

# Mutacije HFE gena kod pacijenata s infarktom miokarda

---

**Florijančić, Mirela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:152:156146>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Mirela Florijančić**

**MUTACIJE HFE GENA KOD  
PACIJENATA S INFARKTOM  
MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Mirela Florijančić**

**MUTACIJE HFE GENA KOD  
PACIJENATA S INFARKTOM  
MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

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

Mentorica rada: doc.dr.sc. Jasenka Wagner

Rad ima 39 listova, 11 slika i 10 tablica.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasenki Wagner i Ivani Škrlec, dipl. ing. na iskazanoj potpori i sugestijama tijekom istraživanja i izrade diplomskoga rada.

Velika hvala mojoj obitelji, posebno suprugu Tihomiru i sinu Svenu, na potpori, strpljenju i razumijevanju tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.2. Infarkt miokarda.....	1
1.2. HFE gen.....	2
1.3. Metabolizam željeza.....	3
1.4. Hemokromatoza.....	8
1.4.1. Nasljedna, primarna ili hereditarna hemokromatoza.....	8
1.4.1.1. Tip 1 hereditarne hemokromatoze.....	10
1.4.1.2. Tip 2 hereditarne hemokromatoze.....	13
1.4.1.3. Tip 3 hereditarne hemokromatoze.....	13
1.4.1.4. Tip 4 hereditarne hemokromatoze.....	14
<b>2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	15
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	16
3.1. Ispitanici.....	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Izolacija DNA.....	16
3.2.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	18
3.2.3. Statističke metode.....	23
<b>4. REZULTATI</b> .....	24
4.1. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela.....	24
4.2. Prikaz učestalosti alela s obzirom na spol.....	24
4.3. Prikaz učestalosti hipertenzije prema skupinama.....	25
4.4. Prikaz učestalosti hipertenzija prema spolu.....	27
4.5. Analiza haplotipova.....	27
<b>5. RASPRAVA</b> .....	29
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	32
<b>7. SAŽETAK</b> .....	33
<b>8. SUMMARY</b> .....	34
<b>9. LITERATURA</b> .....	35
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	39

## POPIS KRATICA

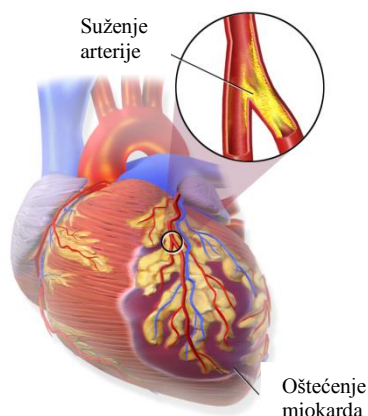
HH	Hereditarna hemokromatoza
RES	Retikuloendotelni sustav
TIBC	Ukupni kapacitet vezanja željeza, <i>total iron-binding capacity</i>
TfR	Transferinski receptor
$\beta_2$ M	Beta -2- mikroglobulin
DMT1	Divalentni transportera metala 1, <i>divalent metal transporter 1</i>
JH	Juvenilna hemokromatoza
HJV	Hemojuvelin
PCR	Lančana reakcija polimeraze, <i>polimerase chain reaction</i>
FRET	Prijenos rezonantne fluorescentne energije, <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida, <i>single nucleotid polymorphism</i>

## 1. UVOD

### 1.1. Infarkt miokarda

Infarkt miokarda jest nekroza srčanoga mišića uzrokovana trombozom ili embolijom ogranka koronarne arterije (1). Vrlo je ozbiljno stanje koje u oko 25% oboljelih ima smrtni ishod, a uzrok je 2/3 smrtnih slučajeva kod koronarnih bolesti srca. Razvoju infarkta miokarda pogoduje nekoliko čimbenika: pretjerano uzimanje hrane, pretilost, uzimanje većih količina masti u hrani, hiperlipidemija, hipertenzija, pušenje, šećerna bolest, nefroza, tjelesna neaktivnost i emocionalni stresovi. Ako u neke osobe istodobno djeluje više takvih rizičnih čimbenika, povećava se i vjerojatnost nastanka infarkta (2). Infarkt miokarda češće se pojavljuje u muškaraca nego u žena, jer se smatra da su žene do menopauze zaštićene estrogenima. Mehanizam njegova nastanka uključuje prekid cirkulacije kroz koronarne krvne žile (3). Akutni infarkt miokarda najčešće uzrokuje ateroskleroza, a rjeđi su uzroci arteritis, embolija, spazam, trauma, tromboza, disproporcija potrebe i opskrbe kisikom te konzumacija kokaina. Osnovna je promjena u akutnom infarktu miokarda gubitak funkcije zahvaćenoga dijela miokarda (4). Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije dijagnoza akutnoga infarkta miokarda temelji se na nalazu dvaju od tri kriterija: boli u prsima koja traje više od 30 minuta, specifične promjene elektrokardiograma te povišene razine MB frakcije kreatin kinaze (CKMB) u krvi (5) odnosno biokemijskoga markera troponina. U aktualnim smjernicama Europskoga kardiološkoga društva i *American College of Cardiology* u sklopu redefinicije dijagnoze infarkta miokarda, povišene vrijednosti troponina uvjet su za postavljanje dijagnoze infarkta miokarda. Troponin I i T imaju izoformne oblike koji su jedinstveni za miocite stoga je njihova povišena razina bitna za postavljanje dijagnoze infarkta miokarda. Povišena vrijednost troponina definirana je kao vrijednost koja prelazi 99. percentil referentne populacije (gornja referentna granica). Koncentracija troponina određuje se pri prvoj procjeni te ponavlja nakon 3 – 6 sati. Nakon toga ponovno se određuje ukoliko se nastavljaju ishemijske epizode ili ukoliko je nejasno vrijeme početnih simptoma (6).





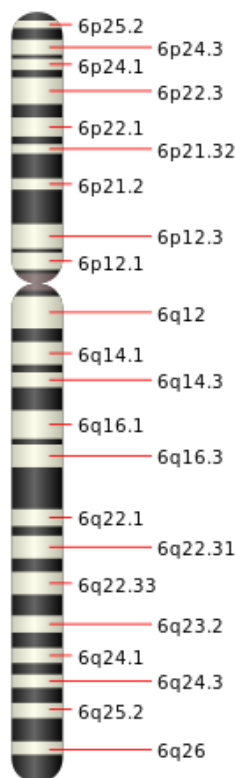
Slika 1. Infarkt miokarda

(Prilagođeno prema: [https://en.wikipedia.org/wiki/Myocardial\\_infarction](https://en.wikipedia.org/wiki/Myocardial_infarction); pristup 26. 9. 2015.)

Željezo također može imati ulogu u nastanku ateroskleroze (7). Povećano nakupljanje ovoga metala u tkivu može biti štetno jer dvovalentno željezo u reakciji s vodikovim peroksidom stvara slobodne radikale koji u reakciji sa staničnom membranom i organelama može dovesti do razvoja ateroskleroze pokretanjem lipidne peroksidacije (8).

## 1.2. HFE gen

Godine 1996. pronađen je *HFE* gen blizu HLA regije na kromosomu 6 (9). Službeno ime gena je „hemokromatoza“, a službeni simbol *HFE* (10). *HFE* osigurava upute za stvaranje proteina smještenih na površini stanica crijeva, jetre i nekih stanica imunskog sustava, a važne za regulaciju apsorpcije željeza iz tankoga crijeva. Osim toga, HFE protein sudjeluje i u kontroli razine hepcidina, proteina vrlo važnoga za regulaciju željeza u organizmu. Dovoljna količina hepcidina štiti organizam od prekomjerne apsorpcije željeza, kao i prekomjernoga skladištenja željeza u tkiva i organe. *HFE* gen smješten je na kratkom kraku kromosoma 6 na poziciji 21.3 (11).



Slika 2. Kromosom 6.

(Izvor: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Kromosom\\_6](https://hr.wikipedia.org/wiki/Kromosom_6) (Čovjek); pristup: 26.9.2015.)

### 1.3. Metabolizam željeza

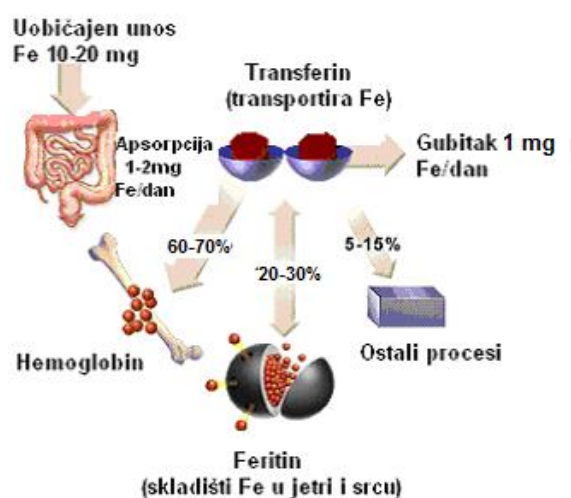
Željezo u svakoj stanici tijela ima značajnu ulogu u oksidativnom metabolizmu, rastu i proliferaciji te transportu i pohrani kisika. Da bi služilo tim funkcijama, mora biti vezano za proteinske komponente. Ako količina željeza prijeđe tjelesni kapacitet transporta i pohrane, može doći do toksičnoga učinka koji uzrokuje oštećenje stanica. U obrnutom slučaju, ako je premalo željeza na raspolaganju, ograničena je sinteza fiziološki aktivnih spojeva te dolazi do inhibicije važnih metaboličkih procesa.

#### Distribucija

Spojevi koji sadrže željezo u organizmu imaju važne funkcije: oni koji sudjeluju u metabolizmu (hemoglobin) ili s enzimatskom funkcijom (proteini koji vežu željezo) i spojevi

koji sudjeluju u transportu (transferin, transferinski receptor) ili pohrani željeza (ferritin, hemosiderin) (12).

