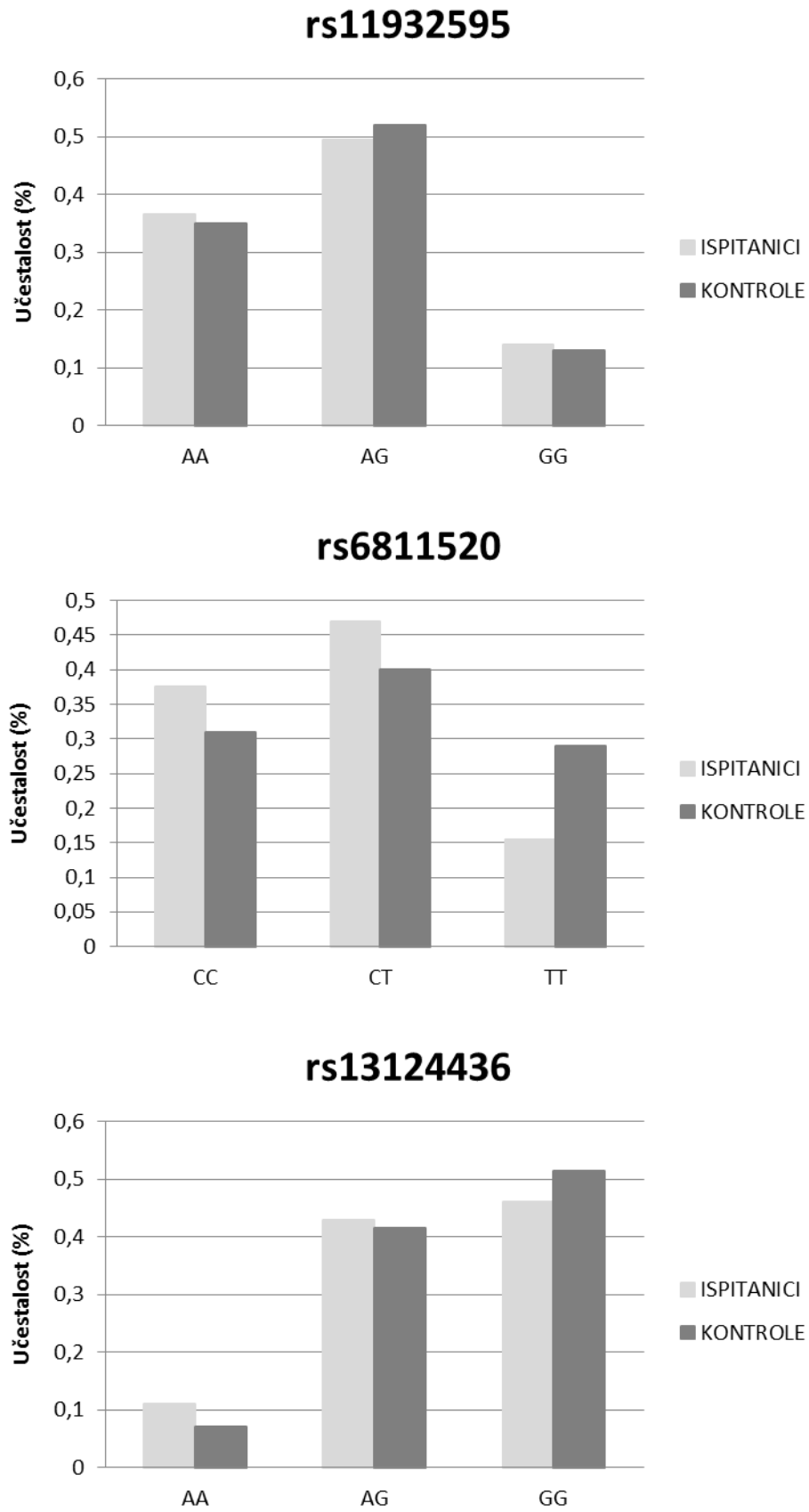
Tablica 5. Raspodjela alela i modela genotipova polimorfizma *CLOCK* gena

	Učestalost alela				Modeli genotipova					
	Rjeđi aleli	MAF* pacijenti	MAF* Kontrole	P†	Dominantni model			Recesivni model		
					P†	OR	95 % CI	P†	OR	95 % CI
rs11932595	G	0,388	0,39	0,942	0,77	1,09	0,61 – 1,95	0,754	1,07	0,71 – 1,61
rs6811520	T	0,39	0,49	<b>0,004</b>	0,001	0,45	0,27 – 0,73	0,171	1,33	0,88 – 2,02
rs13124436	A	0,325	0,278	0,143	0,271	0,8	0,54 – 1,19	0,162	1,63	0,81 – 3,38

