

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

**Anton Šarčević**

**VARIJABILNOST ARNTL1 GENA KOD**  
**PACIJENATA S INFARKTOM**  
**MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

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

**Anton Šarčević**

**VARIJABILNOST ARNTL1 GENA KOD**  
**PACIJENATA S INFARKTOM**  
**MIOKARDA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za medicinsku genetiku, na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 40 listova, 9 tablica i 3 slike.

## SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA</b> .....	II
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Infarkt miokarda .....	1
1.2. Gen <i>ARNTL1</i> .....	3
1.3. Cirkadijani ritam .....	4
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	9
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	10
3.1. Ustroj studije .....	10
3.2. Ispitanici .....	10
3.3. Metode .....	10
3.3.1. Anamnestički upitnik .....	11
3.3.2. Izolacija DNA .....	11
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>real time PCR</i> ) .....	12
3.3.4. Statističke metode .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	16
4.1. Anamnestički upitnik .....	16
4.2. Analiza polimorfizma gena <i>ARNTL1</i> cirkadijanog ritma .....	17
<b>5. RASPRAVA</b> .....	25
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	33
<b>7. SAŽETAK</b> .....	34
<b>8. SUMMARY</b> .....	35
<b>9. LITERATURA</b> .....	36
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	40

## POPIS KRATICA

EKG – elektrokardiogram

ADP – adenzin difosfat

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

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

CK MB – srčani izoenzim kreatin kinaza

Tn – troponin

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

BMAL1 – engl. *Brain and Muscle Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1*

CCG – satom regulirani geni (engl. *clock-controlled genes*)

CLOCK – engl. *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

PER – engl. *period*

CRY – engl. *Cryptochrome*

CK1  $\epsilon$  – kazein kinaza 1  $\epsilon$  (engl. *casein kinase 1  $\epsilon$* )

CK1  $\delta$  – kazein kinaza 1  $\delta$  (engl. *casein kinase 1  $\delta$* )

REV-ERBa – engl. *NR1D1 nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*

ROR-a – engl. *RAR related orphan receptor alpha*

NMDAR – metabotropni glutamatni receptor (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*)

CREB – engl. *cAMP response element-binding protein*

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

MAPK – mitogenima aktivirane kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

NGF – neurotrofični moždani faktor (engl. *nerve growth factor*)

BDNF – čimbenik rasta neurona (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

CaMKII – kalcij kalmodulin ovisna kinaza tip 2

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

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

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

FRET – prijenos rezonantne fluorescentne energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

MGB – engl. *minor groove binder*

KVB – kardiovaskularne bolesti

IL-6 – interleukin 6

CRP – C-reaktivni protein

TNF $\alpha$  – faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

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

VLDL – lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoprotein*)

PCSK9 – engl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

OSA – opstruktivna apnejau snu (engl. *opsturctive sleep apnea*)

CPAP – kontinuirana aplikacija pozitivnog tlaka (engl. *continous positive airway pressure*)

## 1. UVOD

### 1.1. Infarkt miokarda

Infarkt miokarda definira se kao smrt stanica miokarda uslijed prolongirane ishemije kao posljedice potpunog prekida koronarne cirkulacije (1). Prekid koronarne cirkulacije najčešće nastaje uslijed ruptуре ili ulceracije aterosklerotskog plaka te superponirane tromboze, ali i uslijed koronarnog vazospazma (2).

Infarkt miokarda jedan je od najčešćih uzroka smrti te radne nesposobnosti u svijetu. Incidencija jest 5 / 100 000 godišnje u razvijenim zemljama. Infarkt miokarda bolest je starije životne dobi. Glavni rizični faktori jesu hipertenzija, dijabetes, pretilost, sjedilački način života te emocionalna napetost, na koje se može utjecati, te dob, spol i nasljeđe, na koje nije moguće utjecati. Međusobnom interakcijom čimbenika dolazi do nastanka ateroskleroze, glavne patološke podloge bolesti koronarnih arterija (3 – 5).

Infarkt miokarda može se klasificirati na pet tipova (6). Osnovni je patofiziološki uzrok infarkta miokarda neravnoteža između potrebe i potrošnje kisika u miokardu (2). Tip 1 spontani je infarkt miokarda koji nastane kao posljedica ulceracije, erozije ili ruptуре „mekog“ koronarnog aterosklerotskog plaka te superponirane tromboze (3, 6). Do začepljena može doći odmah, nakon nekoliko sati ili do njega uopće ne mora ni doći, što se očituje kliničkom slikom nestabilne angine pectoris (7). Tip 2 infarkt je miokarda kod sekundarne ishemije srca. Uzroci su koronarni spazam, aritmije, tireotoksikoza, respiratorna insuficijencija, anemija, hipotenzija (3, 6). Tip 3 iznenadna je srčana smrt bez porasta biomarkera. Simptomi ili EKG nalaz upućuju na kardijalnu smrt uzrokovanu ishemijom, ali smrt je nastupila prije nego su dobiveni uzorci krvi pacijenta, odnosno prije nego su vrijednosti biomarkera porasle. Tip 4 povezan je s trombozom stenta tijekom ili nakon perkutane koronarne angioplastike (6). Kao prevencija tromboze stenta tijekom zahvata koriste se heparin i inhibitor GP IIB/IIIa receptora, a nakon zahvata terapija acetilsalicilnom kiselinom i jednim od inhibitora agregacije trombocita koji ovise o ADP-u (8 – 10). Tip 5 infarkt miokarda nastaje tijekom postavljanja koronarne prenosnice. Za prevenciju okluzije grafta primjenjuju se heparin, acetilsalicilna kiselina, klopidogrel i tiklopidin (6, 11).