Tijelo odrasla čovjeka sadržava oko 3,5 - 4,5 grama željeza. Najveći dio od toga, 65-70% (oko 3 g), nalazi se u hemoglobinu, 3-5 % u mioglobinu, a oko 20-30 % uskladišteno je u retikuloendotelnom sustavu, jetri, bubrezima, slezeni i koštanoj srži. Ostatak željeza nalazi se u citokromima, katalazi i peroksidazi, a krvni serum sadržava vrlo malo željeza, oko 2,5 mg. Mokraćom se izlučuje oko 50 µg željeza, a ostatak stolicom, tako da je ukupni dnevni gubitak željeza oko 1 mg. To ukazuje da organizam vrlo uspješno štedi željezo.



Slika 3. Unos željeza u organizam

(Prilagođeno prema: <http://zdravlje.eu/2011/02/22/unos-zeljeza-u-organizam/>; pristup 3. 10. 2015.)

### Apsorpcija

Željezo se u organizam unosi hranom kao trovalentno željezo kojemu kiselina iz želučanoga soka stvara pogodnu kiselu sredinu te pomaže redukciju u dvovalentno željezo (13). Samo se takvo željezo može apsorbirati u sluznicu tankoga crijeva. Apsorpciju pomaže i vitamin C kao reducens (14), a ono ovisi o količini željeza u unesenoj hrani, a i o obliku unesenoga željeza (12).

Dvovalentno željezo ulazi u epitelne stanice crijevne mukoze (enterocite), gdje se oksidira u trovalentno pomoću enzima feroreduktaze, za razliku od željeza prisutnoga u hemu koje se oslobađa uz pomoć unutarstaničnoga enzima hemoksigenaze (15). Da bi željezo dospjelo u krv, mora iz lumena crijeva proći kroz apikalnu i bazolateralnu membranu enterocita.

Taj se proces odvija uz pomoć proteina visokospecifičnih za jednosmjerni transport željeza. Transport dvovalentnoga željeza kroz membranu enterocita odvija se uz pomoć dvovalentnoga transportera metala 1 (DMT 1, engl. *divalent metal transporter 1*) (16). Većina unutarstaničnoga željeza skladišti se, dok se jedan dio prenosi u cirkulaciju pomoću feroportina (15). Feroportin se nalazi na bazolateralnoj membrani enterocita. Tkivno je specifičan te se nalazi samo u tkivima koja otpuštaju željezo u krv poput enterocita, makrofaga i stanica placente. Feroportin je reguliran peptidom hepcidinom koji proizvodi jetra (16).

Željezo iz hema oslobađa se iz mioglobina i hemoglobina uz pomoć pankreasnih enzima u lumen želuca te u obliku metaloporfirina procesom endocitoze prolazi membranu enterocita. U enterocitima enzim hemoksigenaza cijepa porfirinski prsten i oslobađa se atom željeza (17).

## Prijenos

Kada željezo dođe u cirkulaciju veže se za transportne proteine koje proizvodi jetra: albumini, laktoferini i transferin (15). Transferin posreduje izmjeni željeza između tkiva (12), pri čemu jedna molekula transferina prenosi dva atoma željeza (18). U plazmi ima dovoljno transferina da veže 253-435  $\mu\text{g}$  željeza po decilitru plazme, što predstavlja ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. *total iron-binding capacity*, TIBC). Koncentracija je željeza u serumu 70-201  $\mu\text{g}/\text{dL}$  i gotovo je cjelokupno željezo (95 %) u kompleksu s transferinom, što znači da je jedna trećina transferina zasićena željezom ( $\text{serumsko željezo}/\text{TIBC} \times 100 = \% \text{zasićenosti transferina}$ ). Pričuvni kapacitet vezanja željeza predstavlja nezasićeni kapacitet (engl. *unsaturated iron-binding capacity*, UIBC).

Većina željeza vezanoga za transferin biva prenesena u koštanu srž za razvoj normoblasta, gdje se ono iskorištava za sintezu hemoglobina. Željezo u suvišku pohranjuje se u tkivima. Većina je toga željeza reciklirano željezo iz monocito-makrofagnoga sustava, dok je manji dio unesen apsorpcijom.

Transferin otpušta željezo na specifične receptore na stanicama u razvoju, odnosno transferinske receptore (TfR). TfR je transmembranski glikoproteinski dimer s dvije identične podjedinice, a svaka od njih veže po jednu molekulu transferina. Nakon ulaska transferina u stanicu u kiselom se endosomu željezo otpušta s transferina koji se zatim transportira natrag u cirkulaciju (12).

## Skladištenje

Željezo se pohranjuje u obliku feritina i hemosiderina. Feritin u hepatocitima i makrofagima osigurava pričuve željeza dostupne za sintezu hemoglobina (19). Hemosiderin je heterogeni agregat proteina i željeza i zapravo je izveden iz feritina (12). Kao i feritin, hemosiderin se najčešće nalazi u stanicama jetre, slezene i koštane srži, no za razliku od njega, nije topiv u vodi.

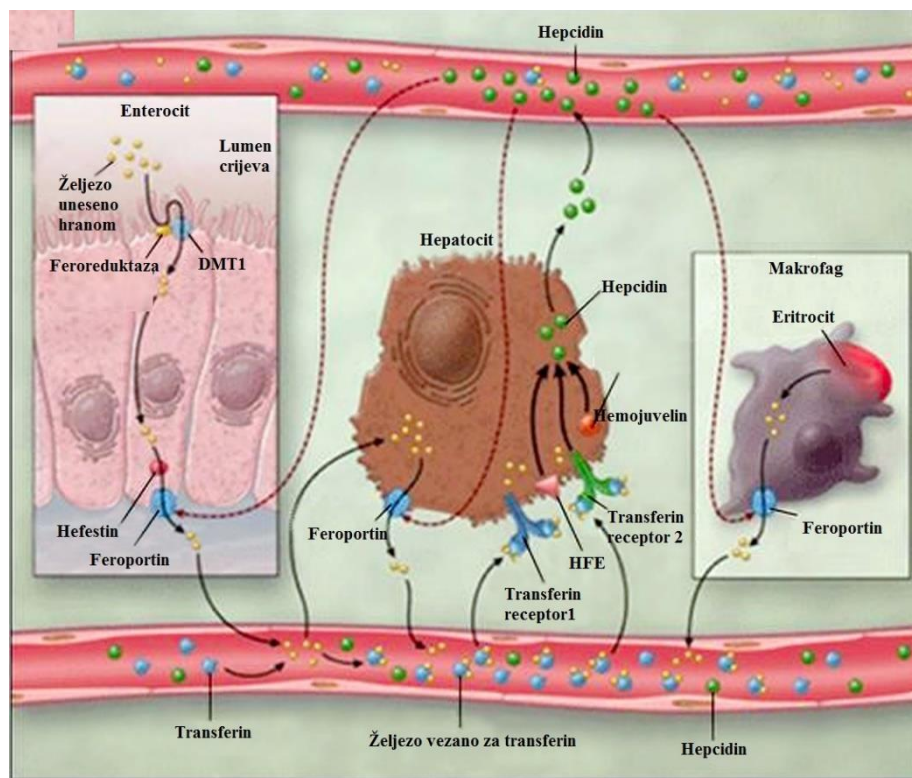
## Regulacija homeostaze željeza

U zdravih osoba količina željeza regulirana je njegovim gubitkom iz organizma i kontrolom količine njegove apsorpcije iz intestinalnoga trakta, za što je odgovoran hepcidin (19).

## Hepcidin

Jetra je glavni organ za skladištenje željeza, a istovremeno i proizvodi proteine važne za metabolizam željeza, poput hepcidina. Hepcidin je peptid sastavljen od 25 aminokiselina. Ime je dobio po mjestu nastanka u jetri (hep-) i svojim antimikrobnim svojstvima *in vitro* (-cidin). Gen koji kodira hepcidin (HAMP) nalazi se na kromosomu 19q13 (20). Glavni je regulatorni protein homeostaze željeza. Regulira intestinalnu apsorpciju željeza te oslobađanje željeza iz enterocita, makrofaga hepatocita i stanica placente. Povećanje koncentracije hepcidina u krvi zaustavlja apsorpciju željeza iz crijeva, a i oslobađanje željeza iz hepatocita, makrofaga i trofoblata, što rezultira padom koncentracije željeza u krvi i somatskim stanicama, posebno u eritropoetskim stanicama (16). Proizvodnja hepcidina inducirana je i interleukinom-6 tijekom upalnih reakcija, što rezultira hipoferemijom (21).

Hepcidin se veže za feroportin na staničnoj membrani, što rezultira internalizacijom i degradacijom feroportina u stanici. Zbog smanjene količine feroportina enterociti nisu u mogućnosti otpustiti željezo u krv te željezo biva izgubljeno u lumenu tankoga crijeva. Na isti takav način željezo izlazi iz makrofaga, hepatocita i trofoblata. Ukoliko je koncentracija hepcidina visoka, željezo će ostati zarobljeno u tim stanicama, i obratno (16).



Slika 4. Apsorpcija i transport željeza.

(Prilagođeno prema: <http://www.hindawi.com/journals/ah/2010/272940/fig1/>; pristup 3. 10. 2015.)

Koncentracija hepcidina regulirana je molekulama poput transferin receptora 2, HFE (produkt gena) i hemojuvelina. Tako na primjer osobe koje imaju mutaciju HFE gena ne proizvode hepcidin kao odgovor na oralni unos željeza kao što je to slučaj kod osoba bez te mutacije (22).

HFE je transmembranski protein koji se primarno nalazi u hepatocitima, hematopoetskim stanicama, i stanicama duodenuma. U metabolizmu željeza tvori kompleks sa TfR1 na staničnoj membrani. Kada se povisi razina transferina, kao u stanjima unosa željeza, transferin se zamijeni sa HFE iz TfR1 te slobodni HFE može stupiti u interakciju sa TfR2, koji također može vezati transferin. Tako TfR1 i TfR2 komuniciraju preko HFE. HFE-TfR2 kompleks jest senzor za prijenos željeza kao dio signalne kaskade u sintezi hepcidina (23).