\*Učestalost rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*)

†P vrijednosti dobivene su SNPStats programom za analizu različitih modela genotipova



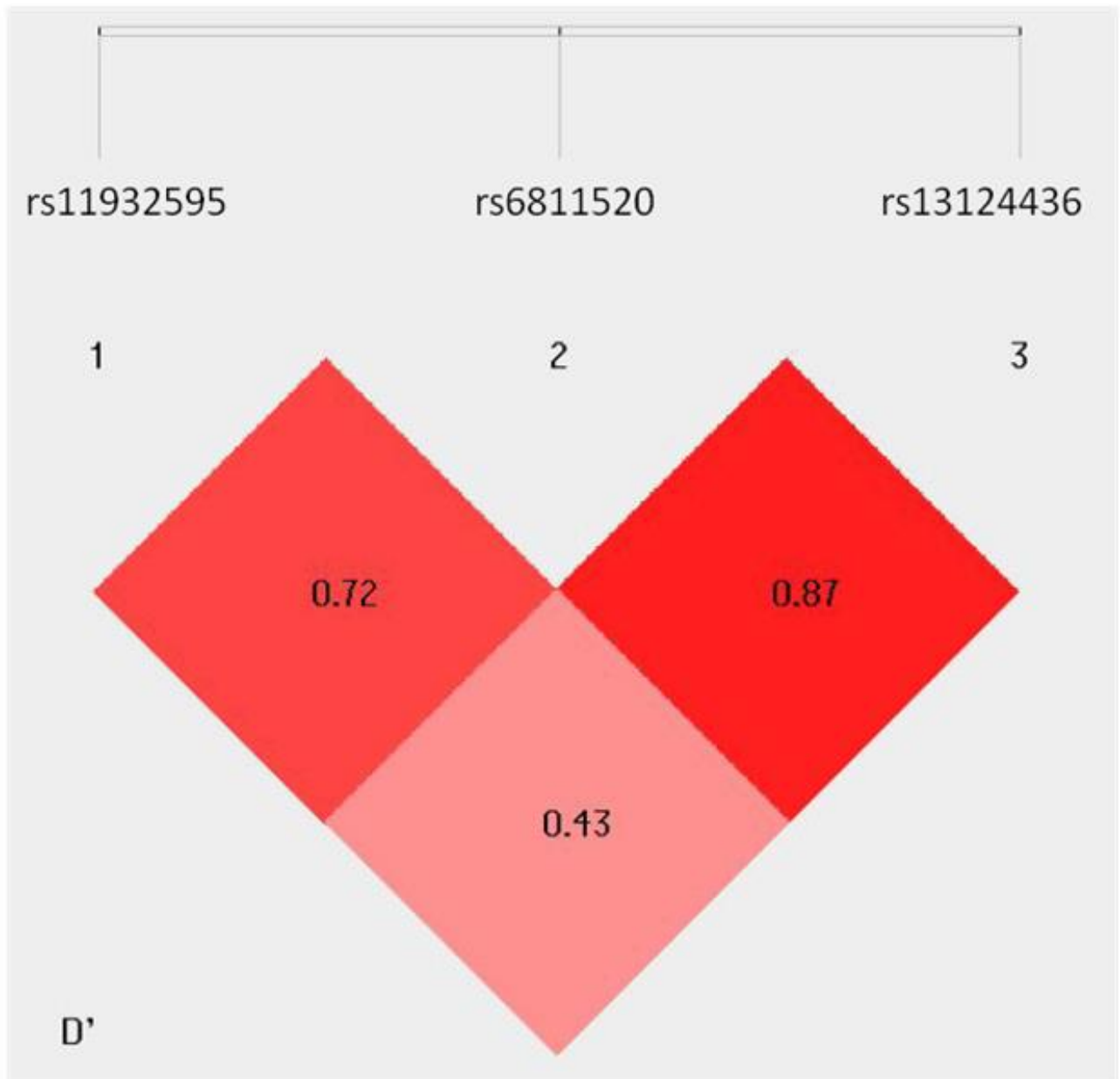
Slika 1. Učestalost genotipova istraživanih polimorfizama *CLOCK* gena.