Morfološki i patohistološki infarkti miokarda mogu se podijeliti na transmuralne i subendokardijalne infarkte miokarda (3). Transmuralni infarkti miokarda zahvaćaju cijelu

debljinu stjenke miokarda. Nalaze se u području koje krvlju opskrbljuje jedna od triju glavnih koronarnih arterija. Subendokardijalni infarkti nastaju uslijed hipotenzivnih epizoda u sklopu cirkulatornog šoka. Nekroza zahvaća subendokardijalni dio miokarda čitavom cirkumferencijom obiju klijetki (2, 3).

Dijagnoza infarkta miokarda postavlja se na temelju simptoma, abnormalnosti EKG zapisa i porasta biomarkera nekroze miokarda (6). Stanja nastala kao posljedica naglog poremećaja u koronarnom krvotoku definiraju se kao akutni koronarni sindrom. On obuhvaća spektar od nestabilne angine pektoris, STEMI i NSTEMI. Diferencijacija se obavlja na temelju EKG nalaza i porasta biomarkera miokardijalne nekroze jer se klinički simptomi preklapaju (12, 13). Tipični i vodeći simptom infarkta miokarda jaka je bol u prsnom košu duže od 20 minuta. Bol ne reagira na primjenu nitroglicerina (9, 14). Bol se može širiti u epigastrij do pupka te u lijevu stranu vrata, mandibulu, lice te lijevu ruku (15). Bol je visceralnog karaktera, pa su pacijenti obično nemirni te se ne mogu smjestiti u udoban položaj. Kod pojedinih pacijenata simptomi mogu biti krivo protumačeni, što odgađa dijagnozu i povećava smrtnost. Pacijenti sa šećernom bolešću koja uzrokuje autonomnu neuropatiju nemaju boli. Zbog aktivacije autonomnog živčanog sustava, prekomjerne stimulacije simpatikusa, pacijenti su prestrašeni, blijedi, oznojeni, tahikardni i povišenog krvnog tlaka. Kod infarkta donje stjenke dolazi do nadražaja dijafragme i aktivacije parasimpatikusa. Tada su mučnina, povraćanje, bradikardija, AV blok te hipotenzija glavni simptomi (13 – 15). Diferencijalno dijagnostički bolovi u prsima mogu se očitovati u sklopu miokarditisa, pleuritisa, pneumonije, aortne disekcije te mnogih drugih stanja, ali mogu biti i psihogene naravi (16).

Elektrokardiografske promjene u sklopu akutnog infarkta miokarda posljedica su promjene elektrofizioloških uvjeta u ishemijom zahvaćenom dijelu miokarda (17). One se očituju u elektrokardiogramu negativnim simetričnim T valom kao znakom ishemije, ST-elevacijom kao znakom lezije, novonastalim blokom lijeve grane te patološkim Q zupcem (13, 18). Sve promjene značajne su ako se pojavljuju u susjednim odvodima. Kod pacijenata sa sumnjom na infarkt miokarda trebaju se snimati EKG zapisi u razmaku 15 – 30 minuta ili kontinuirano promatranje 12-kanalnim EKG-om (6, 19). Mjesto ST-elevacije u elektrokardiogramu s 12 odvoda može nam pomoći pri određivanju lokacije infarkta miokarda (15, 19).

Pokazatelji nekroze miokarda, kardioselektivni enzimi, važan su kriterij u postavljanju dijagnoze infarkta miokarda (20). Za dijagnozu infarkta miokarda bitni su porast i dinamika kardioselektivnih enzima (6, 15). Ozljeda miokrada opaža se u povišenim razinama osjetljivih i specifičnih biomarkera kao što su kardijalni troponin i miokardijalna (MB) frakcija kreatin