## 1.4. Hemokromatoza

Hemokromatoza je poremećaj metabolizma željeza koji dovodi do nakupljanja prekomjerne količine željeza u parenhimskim stanicama različitih organa, što dovodi do progresivnoga oštećenja tkiva i poremećaja njihova rada (24). Simptomi hemokromatoze uključuju: brončanu boju kože, cirozu, šećernu bolest, artropatije, hipogonadotropni hipogonadizam te kardiomiopatije (19). Hemokromatoza može biti primarna i sekundarna. Primarna (hereditarna) hemokromatoza poremećaj je koji nastaje zbog mutacija gena koji kodiraju proteine ključne u održavanju homeostaze željeza, a konačni je učinak povećana apsorpcija željeza u crijevu. Sekundarna je hemokromatoza poremećaj pri kojem dolazi do prekomjernoga nakupljanja željeza zbog anemija povezanih s neučinkovitom eritropoezom ili čestim transfuzijskim liječenjem (24).

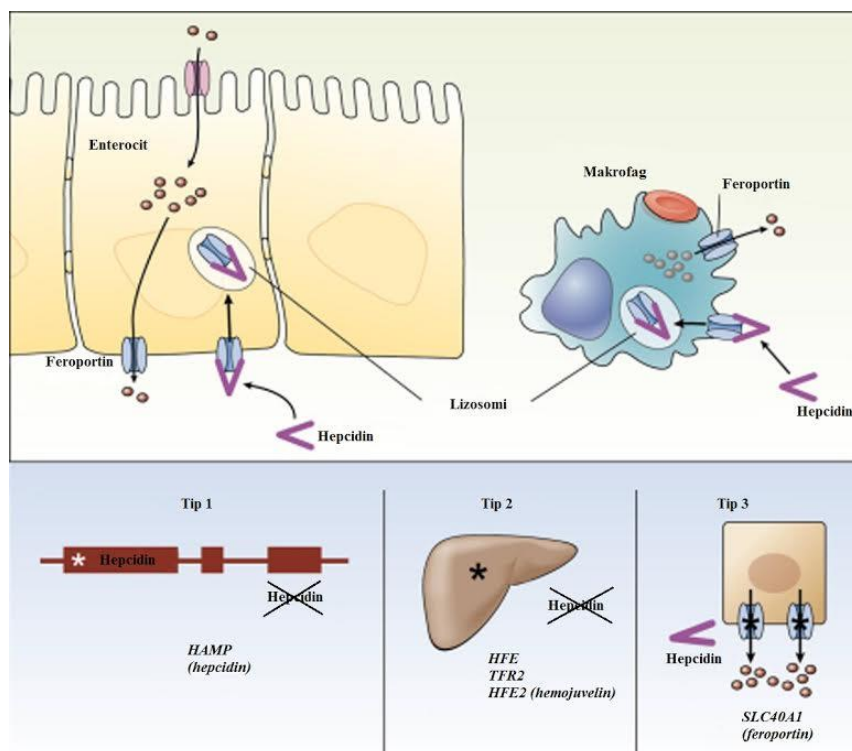
### 1.4.1. Nasljedna, primarna ili hereditarna hemokromatoza

Nasljedna hemokromatoza (HH) jest autosomno recesivna bolest i najčešći genetski poremećaj u Europi i Americi. Glavni su uzrok jedna ili dvije točkaste mutacije gena HFE na 6. kromosomu (6p21) (25). Prema bazi podataka OMIM (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*) postoje četiri tipa te hemokromatoze, od kojih je svaka uzrokovana mutacijom različita gena (tablica 1.) (24).

Dominantni oblik HH uzrokovan mutacijom poput C282Y u HFE klasificiran je kao Tip 1 HH. Ostali su tipovi:

- Tip 2A HH uzrokovan mutacijom u genu za hemojuvelin, što za posljedicu ima gubitak regulacije hepcidina koja rezultira povećanom apsorpcijom željeza
- Tip 2B HH uzrokovan mutacijom u genu za hepcidin, što za posljedicu ima nedostatak hepcidina ili njegovu neaktivnost
- Tip 3 HH udružen je s mutacijom u genu za transferinski receptor 2, što vodi smanjenju hepcidina

Tip 4, nazvan i feroportinska bolest, za razliku od ostalih tipova HH autosomno je dominantan te smanjuje transport željeza, što za posljedicu ima nakupljanje željeza u stanicama retikuloendotelna sustava (RES-a) (15).



Slika 5. Hepcidin i hemokromatoza

(Prilagođeno prema: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/112/2/219.full.pdf>; pristup 3.10.2015.)

(A) Prikazana je aktivnost hepcidina. Ferroportin kao cilj na enterocitima i makrofagima. Hepcidin se veže za ferroportin i uzrokuje njegovu internalizaciju i lizosomalnu razgradnju.

(B) Tri tipa hemokromatoze koja nastaju zbog poremećaja hepcidin/feroportin:

Tip I, poremećaj u genu hepcidina (HAMP) sprječava ekspresiju hepcidina

Tip II, mutacija HFE, TFR2 ili HFE2 gena sprječava ekspresiju hepcidina

Tip III, poremećaj gena za ferroportin, sprječava ekspresiju hepcidina.



Tablica 1. Podjela hereditarnih/nasljednih hemokromatoza prema bazi podataka OMIM (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*)

	<b>HFE-hemokromatoza</b>	<b>Juvenilna hereditarna hemokromatoza</b>		<b>TfR2-hemokromatoza</b>	<b>Feroportinska hemokromatoza</b>
Klasifikacija OMIM	Tip 1	Tip 2A	Tip 2B	Tip 3	Tip 4
Mutrani gen i lokus	HFE, 6p21.3	HJV, 1q21	HAMP 19q13.1	TfR2, 7q22	SLC40A1, 2q32
Genski produkt Naziv	HFE	hemojuvelin (HJV)	hepcidin	transferinski receptor 2	feroportin
Uloga	međudjelovanje s TRF1 koji olakšava unos željeza vezanoga za transferin	nepoznata, moguće je da modelira ekspresiju hepcidina	silazna regulacija otpuštanja željeza iz enterocita i makrofaga	unos željeza u hepatocit	iznošenje željeza iz enterocita, makrofaga ili hepatocita
Način nasljeđivanja	autosomno-recesivno	autosomno-recesivno	autosomno-recesivno	autosomno-recesivno	autosomno-dominantno
Raspodjela željeza u organizmu	parenhimna	parenhimna	parenhimna	parenhimna	RES
Vjerojatnost znatnoga oštećenja gena	različita	visoka	visoka	različita	niska
Početak simptoma	40-50 godina	20-30 godina	20-30 godina	40-50 godina	40-50 godina

#### 1.4.1.1. Tip 1 hereditarne hemokromatoze

Tip 1 HH najčešći je oblik preopterećenja željezom. Osnovni je poremećaj povećana apsorpcija željeza iz crijeva (16). Uzrok mu je mutacija *HFE* gena, koji se nalazi na 6. kromosomu. Mutacija zahvaća jednu bazu i dovodi do zamjene tirozina cisteinom na položaju 282 proteina HFE (C282Y). Sve osobe homozogoti C282Y genetički su predodređene za nastanak niza promjena u metabolizmu željeza koje mogu dovesti do njegova prekomjernoga nakupljanja i oštećenja tkiva. Nemoguće je predvidjeti hoće li mutacija i u kolikoj mjeri dovesti i do fenotipskih promjena. Ekspresija bolesti pod utjecajem je različitih čimbenika, poput unosa alkohola, menstruacije, trudnoće, masne jetre, virusnoga hepatitisa ili drugih bolesti povezanih s povećanim nakupljanjem željeza. Osim mutacije C282Y *HFE* opisane su još dvije mutacije: zamjena histidina aspartatnom kiselinom na položaju 63 (H63D) i zamjena cisteina serinom na položaju 65 (S65C) (24). Od tih triju mutacija, mutacija C282Y u homozigotnom statusu ima

najveću penetraciju. Mutacije H63D i S65C manje su penetrantne i imaju manju vjerojatnost razvoja bolesti.

Oko 60-90 % oboljelih Europljana homozigoti su za mutaciju C282Y (YY), 3-8 % složeni su heterozigoti (CY/HD), dok se homozigoti za mutaciju H63D (DD) javljaju u < 1 % oboljelih (26).

Molekularna patogeneza obuhvaća disfunkcionalnu kontrolu koncentracije željeza u plazmi od strane Tfr-HFE- $\beta_2$ M kompleksa na bazolateralnoj membrani enterocita, što rezultira povećanom apsorpcijom željeza te povećani transport željeza posredovan feroproteinom, koji je uzrokovan nedostatkom hepcidina.

U osoba s normalnom apsorpcijom željeza „wild“ tip HFE protein veže se za TFR i  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $\beta_2$ M), što rezultira apsorpcijom unesenoga željeza iz enterocita u onoj mjeri kolike su potrebe organizma za željezom. Prema jednoj teoriji, u osoba s mutiranim C282Y ne dolazi do vezanja za  $\beta_2$ M, te se stoga kompleks  $\beta_2$ M-HFE ne veže za TFR na membrani enterocita, što za posljedicu ima smanjenje saturacije transferina u krvi. Posljedično dolazi do ekspresije velikih količina DMT 1 zbog potrebe za željezom. Prema drugoj teoriji uzrok je nastanka HH nedostatak hepcidina, na što i ukazuje snižena koncentracija hepcidina u osoba s HH, a što dalje ukazuje na to da je *HFE* gen potreban za normalnu regulaciju sinteze hepcidina (16).