Tablica 6. Raspodjela i učestalost genotipova polimorfizama *CLOCK* gena

SNP	Aleli		Genotipovi							
	1	2	Pacijenti s infarktom miokarda, broj ispitanika (%)			Kontrole, broj ispitanika (%)			P*	X <sup>2</sup>
			11	12	22	11	12	22		
rs11932595	A	G	73 (36,5 %)	99 (49,5 %)	28 (14 %)	70 (35 %)	104 (52 %)	26 (13 %)	0,878	0,26
rs6811520	C	T	75 (37,5 %)	94 (47 %)	31 (15,5 %)	62 (31 %)	80 (40 %)	58 (29 %)	0,005	10,5 5
rs13124436	A	G	22 (11 %)	86 (43 %)	92 (46 %)	14 (7 %)	83 (41,5 %)	103 (51,5%)	0,294	2,45

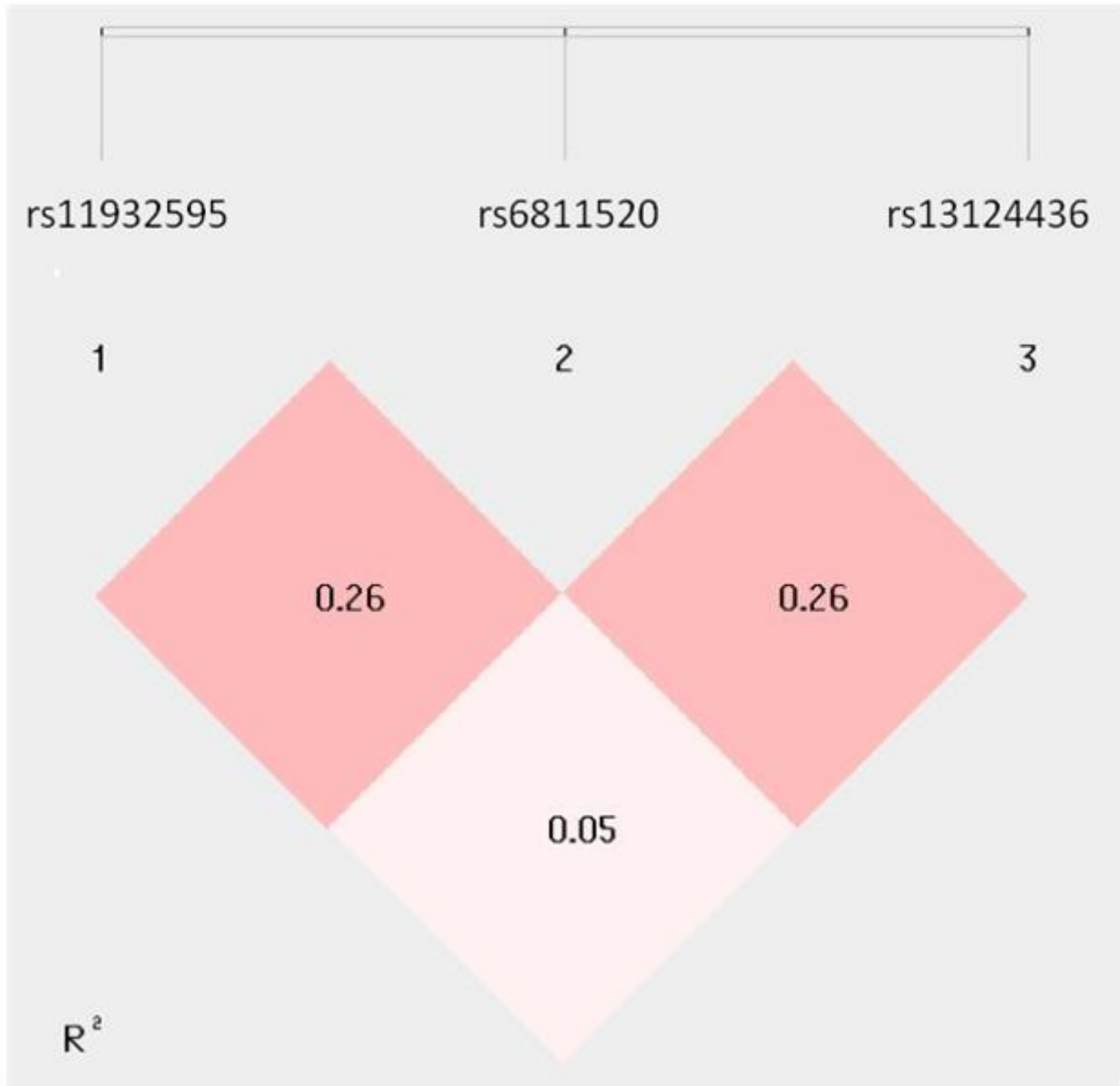
\*Pearsonov  $\chi^2$  test

Rezultati analize neravnoteže povezanosti istraživanih polimorfizama gena cirkadijanog ritma prikazani su na Slici 2. Ako je vrijednost relativnog koeficijenta vezane neravnoteže ( $D'$ ) bliže jedan, povezanost ispitivanih polimorfizama velika je. Na temelju  $D'$  iz Slike 2. vidljivo je da između rs681152 i rs13124436 postoji vrlo mala mogućnost rekombinacije.



Slika 2. Neravnoteža povezanosti polimorfizama *CLOCK* gena i relativni koeficijent vezane neravnoteže ( $D'$ ).

Na Slici 3. prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) između istraživanih polimorfizama pojedinih gena cirkadijanog ritma. Što je koeficijent korelacije bliže nuli, populacija je bliže ravnoteži. Populacija je najbliže ravnoteži za SNP-e rs681152 i rs13124436.



Slika 3. Povezanost polimorfizama *CLOCK* gena i koeficijent neravnoteže ( $R^2$ ).

Analizirani su haplotipovi *CLOCK* gena. Učestalosti predviđenih haplotipova prikazana je u Tablici 7. Statistički značajna razlika između ispitanika s infarktom miokarda i kontrolne grupe postoji za haplotip GTG *CLOCK* gena.

Tablica 7. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova kod ispitanika s infarktom miokarda i kontrolne skupine.

	rs11932595	rs6811520	rs13124436	Učestalost (pacijenti)	Učestalost (kontrolne)	P*
<b>1</b>	A	T	G	0,38	0,36	0,188
<b>2</b>	A	C	A	0,18	0,19	0,088
<b>3</b>	G	C	A	0,10	0,12	0,333
<b>4</b>	G	T	G	0,02	0,06	<b>0,002</b>

\*P vrijednosti dobivene su SNPStats programom za analizu haplotipova

Rezultati Mann-Whitneyjevog U testa o povezanosti čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti i polimorfizama *CLOCK* gena za skupinu pacijenata s infarktom miokarda i kontrolnu skupinu prikazani su u Tablici 8. Značajna razlika u polimorfizmu rs11932595 *CLOCK* gena pronađena je kod pacijenata s infarktom miokarda i dislipidemijom.

Tablica 8. Povezanosti čimbenika rizika za KVB i polimorfizama *CLOCK* gena

	<b>P vrijednost*</b>					
	<b>rs11932595</b>		<b>rs6811520</b>		<b>rs13124436</b>	
	Pacijenti	Kontrole	Pacijenti	Kontrole	Pacijenti	Kontrole
<b>Pušenje</b>	0,17	0,115	0,154	0,211	0,39	0,671
<b>Hipertenzija</b>	0,086	0,026	0,543	0,121	0,073	0,186
<b>Dislipidemija</b>	<b>0,01</b>	0,567	0,735	0,674	0,361	0,073
<b>Respiratorne bolesti</b>	0,086	0,05	0,154	0,388	0,797	0,82
<b>Dijabetes mellitus I</b>	0,58	0,549	0,024	0,381	0,797	0,956
<b>Dijabetes mellitus II</b>	0,713	-	0,234	-	0,552	-
<b>Bolesti štitne žlijezde</b>	0,921	0,855	0,747	0,314	0,88	0,514
<b>Bolesti bubrega</b>	0,974	0,448	0,186	0,068	0,254	0,224
<b>Bolesti jetre</b>	0,851	0,327	0,859	0,92	0,255	0,297
<b>Pozitivna obiteljska anamneza KVB-a†</b>	0,623	0,96	0,97	0,19	0,774	0,601
<b>Prijašnji KVB-i†</b>	0,157	0,79	0,479	0,456	0,039	0,463

\*Mann-Whitneyjev U test

†Kardiovaskularne bolesti

## 5. RASPRAVA

U istraživanju je napravljena analiza uzoraka 400 ispitanika, od toga 200 osoba s preboljenim infarktom miokarda tipa 1 i 200 kontrolnih ispitanika. Istraživanjem se pokušalo utvrditi postoji li razlika u genotipovima i haplotipovima *CLOCK* gena između tih dviju skupina.

U raznim dosadašnjim istraživanjima dokazane su cirkadijane varijacije tlaka, aktivnosti simpatičkog i parasimpatičkog sustava, vaskularnog tonusa, aktivnosti koagulacijskog sustava i izlučivanja različitih hormona. Svi ti čimbenici imaju bitnu ulogu u patogenezi infarkta miokarda. Veća pojava infarkta miokarda u jutarnjim i ranim prijedodnevničkim satima dokazuju bitnu ulogu cirkadijanog ritma i svih njegovih komponenata u nastanku infarkta miokarda. Ujutro su veće vrijednosti krvnog tlaka, dolazi do prevlasti aktivnosti simpatikusa nad parasimpatikusom, veći je tonus krvnih žila i prevladava stanje hiperkoagulabilnosti (46).