Bolest je karakterizirana sporim progresivnim nakupljanjem željeza u različitim organima. U većine pacijenata dijagnoza se postavlja nakon pojave prvih kliničkih simptoma te povišene saturacije transferina ili povišene razine serumskoga feritina. Rani klinički simptomi uključuju kronični umor, bol u mišićima ili zglobovima, smanjeni libido, letargiju i hepatomegaliju. Klinička ekspresija bolesti češće se javlja u muškaraca nego u žena koje zahvaljujući menstrualnom ciklusu i trudnoći imaju veći gubitak željeza, te stoga do razvoja kliničkih simptoma dolazi mnogo kasnije u životu (20). Bolest najčešće zahvaćen organ jest jetra. Progresivno nakupljanje željeza uzrokuje hepatomegaliju, povišene jetrene enzime te razvoj fibroze i konačno cirozu jetre. Hepatocelularni karcinom javlja se u 30 % bolesnika s cirozom i najčešći je uzrok smrti u liječenih bolesnika. Splenomegalija se javlja u oko polovine simptomatskih bolesnika. Šećerna bolest prisutna je u 50 % bolesnika, i to češće u onih koji imaju obiteljsku predispoziciju za razvoj bolesti. Artropatija se razvija u 25 – 50 % bolesnika.

Promjene najčešće zahvaćaju II. i III. metakarpofalangealni zglob ruke s karakterističnim radiološkim promjenama – uglasti krajevi kostiju uz osteofite „poput udice“

(engl. *square bone ends and hook-like osteophytes*) (24). Taloženje željeza u miokard uzrokuje ventrikularnu dilataciju i smanjenu frakciju izbacivanja, što se klinički manifestira kao kongestivno zatajenje srca i promjene njegova ritma. Sekundarni hipogonadizam nastaje zbog taloženja željeza u hipofizi (26).

Dijagnoza se postavlja na temelju trijade povišenih vrijednosti serumskoga željeza, feritina i saturacije transferina, a u konačnici se potvrđuje molekularnom analizom mutacije *HFE* gena (20). Analiza mutacije *HFE* smanjuje potrebu za biopsijom jetre, koja je bitna u slučajevima kada treba utvrditi stupanj fibroze ili ciroze u homozigota za C282Y. Neinvazivne tehnike poput magnetne rezonance upotrebljavaju se kod osoba koje su heterozigoti C282Y da bi se utvrdio stupanj opterećenja jetre željezom ili u svrhu postavljanja dijagnoze neklasične hemokromatoze (27).

S obzirom na to da je HH najčešća genetska bolest, danas se ozbiljno razmišlja o testiranju populacija. Model korelacije genotipa i fenotipa upućuje na to da je genetski defekt prisutan pri rođenju, ali se klinički simptomi pojavljuju u adolescenata i kasnijoj životnoj dobi. Optimalna je dob za takvo testiranje od 18 do 30 godina, kada hemokromatoza postaje očita iz vrijednosti testiranja željeza u krvi, a još ne nastaje oštećenje organskih sustava. Ako se hemokromatoza na vrijeme ne dijagnosticira i ne liječi, može doći do ciroze i zatajenja jetre. Neki od takvih bolesnika kandidati su za presađivanje jetre (26).

Osnova liječenja hemokromatoze jesu venepunkcije. To je ujedno i najjednostavniji, najučinkovitiji i najjeftiniji način liječenja. Prema zaključku Radne skupine za liječenje hemokromatoze liječenje treba započeti u svih bolesnika koji su homozigoti ili heterozigoti za HH ili imaju fenotip za hemokromatozu bez obzira na genotip ako je feritin: >200 µg/L u žene ili osobe mlađe od 18 godina, odnosno >300 µg/L u muškaraca. Poželjno je da se skladišta željeza u bolesnika isprazne što je prije moguće. U tom smislu tijekom prve dvije godine liječenja potrebna je jedna venepunkcija tjedno po 500 mL krvi s obzirom na to da se ukupno treba odstraniti 25 g željeza (500 mL krvi sadržava 200-250 g željeza) (24). Bitno je naglasiti da pacijenti, kod kojih se s venepunkcijama počne prije nastanka ireverzibilnoga oštećenja organa, imaju normalan životni vijek (28). Učinak liječenja prati se određivanjem hematokrita, saturacije transferina i koncentracije feritina. Kelirajući agens deferoksamin induciran je u slučajevima kada anemija ili hipoproteinemija onemogućavaju liječenje venepunkcijama.

Osnovni preduvjet prognoze u bolesnika s hemokromatozom jest ciroza jetre. U simptomatskih bolesnika bez znakova ciroze jetre uvođenje liječenja bitno produljuje preživljavanje s 33 % na 89 %. U tih se bolesnika povlače simptomi bolesti: smanjuje se veličina

jetre i slezene, funkcija jetre i srca popravlja se te se smanjuje pigmentacija kože. Šećerna bolest popravlja se u oko 40 % bolesnika, a terapija ima najmanje učinka na hipogonadizam i artropatiju. Ciroza jetre ireverzibilno je stanje te je u konačnici transplantacija jetre terapijska mogućnost. Kod uznapredovaloga stadija bolesti najčešći su uzroci smrti srčano zatajenje, hepatocelularni karcinom te komplikacija ciroze jetre i šećerne bolesti. Ako se terapija pravodobno uvede i redovito provodi, u asimptomatskih bolesnika može se spriječiti klinička pojava bolesti, a životni vijek nije skraćen (24).

#### 1.3.1.2. Tip 2 hereditarne hemokromatoze

Tip 2 ili juvenilna hemokromatoza (JH) rijedak je autosomno-recesivni poremećaj koji podjednako zahvaća muškarce i žene. Karakteriziran je rapidnim preopterećenjem željezom koje uzrokuje teška organska zatajenja već prije navršene tridesete godine života.

Simptomi i laboratorijski nalazi su kao i kod hemokromatoze tipa 1, a najčešća je posljedica u neliječene bolesti zatajenje srca i/ili jake aritmije te je stoga to i najčešći uzrok prerane smrti pacijenta. U težim slučajevima potrebno je presađivanje srca.

Postoje dva tipa JH: 2A i 2B. Uzrok tipa JH 2A jest mutacija gena za hemojuvelin (HJV) lociranoga na kromosomu 1q21, a čiji je produkt protein hemojuvelin. Tip JH 2B mnogo je teži oblik bolesti, a uzrok je mutacija gena HAMP koji kodira hepcidin.

Osobe koje su heterozigoti nemaju simptome bolesti te imaju normalne nalaze svih parametara željeza za razliku od homozigota (19).

#### 1.3.1.3. Tip 3 hereditarne hemokromatoze

Tip HH 3 jest autosomno-recesivna bolest uzrokovana mutacijama gena TFR2. Karakterizirana je povišenom razinom serumskoga feritina, povišenom saturacijom transferina i preopterećenjem jetre željezom. Većina su pacijenata heterozigoti za dvije različite mutacije TFR2. Gen TFR2 kodira receptor TfR-2, protein koji posreduje unos željeza vezanoga za transferin. Povećana apsorpcija željeza u toj hemokromatozi posljedica je spriječene ekspresije hepcidina (19).

#### 1.3.1.4. Tip 4 hereditarne hemokromatoze

Tip 4 hemokromatoze jest autosomno-dominantna bolest kojoj je uzrok mutacije u genu koji utječe na feroportin, SLC40A1, transmembranski protein kojemu je funkcija iznošenje željeza iz makrofaga, enterocita i hepatocita. Kako mu je funkcija smanjena, dolazi do nakupljanja željeza u tim stanicama, što za posljedicu ima visoki serumski feritin u kombinaciji sa sniženom saturacijom transferina (16).

## 2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja trebali bi pokazati postoji li razlika u učestalosti mutacija *HFE* gena kod simptomatskih kardioloških pacijenata i nesimptomatske populacije.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Provedeno je retrospektivno istraživanje mutacija gena HFE u kohorti pacijenata s preboljenim infarktom miokarda i kontrolnih ispitanika. U radu su upotrijebljeni uzorci venske krvi pacijenata hospitaliziranih na Kliničkom odjelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem KBC-a Osijek (pacijenti s preboljenim infarktom miokarda). Kontrolnu skupinu čine osobe koje nisu imale infarkt miokarda i koje nemaju medicinsku dokumentaciju o potvrđenoj teškoj kardiovaskularnoj bolesti. Svakom je ispitaniku venepunkcijom uzeto 3 ml krvi u epruvetu s podtlakom (*Vacutainer, Becton Dickinson*) s antikoagulansom EDTA. Uzorci su posebno šifrirani te pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  do izolacije DNA. Od ostalih anamnestičkih podataka prikupljeni su podaci o spolu, dobi i hipertenziji.

#### 3.2. Metode

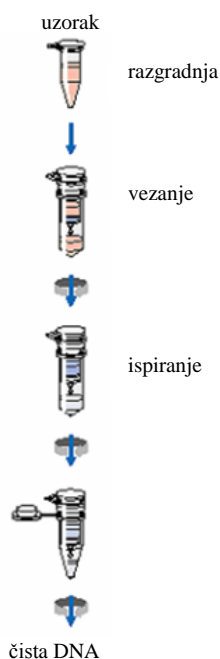
Iz uzoraka krvi ispitanika izolirana je DNA na mini spin kolonama prema protokolu proizvođača (*QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany*). Nakon izolacije DNA, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu na uređaju *Applied Biosystems 7500 Real time PCR system*, analizirana su tri najčešća polimorfizma jednoga nukleotida u genu *HFE*: C282Y, H63D i S65C. Analiza je učinjena primjenom Taqman hibridizacijskih proba. Programskim paketom 7500 Software v2.3 analizirani su dobiveni genotipovi.

##### 3.2.1. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz uzorka upotrijebljene su komercijalne kolone sa silika-membranom. Izdvajanje DNA na kolonama sa silika-membranom provedeno je pomoću *QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit* (Qiagen Company) kompleta reagensa. Pri tome su učinjene manje izmjene originalnih uputa za izolaciju preporučenih od proizvođača kako slijedi.