U nekim slučajevima infarkt miokarda ne pojavljuje se u jutarnjim i prijedodnevničkim satima, i tako pokazuje odstupanje od uobičajene cirkadijane varijacije. Ta odstupanja češća su kod osoba mlađe životne dobi, žena i osoba koje su uzimale antihipertenzivnu i antikoagulacijsku terapiju u večernjim satima (33, 47).

U ovom istraživanju analizirana su tri polimorfizma jednog nukleotida: rs11932595, rs6811520 i rs13124436. Rezultati istraživanja pokazali su da nema statistički značajne razlike u SNP-ovima rs13124436 i rs11932595 *CLOCK* gena kod pacijenata s infarktom miokarda i ispitanika iz kontrolne skupine. Statistički značajna razlika pronađena je kod SNP-a rs6811520. Analiziranjem frekvencije alela u skupini pacijenata s infarktom miokarda i kontrolnoj skupini uočeno je da su većina heterozigoti za polimorfizam rs11932595 i rs6811520 i homozigoti G / G za polimorfizam rs13124436.

U ovom istraživanju napravljena je i analiza mogućih haplotipova *CLOCK* gena. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika između ispitanika s infarktom miokarda i onih iz kontrolne skupine za haplotip GTG *CLOCK* gena. Iz analize neravnoteže povezanosti istraživanih polimorfizama jednog nukleotida *CLOCK* gena dobiveno je da postoji vrlo mala mogućnost rekombinacije između rs6811520 i rs13124436. Populacija je najbliže ravnoteži za polimorfizme rs6811520 i rs13124436.

U istraživanjima na modelima glodavaca prvo je dokazana povezanost mutacija gena cirkadijanog ritma s homeostazom glukoze, a kasnije s pretilošću, hiperglikemijom i hiperinzulinemijom. U istraživanjima na ljudima dokazano je da razni polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) *CLOCK* gena kao što su rs1464490, rs3749474, rs4864584, rs4580704, rs18012602 utječu na razvoj pretilosti, hiperglikemije i šećerne bolesti tipa 2. Pretilost i šećerna bolest predstavljaju značajan rizični čimbenik u razvoju kardiovaskularnih bolesti (2, 48).

U istraživanju na miševima s delecijom egzona 19 u *CLOCK* genu dokazano je da i dalje dolazi do formiranja heterodimera *CLOCK* / *ARNTL*, ali taj heterodimer ne može pokrenuti ekspresiju drugih gena. Miševi s tom mutacijom razvijaju metabolički sindrom s hiperfagijom, povišenom razinom leptina, hiperkolesterolemijom, hiperglikemijom i hipoinzulinemijom. Langerhansovi otočići u gušterači značajno su smanjeni kod miševa s mutacijom i smanjeno izlučuju inzulin potaknuto glukozom. Kod miševa s mutacijom pronađena je i veća količina masnog tkiva te veći adipociti. Endotelna disfunkcija otkrivena je na modelu miševa s mutacijom *CLOCK* gena. Trombomodulin i aktivator tkivnog plazminogena bitne su komponente koagulacijskog sustava i pod utjecajem su gena cirkadijanog ritma (49).

Postoji sve više dokaza o utjecaju cirkadijanog ritma na razvoj kardiovaskularnih bolesti. To je sve uočljivije zbog porasta broja kardiovaskularnih incidenata u današnjem načinu života koji uključuje sve više rada u noćnim smjenama, umjetno svjetlo, putovanja kroz više vremenskih zona i socijalne aktivnosti (47). Većina, a možda i svi metabolički procesi pokazuju dnevnu varijaciju. Poremećaji cirkadijanog ritma imaju ozbiljne posljedice za zdravlje pojedinca. Međutim povezanost između cirkadijanog ritma i raznih poremećaja još je nedovoljno razjašnjena (50). Cirkadijani ritam ne utječe samo na zdravlje nego i na učinak lijekova. Neki lijekovi za liječenje koronarne ishemijske bolesti pokazuju drugačiju učinkovitost ovisno o vremenu u danu kada su uzeti. U razvoju lijekova za ishemijsku koronarnu bolest trebala bi se uzeti u obzir i ta vremenska povezanost s učinkom lijeka (47).