## Postupak

Izdvajanje DNA započinje inkubiranjem 200  $\mu\text{L}$  pune krvi u 200  $\mu\text{L}$  odgovarajućega pufera za liziranje i uz prisutnost 20  $\mu\text{L}$  *QIAGEN Protease* (enzim koji neselektivno razgrađuje proteine), a koji se nalaze u sastavu kita. Nakon 10 minuta inkubacije pri 56°C, dodaje se 200  $\mu\text{L}$  96-100 % etanola pomoću kojega dolazi do precipitacije DNA. Nakon toga smjesa se pažljivo prebaci na *QIaAmp Mini* silika-membranu u kolone i centrifugira na 6000 g jednu minutu. DNA se veže na membranu, a ostatak smjese prolazi kroz pore membrane. Tako izolirana DNA dodatno se pročišćava dodavanjem različitih pufera. Prvo se dodaje 500  $\mu\text{L}$  AW1 pufera te se smjesa centrifugira na 6000 g jednu minutu. Zatim se *QIaAmp Minispin* kolona prebaci u novu tubicu te se dodaje 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2 i ponovno centrifugira na 20000 g tijekom tri minute. Tijekom postupka mijenja se ionska jakost. U uvjetima visoke ionske jakosti, DNA će se vezati za kolonu i nečistoće će se isprati. U posljednjem koraku koristi se pufer niske ionske jakosti koji potiče otpuštanje DNA s kolone (cijepa veze između DNA i membrane). *QIaAmp Minispin* kolona se prebaci u novu tubicu i doda se 200  $\mu\text{L}$  AE pufera te inkubira na sobnoj temperaturi 1 minutu, a zatim centrifugira na 6000 g jednu minutu. Izolirana se DNA do daljnje analize čuva u AE puferu pohranjena na -20°C (29).

Slika 6. *QIAamp*<sup>®</sup> DNA izolacija

(Prilagođeno prema: <https://www.qiagen.com/hr/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-mini-kit/#productdetails>; pristup 24.9.2015.)



### 3.2.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*)

Lančana reakcija polimeraze izuzetno je djelotvorna metoda molekularne biologije. Ta metoda omogućuje višestruko kopiranje specifičnih sekvenci DNA. Teorijski PCR eksponencijalno amplificira DNA, udvostručujući ciljnu molekulu u svakom ciklusu. Kod PCR-a u stvarnom vremenu proizvod reakcije mjeri se nakon svakoga ciklusa uz pomoć fluorescentnih boja koje doprinose povećanju fluorescentnoga signala u direktnoj proporciji s brojem novonastalih PCR produkata.

Postoje razne inačice te metode, no najčešće se upotrebljava ona temeljena na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti *Taq* DNA polimeraze i fenomenom nazvanim prijenos rezonantne fluorescentne energije, FRET (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). U sustavu FRET dolazi do prijenosa energije između dviju fluorescentnih molekula koje su u blizini na način da jedna fluorescentna boja biva potisnuta drugom tzv. prigušivačem, engl. *quencher*. Da bi došlo do emitiranja fluorescencije, te dvije molekule moraju biti rastavljene na veću udaljenost (30).



Slika 7. Postavljanje reakcije lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

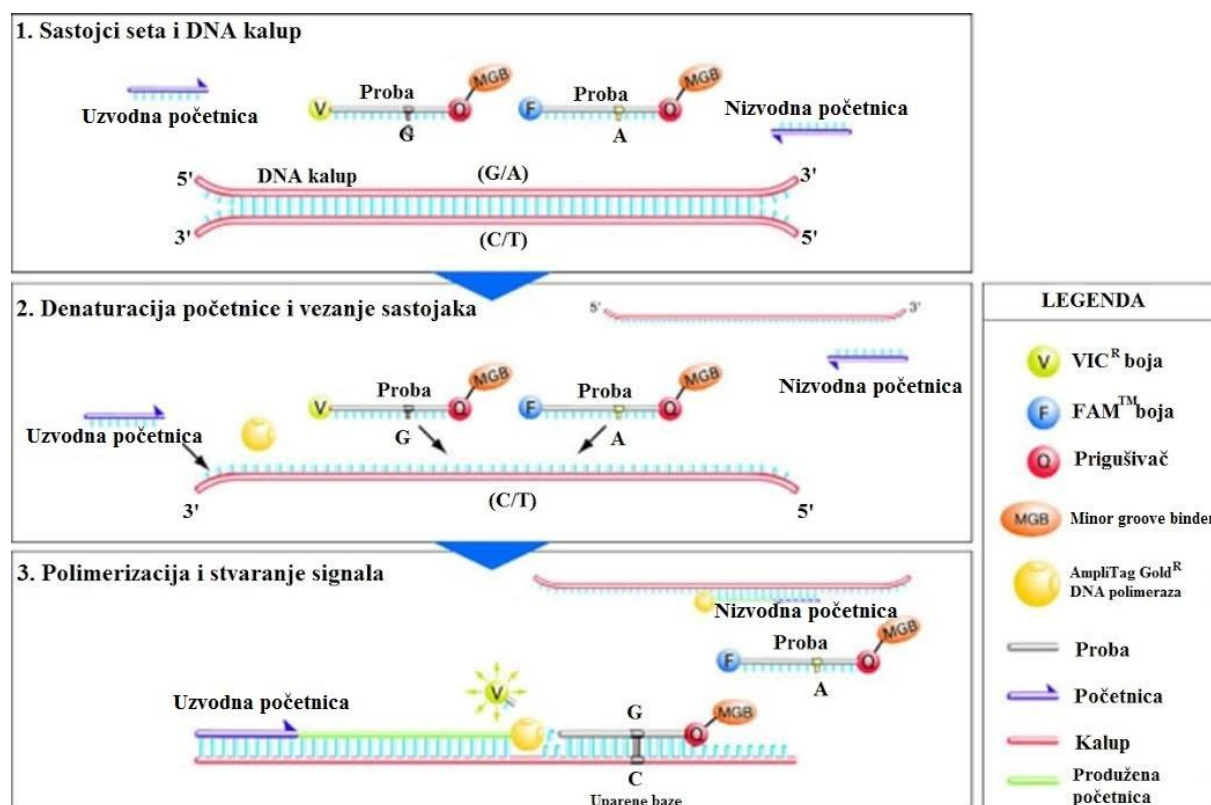
(Izvor:<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1057077340&topicorder=5&maxto=14>; pristup 24.9.2015.)

#### Postupak

Genotipizacija je učinjena primjenom Taqman metodologije koja se temelji na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti *AmpliTaq Gold*<sup>®</sup> *DNA Polymerase*, koja razgrađuje hibridiziranu Taqman probu samo onda kada je proba vezana za ciljni odsječak između uzvodne i nizvodne

početnice, odnosno ako se ciljni odsječak umnožava. To uzrokuje razdvajanje reporterske fluorescentne boje (vezane na 5'-kraju probe) od nefluorescentnoga prigušivača (vezanog na 3'-kraju probe), što za posljedicu ima emitiranje fluorescencije određene valne duljine. Fragmenti probe odстранjuju se s ciljnoga odsječka DNA i nastavlja se polimerizacija. 3'-kraj sonde je blokiran da bi se izbjeglo produljenje probe za vrijeme PCR reakcije. Do povećanja fluorescentnoga signala doći će samo onda kada je ciljna sekvenca komplementarna probi i amplificirana tijekom PCR reakcije. Na taj se način ne detektiraju nespecifična umnažanja.

Intenzitet fluorescencije ovisi o količini nastaloga PCR produkta. Primjenom različitih početnica i proba obilježenih različitim fluorescentnim bojama, omogućuje se višestruka (multipleks) analiza (31). (slika 8.)



Slika 8. Metoda genotipizacije pomoću 5' nukleazne reakcije  
(Prilagođeno prema: Priručnik *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System*)

TaqMan MGB probe sastoje se od:

- reporterske boje na 5'-kraju i
  - VIC® boje vezane za 5'-kraj alela probe 1
  - FAM™ boje vezane za 5'-kraj alela probe 2

U radu su upotrijebljene sekvence proba:

- za SNP rs 1800730

GCTGTTCGTGTTCTATGATCATGAG[A/T]GTCGCCGTGTGGAGCCCCGAACTCC

- za SNP rs 1799945

TGACCAGCTGTTCGTGTTCTATGAT[C/G]ATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCG

- za SNP rs 1800562

CCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT[G/A]CCAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGAT

Postupak genotipizacije prikazan je u tablici 2. PCR se provodi prema protokolu prikazanom u tablici 3.

Tablica 2. Sastojci i volumeni potrebni za genotipizaciju

Sastojci	Volumen
V (PCR Master Mix 2x)	6,25 µ/L
V (SNP Taqman probe mix 40x)	0,31 µ/L
V (d.d. H <sub>2</sub> O)	3,44 µ/L
V (DNA/ H <sub>2</sub> O)	2,5 µ/L
Ukupni volumen u jažici	12,5 µ/L

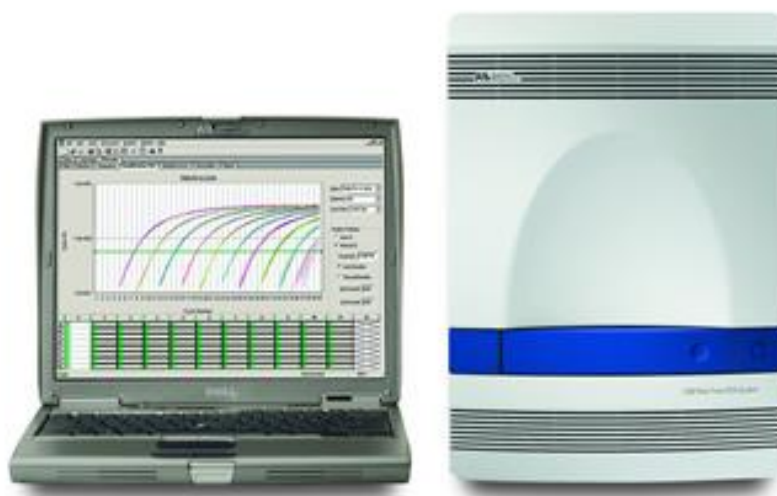
Tablica 3. PCR protokol

Početna denaturacija	10 minuta na 95°C
Denaturacija tijekom 40 ciklusa	15 sekundi na 92°C
Vežanje/sinteza tijekom 40 ciklusa	1 minuta na 60°C

Svaki ciklus PCR reakcije sastoji se od tri koraka:

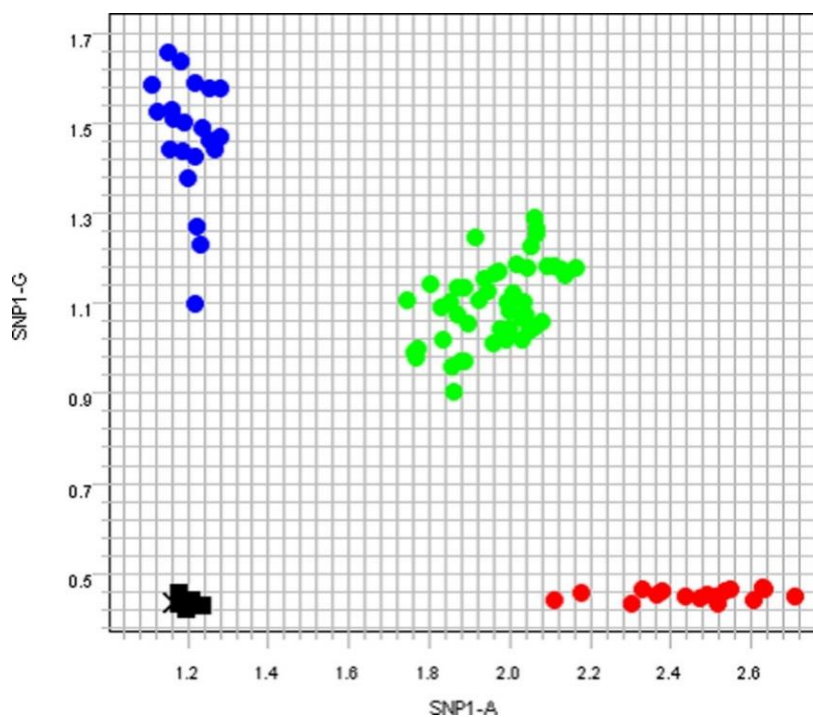
1. denaturacije: na visokoj temperaturi dolazi do razdvajanja dvolančane DNA
2. vezanja: dolazi do vezanja specifičnih oligonukleotida - početnice i DNA matrice
3. sinteza: temperatura od 60°C optimalna je za aktivnost DNA polimeraze

Analiza uzoraka učinjena je na uređaju Applied Biosystems 7500/7500 Real-Time PCR System. (slika 9.)



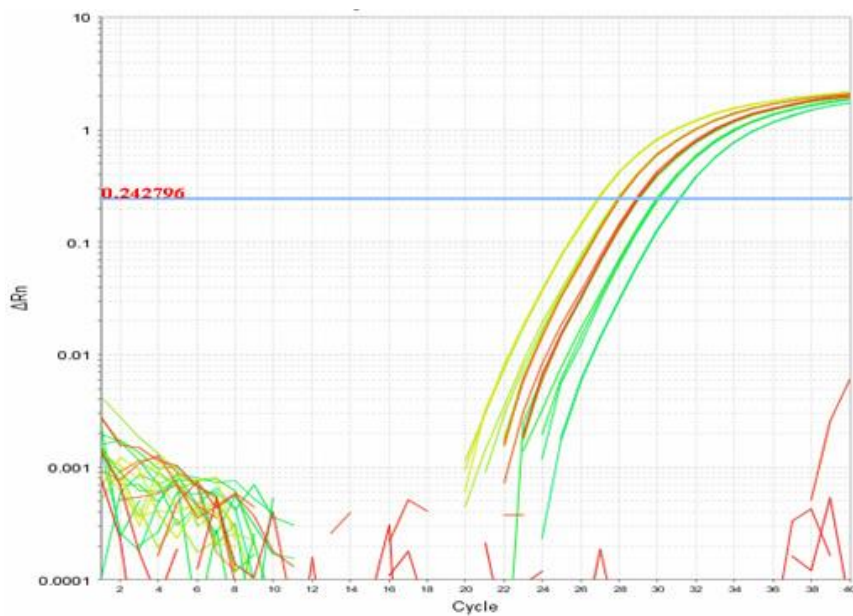
Slika 9. Applied Biosystems 7500/7500 Real-Time PCR System.

(Izvor: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600679>; pristup 15.11.2015.)



Slika 10. Prikaz rezultata genotipizacije Taqman probama

(Izvor: Priručnik *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System*)



Slika 11. Primjer prikaza amplifikacijskih krivulja

(Izvor: Priručnik *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System*)

### 3.2.3. Statističke metode

Podaci o učestalostima pojedinih alela prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama (%). Razlike u genetičkoj distribuciji i frekvenciji javljanja alela te povezanost *HFE* genotipova s infarktom miokarda testirane su Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) testom odnosno Fisherovim egzaktnim testom u slučajevima kada je učestalost pojedine kategorije bila manja od pet. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha=0,05$ , a sve P vrijednosti su dvostrane. Statistička obrada podataka napravljena je u programu IBM SPSS Statistics (ver. 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Frekvencije haplotipova i njihova povezanost s infarktom miokarda predviđene su pomoću SHEsis programa (32), kao i razlike u haplotipovima između ispitanika i kontrolne skupine. Da bi se smanjio utjecaj višestrukog testiranja na dobivene p vrijednosti, haplotipovi s frekvencijom manjom od 0,01 nisu bili uključeni u daljnje analize.

#### 4. REZULTATI

Ukupno je obrađeno 400 ispitanika (raspon godina starosti 22-98), 200 pacijenata s preboljenim infarktomiokarda i 200 pacijenata koji nisu preboljeli infarkt miokarda te pripadaju kontrolnoj skupini.

##### 4.1. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela

U tablici 4. prikazana je učestalost alela u obje skupine.

Tablica 4. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela

SNP	Uzorak	Alel	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
<b>C282Y</b>	Ispitanik	G/G	191	95,5
		G/A	9	4,5
	Kontrola	G/G	184	91,9
		G/A	16	8,1
<b>H63D</b>	Ispitanik	C/C	158	79,0
		C/G	38	19,0
		G/G	4	2,0
	Kontrola	C/C	148	74,0
		C/G	49	24,5
		G/G	3	1,5
<b>S65C</b>	Ispitanik	A/A	193	96,5
		A/T	7	3,5
	Kontrola	A/A	190	96,0
		A/T	8	4,0

##### 4.2. Prikaz učestalosti alela s obzirom na spol

U tablici 5. prikazana je učestalost alela s obzirom na spol. Od ukupno 400 ispitanika, u istraživanje je bilo uključeno 218 muškaraca i 182 žene.

Za SNP C282Y hi kvadrat testom utvrđena je značajna razlika u učestalosti G/G i G/A alela kod muškaraca ( $\chi^2 = 176,20$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) i kod žena uključenih u istraživanje ( $\chi^2 = 130,30$ ;  $Df = 1$ ;  $p = 0,000$ ).

Za SNP H63D hi kvadrat testom utvrđena je značajna razlika u učestalosti C/C, C/G i G/G alela kod muškaraca ( $\chi^2 = 219,37$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,000$ ) i kod žena uključenih u istraživanje ( $\chi^2 = 141,90$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,000$ ).

Za SNP S65C hi kvadrat testom utvrđena je značajna razlika u učestalosti C/C, C/G i G/G alela kod muškaraca ( $\chi^2 = 182,49$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) i kod žena uključenih u istraživanje ( $\chi^2 = 157,80$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ).

Tablica 5. Prikaz učestalosti alela s obzirom na spol

SNP	Spol	Alel	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
<b>C282Y</b>	Muško	G/G	207	95,0
		G/A	11	5,0
	Žensko	G/G	168	92,3
		G/A	14	7,7
<b>H63D</b>	Muško	C/C	173	79,4
		C/G	43	19,4
		G/G	2	0,9
	Žensko	C/C	133	73,1
		C/G	44	24,2
		G/G	5	2,7
<b>S65C</b>	Muško	A/A	208	95,8
		A/T	9	4,2
	Žensko	A/A	175	96,7
		A/T	6	3,3

#### 4.3. Prikaz učestalosti hipertenzije prema skupinama

U tablici 6. prikazana je učestalost hipertenzije prema skupinama za SNP C282Y. Hi kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti pojave hipertenzije u skupini kontrolnih ispitanika koji su nositelji G/G alela ( $\chi^2 = 35,16$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) s tim da je značajno veća učestalost pacijenata koji nisu imali hipertenziju u kontrolnoj skupini.



Tablica 6. Prikaz učestalosti hipertenzije prema skupinama za SNP C282Y

Skupina	Alel	Hipertenzija	
		DA	NE
Ispitanik	G/G	105 (55,0%)	86 (45,0%)
	G/A	2 (23,0%)	7 (78,0%)
Kontrola	G/G	51 (28,0%)	131 (72,0%)
	G/A	7 (44,0%)	9 (56,0%)

U tablici 7. prikazana je učestalost hipertenzije prema skupinama za SNP H63D. Hi kvadrat testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti pojave hipertenzije u skupini ispitanika ( $p = 0,625$ ). U kontrolnoj skupini utvrđene su statistički značajne razlike u učestalosti pojave hipertenzije kod nositelja C/C ( $\chi^2 = 27,00$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) i C/G alela ( $\chi^2 = 7,37$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,007$ ).

Tablica 7. Prikaz učestalosti hipertenzija prema skupinama za SNP H63D

Skupina	Alel	Hipertenzija	
		DA	NE
Ispitanik	C/C	85 (53,8%)	73 (46,2%)
	C/G	19 (50,0%)	19 (50,0%)
	G/G	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Kontrola	C/C	42 (28,6%)	105 (71,4%)
	C/G	15 (30,6%)	34 (69,4%)
	G/G	1 (50,0%)	1 (50,0%)

U tablici 8. prikazana je učestalost hipertenzije prema skupinama za SNP S65C. U kontrolnoj skupini utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti pojave hipertenzije kod nositelja A/A alela ( $\chi^2 = 30,40$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) pri čemu je značajno veća učestalost onih koji nisu imali hipertenziju u kontrolnoj skupini.