U zadnje vrijeme sve je više istraživanja povezanih s ulogom cirkadijanog ritma u razvoju metaboličkog sindroma. Metabolički sindrom složeni je poremećaj koji značajno povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti, a osobito infarkta miokarda te povećava rizik od nastanka šećerne bolesti tipa 2 (također rizični čimbenik za razvoj infarkta miokarda). Pronađena je



povezanost *CLOCK* gena cirkadijanog ritma s metaboličkim poremećajima uključujući i metabolički sindrom (51). Na miševima s mutacijom gena cirkadijanog ritma dokazane su promjene u rasporedu hranjenja i hiperfagija, pretilost, hiperlipidemija, steatoza jetre i hiperglikemija (52). Otkrivena je povezanost polimorfizma rs1801260 *CLOCK* gena s načinom prehrane ljudi s metaboličkim sindromom te s metabolizmom inzulina kod tih ljudi (51).

Iz anamnestičkog upitnika dobiveno je da su pacijenti s infarktom miokarda češće imali dislipidemiju od onih iz kontrolne skupine. Značajna razlika u ovom istraživanju dobivena je za polimorfizam rs11932595 *CLOCK* gena kod pacijenata koji uz preboljeli infarkt imaju i dislipidemiju, koja predstavlja bitan rizični čimbenik u razvoju kardiovaskularnih bolesti. Povišene vrijednosti kolesterola osobito LDL-kolesterola i smanjenje HDL-kolesterola bitan su faktor rizika u nastanku ateroskleroze, a time i ishemijske koronarne bolesti, odnosno infarkta miokarda (6).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju ovog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji povezanost polimorfizma *CLOCK* gena i infarkta miokarda na temelju:

- Pronađena je određena razlika u SNP-u rs6811520 između pacijenata s infarktom miokarda i onih iz kontrolne skupine. Za polimorfizme rs11932595 i rs13124436 nije pronađena direktna povezanost.
- Dislipidemija predstavlja jedan od rizičnih čimbenika za razvoj infarkta miokarda. Dobivena je povezanost između polimorfizma rs11932595 i pacijenata koji su preboljeli infarkt miokarda, a uz to imaju i dislipidemiju.
- Pronađena je statistički značajna razlika između pacijenata s infarktom miokarda i kontrola za haplotip GTG gena *CLOCK*.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja.** Cilj je istraživanja utvrditi postoji li povezanost između polimorfizma gena *CLOCK* i infarkta miokarda.

**Nacrt studije.** Studija slučaja i kontrola.

**Ispitanici i metode.** U ovom istraživanju napravljena je analiza triju polimorfizama *CLOCK* gena u skupini pacijenata s infarktomiokarda i kontrolnoj skupini. U prvoj skupini bilo je 200 pacijenata s preboljenim infarktomiokarda (114 muškaraca i 86 žena) liječenih u Kliničkom bolničkom centru Osijek, a u drugoj skupini bilo je 200 ispitanika koji nisu preboljeli infarkt miokarda (103 muškaraca i 97 žena). Druga skupina regrutirana je od strane svog obiteljskog liječnika. Svim ispitanicima napravljena je genotipizacija za tri polimorfizma *CLOCK* gena (rs11932595, rs6811520 i rs13124436).

**Rezultati.** Rezultati istraživanja pokazali su da postoji određena povezanost između polimorfizama *CLOCK* gena i infarkta miokarda. Pronađena je povezanost SNP-a rs6811520 i infarkta miokarda, dok za SNP-ove rs11932595 i rs13124436 nisu dobiveni statistički značajni rezultati. Pronađena je razlika između ispitanika s infarktomiokarda i onih iz kontrolne skupine za haplotip GTG *CLOCK* gena. Statistički značajna povezanost dobivena je i za SNP rs11932595 *CLOCK* gena kod pacijenata koji uz preboljeni infarkt u povijesti bolesti imaju i dislipidemiju.

**Zaključak.** Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da polimorfizam *CLOCK* gena ima ulogu u nastanku infarkta miokarda

**Ključne riječi:** cirkadijani ritam; *CLOCK* gen; infarkt miokarda; polimorfizam jednog nukleotida

## 8. SUMMARY

*CLOCK* gene polymorphism in patients with myocardial infarction

**Objectives.** The goal of this research is to determine whether there is a connection between *CLOCK* polymorphism and myocardial infarction.

**Study design.** Case-control study.

**Participants and methods.** In this study, three polymorphisms of the *CLOCK* gene were analyzed in a group of patients with myocardial infarction and control group. In the first group there were 200 patients with myocardial infarction (114 males and 86 females) treated at Clinical Hospital Center Osijek, and in the second group there were 200 subjects who haven't had an infarction (103 males and 97 women). The second group was recruited by a family physician. All respondents were genotyped for three polymorphisms of the *CLOCK* gene (rs11932595, rs6811520 and rs13124436).

**Results.** The results of the study showed that there was a certain association between *CLOCK* polymorphism and myocardial infarction. Correlation was found between the rs6811520 polymorphism and myocardial infarction while the results for polymorphisms rs11932595 and rs13124436 were insignificant. Difference between patients with myocardial infarction and those in the control group was found for haplotype GTG in *CLOCK* gene. Statistically significant association was obtained for the polymorphism rs11932595 of *CLOCK* gene in patients with a history of heart attack and dyslipidemia.

**Conclusion.** From these results it can be concluded that the polymorphism of *CLOCK* gene has a role in the occurrence of myocardial infarction.

**Key words:** circadian rhythm; *CLOCK* gene; myocardial infarction; single nucleotide polymorphism

**9. LITERATURA**

1. Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mähönen M, Ngu Blackett K, i sur. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int J Epidemiol.* 2011;40:139-46.
2. Krušlin B, Nola M, Vučić M, Tomas D. Bolesti srca. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, urednici. *Patologija.* 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 255-302.
3. Šmalcelj A, Duraković Z. Poremećaji koronarnog krvotoka. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. *Patofiziologija.* 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 891-901.
4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, White HD. Third Universal definition of Myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60:1-18.
5. Mihatov Š. Akutni koronarni sindrom (bez ST-elevacije). U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina.* 4. izd. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 582-7.
6. Reiner Ž. Ateroskleroza. U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina.* 4. izd. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 568-73.
7. Nikolić Heitzler V. Infarkt miokarda (sa ST-elevacijom). U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina.* 4. izd. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 587-99.
8. Guyton AC, Hall JE, ur. *Medicinska fiziologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
9. Antonin B, ur. *Propedeutika interne medicine.* Zagreb: Medicinska naklada; 1977.
10. Pasternak RC, Branwald E. Akutni infarkt miokarda. U: Harrison TR, urednik. *Principi interne medicine.* Split: Placebo; 1997. str. 930-9.
11. Žmavc A. Akutni koronarni sindrom. U: Petrač B, urednik. *Hitna stanja pravodobno i pravilno.* Zagreb: Alfa; 2011. str. 45-8.
12. Mirat J. EKG u kliničkoj praksi. 1. izd. Osijek: Medicinski fakultet Osijek, Poliklinika Kardioton, Studio HS d.o.o.; 2014.
13. Alpert JS, Thygesen K, Antmann E, Bassand JP. Myocardial Infarction Redefined – A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:959-69.
14. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in Acute Cardiac Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1-11.

15. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, Ettinger SM, i sur. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-elevation Myocardial Infarction. *Circulation*. 2013;127:362-425.
16. Ernst A, Gašparović H. Revaskularizacija miokarda. U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina*. 4. izd. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 601-6.
17. Jelić I, Gašparović H. Ishemijska bolest srca. U: Tomislav Šoša i sur, urednici. *Kirurgija*. Zagreb: Naklada ljevak; 2007. str 823-30.
18. Steg G, James SK, Atar D, Badano LP, Borger MA, Di Mario C, i sur. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33:2569-619.
19. Ivanuša M. Sekundarna prevencija nakon akutnog infarkta miokarda: važnost kardiovaskularne rehabilitacije i farmakološkog liječenja. *Medicus*. 2015;25:127-31.
20. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian Rhythm Abnormalities. *Continuum (Minneapolis)*. 2013;19:132-47.
21. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:445-62.
22. Arendt J. Melatonin and human rhythm. *Chronobiol Int*. 2006;23:21-37.
23. Katzung BG. Histamin, serotonin i ergot alkaloidi. U: Katzung BG, urednik. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 271-91.
24. Trevor AJ, Way WL. Anksiolitici i sedativi-hipnotici. U: Katzung BG, urednik. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 371-86.
25. Rose KM, Fagin CM, Loren R. Sleep disturbances in dementia. What they are and what to do. *J Gerontol Nurs*. 2010;36:9-14.
26. Czeisler CA, Richardson GS, Martin JB. Poremećaji spavanja i dnevnih ritmova. U: Harrison TR, urednik. *Principi interne medicine*. Split: Placebo; 1997. str. 142-9.
27. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol Rev*. 2010;90:1063-102.
28. Karaganis S. Non-Ultradian Cardiac Rhythms: Circadian Regulation of the Heart. U: Vonend O, urednik. *Aspects of Pacemakers - Functions and Interactions in Cardiac and Non-Cardiac Indications*. InTech. 2011. str. 67-88.
29. Chung S, Jeong Lee E, Kyeong Cha H, Kim J, Kim D, Hoon Son G, i sur. Cooperative roles of the suprachiasmatic nucleus central clock and the adrenal clock in controlling circadian glucocorticoid rhythm. *Sci Rep*. 2017;7:1-10.