Tablica 8. Prikaz apsolutne i relativne učestalosti hipertenzija prema skupinama za SNP S65C

Skupina	Alel	Hipertenzija	
		DA	NE
Ispitanik	A/A	105 (54,4%)	88 (45,6%)
	A/T	2 (28,6%)	5 (71,4%)
Kontrola	A/A	57 (30,0%)	133 (70,0%)
	A/T	1 (12,5%)	7 (87,5%)

#### 4.4. Prikaz učestalosti hipertenzija prema spolu

U tablici 9. prikazana je učestalost hipertenzija prema spolu i skupini ispitanika. Statistički značajna razlika u učestalosti hipertenzije utvrđena je u muškaraca ( $\chi^2 = 25,3$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,000$ ) i žena ( $\chi^2 = 10,12$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,001$ ) u kontrolnoj skupini u kojoj su prevladavali ispitanici koji nemaju hipertenziju. U skupini ispitanika nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti hipertenzije po spolovima, no primijećeno je da je u skupini ispitanika veća učestalost žena koje su imale hipertenziju u odnosu na žene koje nisu imale hipertenziju.

Tablica 9. Prikaz apsolutne i relativne učestalosti hipertenzija prema spolu i skupini ispitanika

Skupina	Spol	Hipertenzija	
		DA	NE
Ispitanici	Muško	57 (50,0%)	57 (50,0%)
	Žensko	50 (58,0%)	36(42,0%)
Kontrola	Muško	26 (25,0%)	77 (75,0%)
	Žensko	32 (34,0%)	63 (66,0%)

#### 4.5. Analiza haplotipova

U Tablici 10. prikazani su mogući haplotipovi analiziranih mutacija *HFE* gena i njihove frekvencije kod ispitanika s infarktom miokarda i kod kontrola. Nema statistički značajne razlike u raspodjeli haplotipova *HFE* gena između ispitanika i kontrola te su sve p vrijednosti prilagođene dobi i spolu.

Tablica 10. Frekvencije i raspodjela mogućih haplotipova u ispitanika i kontrola predviđenih SHEsisPlus programom.

	C282Y	H63D	S65C	Frekvencija ispitanici	Frekvencija kontrole	OR	95% CI	p*
	rs1800562	rs1799945	rs1800730					
1	G	C	A	0,845	0,805	1,38	0,96-1,99	0,079
2	G	G	A	0,115	0,133	0,85	0,56-1,29	0,452
3	A	C	A	0,022	0,04	0,55	0,24-1,27	0,154
4	G	C	T	0,017	0,02	0,87	0,31-2,43	0,794

OR – omjer izgleda (eng. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*)

\*p vrijednosti nakon prilagodbe za višestruko testiranje

## 5. RASPRAVA

U radu je obrađeno dvjesto pacijenata hospitaliziranih na Kliničkom odjelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem KBC Osijek (pacijenti s preboljenim infarktom miokarda i troponinom većim od 0.05). Kontrolnu skupinu čine osobe s troponinom manjim od 0.05, koje nisu imale infarkt miokarda i koje nemaju medicinsku dokumentaciju o potvrđenoj teškoj kardiovaskularnoj bolesti te osobe koje nemaju dijabetes.

Kao najčešća mutacija u HFE genu opisana je zamjena G>A na nukleotidu 845 (G845A) koja mijenja tirozin za cistein u aminokiselini na poziciji 282 (C282Y). Prema dosadašnjim istraživanjima europskog stanovništva, homozigoti C282Y kreću se od 64 % kod talijanskih pacijenata s hemokromatozom do 80-90% kod engleskih i francuskih pacijenata (33). Procjenjuje se da u 38-50 % homozigota C282Y može doći do pojave preopterećenja željezom, a u 10-33 % eventualno može doći do pojave simptoma HH i/ili oštećenja organa (34). Heterozigoti se dovode u vezu s povećanim rizikom kardiovaskularne smrti (35) jer se smatra da se kod njih postupno nakuplja željezo što može izazvati poremećaj u kasnijim godinama života. Nakupljanje željeza na stjenkama arterija uzrokuje lipidnu peroksidaciju te tako doprinosi stvaranju ateroskleroze (36). Mutacija poznata kao H63D, odnosno zamjena C>G na nukleotidu 187 (C187G) ima veći učinak na razvoj bolesti ukoliko je u naslijeđena zajedno s mutacijom C282Y (33). Pojavnost ovoga genotipa je mala: prosječno 0,5 - 2,0 % pojedinaca razvije kliničke znakove bolesti (34). Treća zamjena baza poznata kao mutacija S65C nije još dovoljno istražena. Prisutna je u 1,5% europske populacije i smatra se benignim polimorfizmom (6, 33).

Analizirajući frekvenciju alela u našoj skupini ispitanika i kontrolnoj skupini uočavamo da su većina homozigoti („wild type“) za sva tri SNP-a. Heterozigota C282Y u skupini pacijenata s infarktom miokarda ima 4,5 % odnosno svega njih 9, kao i heterozigota S65C, svega 3,5 % odnosno njih 7. Homozigote s mutacijom uočavamo samo za SNP H63D i to podjednako u bolesnika i u kontrolnoj skupini. Nije uočena značajna razlika između kontrolne skupine i skupine pacijenata s preboljenim infarktom miokarda (37, 8, 38). Slično istraživanje ovome provedeno je u Italiji (8) gdje također nije dokazana povezanost između *HFE* mutacija i infarkta miokarda.

HH zahvaća jednako i muškarce i žene s obzirom na način nasljeđivanja. Naime da bi se naslijedila HH potrebno je naslijediti mutirani gen od svakog roditelja (39). U kliničkoj praksi češće se susreće u muškaraca u srednjim i kasnim pedesetim godinama života. U žena se javlja češće u slučaju ranijeg gubitka menstruacije (40). HH genotipizacija ima važnu ulogu u predviđanju rizika od kardiovaskularne smrti u žena, HH heterozigota, u postmenopauzi, osobito ako su još dodatno izložene povećanom riziku od kardiovaskularnih bolesti poput pušenja i hipertenzije (41). Muškarci nositelji mutacije imaju dvostruko veći rizik od akutnog infarkta miokarda od muškaraca koji nemaju mutaciju (42).

Analizirajući učestalost alela s obzirom na spol u našim skupinama ispitanika uočavamo značajnu razliku u njihovoj učestalosti no moramo uzeti u obzir i činjenicu da je u istraživanje uključeno više muškaraca nego žena.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajnu povezanost mutacija *HFE* gena i hipertenzije, osobito u populaciji pedesetogodišnjaka. Osim toga, osobe s mutiranim *HFE* genom imaju veći krvni pritisak već u trideset i petoj godini života. Najveći rizik od razvoja hipertenzije imaju osobe nositelji H63D G-alela (43). Nadalje, povećane zalihe željeza udružene su s progresijom ateroskleroze kao i otvrdnućem aorte, a samim tim i disfunkcijom srca (44).

Analizirajući učestalost hipertenzija u našem istraživanju uočavamo značajnu veću učestalost pojave hipertenzije u skupini ispitanika koji su nositelji G/G alela za SNP C282Y. S druge strane, značajno je veća učestalost pacijenata koji nisu imali hipertenziju u kontrolnoj skupini. U ovoj skupini utvrđene su i statistički značajne razlike u učestalosti pojave hipertenzije kod nositelja C/C i C/G alela za SNP H63D, dok iste nisu utvrđene u skupini ispitanika. Statistički značajna razlika u učestalosti pojave hipertenzije uočena je i kod nositelja A/A alela za SNP S65C, pri čemu je značajno veća učestalost pacijenata koji nisu imali hipertenziju u kontrolnoj skupini.

Statistički značajna razlika u učestalosti hipertenzije utvrđena je i u muškaraca i u žena u kontrolnoj skupini u kojoj su prevladavali ispitanici koji nemaju hipertenziju, 75% muškaraca i 66% žena. U skupini ispitanika nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti hipertenzije po spolovima, ali se primjećuje da je u skupini ispitanika veća učestalost žena koje su imale hipertenziju njih 58%, u odnosu na žene koje nisu imale hipertenziju, njih 42%. Slične rezultate dobili su nizozemski istraživači na značajno većem broju pacijenata (36).

Iz tablice 10. vidljivo je da nema statistički značajne razlike u raspodjeli haplotipova *HFE* gena između ispitanika i kontrolne skupine. U obje skupine najčešći je GCA haplotip s

učestalošću od 84 % u ispitanika i 80 % kod kontrolne skupine, dok se ostali haplotipovi pojavljuju s vrlo malom frekvencijom. Bilo je za očekivati da nema statistički značajne razlike u raspodjeli haplotipova između ispitanika i kontrolne skupine jer su frekvencije alela istraživanih SNP-ova vrlo slične kod ispitanika i kontrolne skupine što je vidljivo iz tablice 4. Ovi rezultati podudaraju se s istraživanjem istih mutacija *HFE* gena, ali na skupini pacijenta s arterijskom trombozom (45).

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata istraživanja može se zaključiti da nema značajne razlike u učestalosti mutacija HFE gena između ispitanika i kontrolne skupine, kao i s obzirom na spol, ako uzmemo u obzir činjenicu da je u istraživanje uključeno više muškaraca nego žena. Isto tako, nema značajne razlike u frekvencijama različitih HFE alela između bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolnih ispitanika te temeljem provedenog istraživanja možemo zaključiti da HFE mutacije nisu povezane s akutnim infarktom miokarda.