30. Martino TA, Sole MJ. Molecular time: An often Overlooked Dimension to Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2009;105:1047-61.
31. Gene Cards human gene database. Dostupno na adresi:<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CLOCK&keywords=CLoCK>. Datum pristupa: 19.4.2017.
32. Portaluppi F, Tiseo R, Smolendky MH, Hermida RC, Ayala DE, Fabbian F. Circadian rhythms and cardiovascular health. *Sleep Med Rev.* 2012;16:151-66.
33. Takeda N, Maemura K. Circadian clock and the onset of cardiovascular events. *Hypertens Res.* 2016;39:383-90.
34. Virage JAI, Lust RM. Circadian influences on myocardial infarction. *Front Physiol.* 2014;5:1-10.
35. Griffett K, Burris TP. The mammalian clock and chronopharmacology. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(7):1929–34.
36. Kanth R, Ittaman S, Rezkalla S. Circadian Patterns of ST Elevation Myocardial Infarction in the New Millennium. *Circulation.* 2013;11:66-72.
37. Chowta KN, Prijith PD, Chowta MN, Prabhu MV. Circadian Pattern in the Onset of Acute Myocardial Infarction. *JACM.* 2006;7:206-10.
38. Sheikh M, Murshad N, Majid A, Abid A, Malik S, Mallick N. Influence of circadian variations on onset and in-hospital outcome of first acute myocardial infarction. *Pakistan Hear J.* 2010;43:31–8.
39. Kolčić I. Istraživanje slučajeva i kontrola. U: Kolčić I, Vorko Jović A, urednici. *Epidemiologija.* 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str 65-78.
40. Dai X, Wiernek S, Evans JP, Runge MS. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World J Cardiol.* 2016;8:1-23.
41. QIAGEN. Dostupno na adresi:  
D:\\MyDocuments\\NastavaDODIPLOMSKA\\Korisnik\\Downloads\\HB-0329-003-1090246-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW.pdf. Datum pristupa 23.4.2017
42. Turnpenny PD, Ellard S. DNA-tehnologija i njezina primjena. U: Turnpenny PD, Ellard S, urednici. *Emeryjeve Osnove medicinske genetike.* 14. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str 53-71.
43. Thermo Fisher Scientific. Dostupno na adresi:  
<http://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html>. Datum pristupa 18.4.2017.

44. Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi Y. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers:update of the SHEsis. *Cell Res.* 2009;19:519-23
45. Sole X, Guino E, Valls J, Inesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics application note.* 2006;22:1928-9.
46. Rallidis LS, Triantafyllis AS, Sakadakis EA, Gialeraki A, Varounis C, Rallidi M, i sur. Circadian pattern of onset in patients  $\leq 35$  years presenting with ST- segment elevation acute myocardial infarction. *Eur J of InternMed.* 2015;26:607-10.
47. Chen I, Yang G. Recent advances in circadian rhythm in cardiovascular system. *Front Pharmacol.* 2015;6:1-7.
48. Corella D, Asensio EM, Coltell O, Sorlí JV, Estruch R, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, i sur. CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type – 2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial. Corella et al. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:1-12.
49. Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. A role for circadian clock in metabolic disease *Hypertens Res.* 2016;39:483-91.
50. Didner C, Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J Intern Med.* 2015;277:513-27.
51. Garcia-Rios A, Gomez-Delgado FJ, Garaulet M, Alcala-Diaz JF, Delgado-Lista FJ, Marin C, sur. Beneficial effect of CLOCK gene polymorphism rs1801260 in combination with low – fat diet on insulin metabolism in the patients with metabolic syndrome. *Chronobiol Int.* 2014;31:401-8.
52. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 2005;308:1043-5.



## 10. ŽIVOTOPIS

Vilma Pfeifer

Medicinski fakultet Osijek

J. Huttlera 4, 31000 Osijek

vpfeifer@mefos.hr

Datum i mjesto rođenja:

26. listopada 1992.

Osijek, Hrvatska

Kućna adresa:

Sjenjak 28, 31000 Osijek

tel: +385989136703

vilma.pfeifer@gmail.com

Obrazovanje:

- Od 2011. Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2007. – 2011. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- 1999. – 2007. Osnovna škola Mladost u Osijeku