## 7. SAŽETAK

Dosadašnja istraživanja ukazuju na povezanost kardioloških komplikacija s hereditarnom hemokromatozom. Prekomjerno nakupljanje željeza u tkivima može biti štetno jer dvovalentni ioni željeza mogu reagirati s vodikovim peroksidom i kisikom te tvoriti OH radikale i reaktivne kisikove radikale. Slobodni radikali reagiraju sa staničnim membranama i staničnim organelama inicirajući lipidnu peroksidaciju što može dovesti do razvoja ateroskleroze. Neka istraživanja pokazale su da pojedinci nositelji HFE mutacije mogu imati veći rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti od onih bez mutacije. Nasuprot tome, veliki broj istraživanja ukazuje da ne postoji povezanost HFE mutacija i kardiovaskularnih bolesti. U našem istraživanju proučavali smo povezanost između HFE mutacija i akutnog infarkta miokarda u dvije skupine ispitanika. U prvoj skupini bilo je 200 bolesnika (114 muškaraca i 86 žena) koji su preboljeli infarkt miokarda. Druga je skupina bila sastavljena od 200 zdravih ispitanika (103 muškaraca i 97 žena). Svi pacijenti su genotipizirani za HFE mutacije. DNA tipizacija provedena je za C282Y, H63D i S65C HFE alele. Rezultati ukazuju da nije bilo značajne razlike u frekvencijama različitih HFE alela između bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolnih ispitanika odnosno da HFE mutacije nisu povezane s akutnim infarktom miokarda.

Ključne riječi: željezo, HFE, hemokromatoza, PCR u stvarnom vremenu,



## 8.SUMMARY

### HFE MUTATIONS IN PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Previous studies show a correlation between cardiac complications and hereditary hemochromatosis. Tissue iron deposition could be harmful, because  $\text{Fe}^{2+}$  can react with  $\text{H}_2\text{O}_2$  to form  $\text{OH}^-$  radicals and  $\text{Fe}^{2+}$  can react with  $\text{O}_2$  to form reactive oxygen species. Free radicals react with cell membranes and cell organelles and could lead to the development of atherosclerosis by initiating lipid peroxidation. Hereditary hemochromatosis provides an opportunity for studying the effects of iron on cardiovascular disease. Some studies have shown that individuals who carried HFE mutations may be at greater risk of developing coronary heart disease than those without the mutations. In contrast, a large number of studies have reported no association between HFE mutations and coronary heart disease. We studied the relation between HFE mutations and acute myocardial infarction in two sets of subjects. The first one was composed of 200 patients (114 males and 86 females) who suffered myocardial infarction. The second one was composed of 200 healthy controls (103 males and 97 females). All patients were genotyped for HFE mutation. DNA typing was performed for C282Y, H63D and S65C HFE alleles. There were no significant differences in frequencies of the different HFE alleles between acute myocardial infarction patients and controls. Thus, our study, performed in two samples of genetically homogeneous patients and controls, does not support the suggestion that HFE mutations may be associated with acute myocardial infarction in susceptible individuals.

Keywords: iron, HFE, hemochromatosis, real time PCR

**9.LITERATURA**

1. Gamulin S. Poremećaji rada srca i krvotoka. U: Gamulin S, urednik. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2005. str. 163-4.
2. Jukić S. Patologija kardiovaskularnog sustava. U: Jukić S, urednik. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 1999. str. 103-6.
3. Šarčević B. Patologija srca i krvožilnog sustava. U: Jakić-Razumović J, Šarčević B, Seiwerth S, urednici. Patologija: Zagreb: Zdravstveno veleučilište; Naklada slap; 2009. str. 132-3.
4. Vincelj J. Odabrana poglavlja iz kardiovaskularnih bolesti. Zagreb: Školska knjiga; 1998. str. 64-5.
5. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 1998. str. 101-2.
6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2012;126:2020-35.
7. Shaini L, Chanchal Chanu L, Naorem S, Sachin Deba Singh Th. Body Iron Stores and Cardiovascular Health, Ind Med Gaz. 2014;12:445-8.
8. Candore G, Balistreri CR, Lio D, Mantovani V, Colonna-Romano G, Chiappelli M, i sur. Association between HFE mutations and acute myocardial infarction: a study in patients from Northern and Southern Italy. Blood Cells Mol Dis. 2003;31:57-62.
9. Turnpenny PD, Ellard S, ur. Emeryjeve osnove medicinske genetike. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 244.
10. A service of the U.S. National Library of Medicine. Genetics Home Reference. Dostupno na adresi:<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HFE>. Datum pristupa: 03.11.2015.
11. Ironic health. Details on the HFE Gene. Dostupno na adresi:<http://ironic-health.com/genetic-information/details-on-the-hfe-gene>. Datum pristupa: 05.11.2015.
12. McKenzie SB. Clinical laboratory hematology. New Jersey: Upper Saddle River; 2004. str. 191-212.

13. Štraus B, Rumora L, Elementi u tragu. U: Čvorišćec D, Čepelak I. urednici. Štrausova medicinska biokemija, Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 395-400.
14. Išgum-Vorgić Lj. Medicinska biokemija, Zagreb: Medicinska naklada; 2003. str. 119-21.
15. Moore GW, Knight G, Blann AD. Haematology, Oxford: University Press; 2010. str. 84-5.
16. Thomas L. Proteins in Clinical and Laboratory Medicine, 1. izd. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 2008. str. 185-202.
17. Conrad ME, Umbreit JM. Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol* 2000;64:287-98.
18. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112:219-30.
19. Burtis CA, Brunz DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic. 7. izd. St. Louis: Elsevier Saunders; 2015. str. 508-11.
20. Franchini M. Hereditary Iron Overload: Update on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Am J Hem.* 2006;81:202–9.
21. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by reducing the synthesis of iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271-6.
22. Lemos A dos R, Ismael LA, Boato CC, Borges MT, Rondó PH. Hepcidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56:596-9
23. McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology. 3. izd. Boston: Pearson Education; 2015. str. 200-22.
24. Kalauz M, Vucelić B. Hemokromatoza. U: Vrhovac B. urednik. Interna medicina. Zagreb: Naknada Ljevak; 2008. str. 1283-6.
25. Sertić J. Molekularna genetika idijagnostika nasljednihbolesti. U: Sertić J, urednica. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 246-48.

26. Šimić I, Merkle A, Jurević I, Sertić J. Nasljedna hemokromatoza. U: Sertić J, Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 303-8.
27. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician* 2013; 87:183-90.
28. Camaschella C, Gobbi De M, Roetto A. Hereditary hemochromatosis: progress and perspectives. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000; 4:302–21.
29. QIAGEN. Dostupno na adresi: <file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/HB-0329-003-1090246-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0215-WW.pdf>. Datum pristupa: 12.11. 2015.
30. Thermo Fisher Scientific. Dostupno na adresi: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. Datum pristupa: 5.11.2015.
31. Thermo Fisher Scientific. Dostupno na adresi: [http://core.phmtox.msu.edu/Scheduling/ItemDocs/13/Genotyping\\_Experiment\\_Guide.pdf](http://core.phmtox.msu.edu/Scheduling/ItemDocs/13/Genotyping_Experiment_Guide.pdf). Datum pristupa: 6.11.2015.
32. 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 (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res.* 2009;19:519-23.
33. Lyona E, Frank EL. Hereditary Hemochromatosis Since Discovery of the HFE Gene. *Clin Chem.* 2001;47:1147–56.
34. The National Center for Biotechnology Information. GeneReviews®. HFE-Associated Hereditary Hemochromatosis. Dostupno na adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/>. Datum pristupa; 19.9.2015.
35. Shaini L, Chanu LC, Naorem S, Deba SS. Body Iron Stores and Cardiovascular Health. *Ind Med Gaz.* 2014;147:445-8.
36. Silva MCP, Njajou OT, Alizadeh BZ, Hofman A, Wittteman JCM, van Duijn CM, i sur. HFE gene mutations increase the risk of coronary heart disease in women. *Eur J Epidemiol* 2010;25:643–9.

37. Battiloro E, Ombres D, Pascale E, D'Ambrosio E, Verna R, Arca M. Haemochromatosis gene mutations and risk of coronary artery disease. *Eur J Hum Gen.* 2000; 7:389-392.
38. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Iron and thrombosis. *Ann Hematol.* 2008;87:167-73.
39. The 23andMe Blog. Articles. Hemochromatosis in Women Before and After Menopause. Dostupno na adresi: <http://blog.23andme.com/health-traits/hemochromatosis-in-women-before-and-after-menopause/>. Datum pristupa: 20.11.2015.
40. Iron Disorders Institute. Iron Disorders.Hemochromatosis. Classic Hemochromatosis. Dostupno na adresi:<http://www.irondisorders.org/classic-hemochromatosis>. Datum pristupa: 20.11.2015.
41. Roest M., van der Schouw YT, de Valk B, Marx JJM, Tempelman MJ, de Groot PG, i sur Heterozygosity for a Hereditary Hemochromatosis Gene Is Associated With Cardiovascular Death in Women. *Clin Inves Rep.* 1999; 100:1268-73.
42. IBIMA Publishing. Research in Genetics. H63D But Not C282Y Mutation of HFE Gene Is Contributed In Acute Myocardial Infarction. Dostupno na adresi: <http://www.ibimapublishing.com/journals/RIGS/AIP/563101/563101.pdf>. Datum pristupa: 02.10.2015.
43. Määttä KM, Nikkari ST, Kunnas TA. Genetic Variant Coding for Iron Regulatory Protein HFE Contributes to Hypertension, the TAMRISK Study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e464.
44. Valenti L, Maloberti A, Signorini S, Milano M, Cesana F, Cappellini F. Iron Stores, Hepcidin, and Aortic Stiffness in Individuals with Hypertension. *PLoS One.* 2015;10:e0134635.
45. Calado RT, Franco RF, Pazin-Filho A, Simões MV, Marin-Neto JA, Zago MA. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. 2000;33:301-6.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Mirela Florijančić

Datum i mjesto rođenja:

- 22. svibnja 1968. godine, Osijek

Obrazovanje:

- 1983. – 1987. Školski centar „Ruđer Bošković“ Osijek – sanitarno-laboratorijski stručni radnik
- 2011. – 2013. Preddiplomski sveučilišni studij biomedicinsko-laboratorijskih tehnologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2013. – 2015. Diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Dosadašnje profesionalno iskustvo:

- 1987. – do danas – Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkoga centra u Osijeku

Članstvo u profesionalnim udrugama:

- Hrvatska komora zdravstvenih radnika
- Hrvatska laboratorijska udruga