kinaze (CK) (6, 13, 20). Povišene vrijednosti biomarkera mogu se zabilježiti u svim stanjima u kojima dolazi do nekroze kardiomiocita, kao što je miokarditis, teška dekompenzirana kardiomiopatija, trauma, plućna embolija i kemoterapija (13, 20). Biomarker koji se preferira u postavljanju dijagnoze infarkta miokarda jest troponin I i T (cTn). On ima visoku specifičnost za miokardijalno tkivo te kliničku osjetljivost. Povišena vrijednost troponina definira se kao vrijednost koja prelazi 99. percentilu referentne populacije (gornja referentna granica) (6, 13). Koncentracija troponina određuje se prilikom postavljanja sumnje na infarkt miokarda te se po potrebi ponavlja (14, 15, 20). Još jedna važna dijagnostička metoda jest dvodimenzionalna ehokardiografija i obojeni dopler. Promjene kinetike miokarda vidljive su unutar nekoliko minuta od opstrukcije koronarne arterije, a prije nekroze, u EKG zapisu i porastu vrijednosti biomarkera. Ehokardiografija nam pruža uvid u funkciju i strukturu valvularnog aparata, septuma, miokarda te perikarda i velikih srčanih žila (14).

Akutno zbrinjavanje pacijenata s infarktom miokarda obuhvaća analgetsku, antiagregacijsku, antiishemijsku, antikoagulantnu i reperfuzijsku terapiju. Nitroglicerina i morfij daju se radi smanjenja boli te volumnog opterećenja srca (13, 15, 21). Kao konačna terapija primjenjuje se fibrinoliza unutar 30 minuta te perkutana koronarna angioplastika unutar 60 minuta od početka simptoma (15). Pacijenti s infarktom bazalnog dijela miokarda u terapiji ne smiju primati nitrite, morfij te beta blokatore zbog opasnosti od dodatnog usporenja srčane frekvencije i sniženja tlaka (9, 15).

Najčešći uzrok smrti u ranoj, ali i kasnijoj postinfarktnoj fazi oporavka pacijenta jest ventrikularna aritmija, osobito ventrikularna tahikardija koju slijedi ventrikularna fibrilacija. Pacijentima se savjetuje promjena načina života, kontrolirano bavljenje fizičkom aktivnošću, promjena prehrane te primjena propisane farmakološke terapije i obavezna rehabilitacijska terapija (12, 14, 15, 22).

## 1.2. Gen *ARNTL1*

Gen *ARNTL1* (engl. *Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1*) poznat je i kao *BMAL1* (engl. *Brain and Muscle Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1*). Otkriven je 1997. godine. Veličine je 24 egzona. Lokaliziran je na kratkom kraku 11. kromosoma (11p15.2). Kodira protein *ARNTL1* (engl. *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1 protein*) koji ima jednu od ključnih funkcija u povratnoj sprezi

molekularnog mehanizma cirkadijanog ritma (23). Protein koji kodira taj gen uključen je u patofiziologiju Angelmanovog sindroma, hipertenzije, dijabetesa, pretilosti, bipolarnog poremećaja, neplodnosti, poremećaja glikogenolize i lipogeneze te drugih poremećaja metabolizma. Regulira i odgovor steroidnih receptora na glukokortikoide, glukozom posredovano oslobađanje inzulina, sintezu proupalnih citokina i kemokina te funkciju i mobilizaciju upalnih stanica (23 – 25). U kontroli cirkadijanog ritma proteinski produkt gena *ARNTL1* stvara heterodimer s proteinskim produktima cirkadijanih gena. Heterodimer se veže za *E-box* pojačivač element i potiče ekspresiju gena (23, 24).

### 1.3. Cirkadijani ritam

Život na Zemlji podređen je 24-satnoj izmjeni dana i noći koja je uvjetovana rotacijom Zemlje oko vlastite osi. Mnogi fiziološki i patološki procesi regulirani su tim 24-satnim ciklusom putem endogenog sata. Endogeni sat naziva se cirkadijani ritam. Diurnalne varijacije podrazumijevaju endogeni cirkadijani ciklus moduliran egzogenim čimbenicima (25 – 27).

U ljudskom organizmu postoji jedan središnji sat koji se nalazi u suprahijazmatskoj jezgri prednjeg dijela hipotalamusa. U središnji sat ubraja se i pinealna žlijezda ili epifiza. Svaki organ i stanica organizma sisavaca posjeduje vlastiti endogeni, periferni sat. Centralni i periferni satovi organizirani su hijerarhijski te su pod kontrolom *Zeitgebera*, različitih čimbenika iz okoliša, odnosno iz organizma (26).

Centralni sat primarno je reguliran količinom svjetla. Izloženost svjetlu utječe na centralni sat preko neuralnih impulsa koji u suprahijazmatsku jezgru dopijevaju retinohipotalamičkim traktom, direktnom vezom retine i hipotalamusa (27). Periferni satovi sinkronizirani su sa središnjim satom neurocefaličnom cirkadijanom osi. Simpatički je živčani sustav glavna neuralna sveza, a humoralna su vazoaktivni intestinalni polipeptid, renin-angiotenzin-aldosteron sustav, melatonin, kateholamini, hormon rasta, atrijski natriuretski peptid te nepoznati čimbenici i neki citokini poput prostaglandina E2. Važni su čimbenici regulacije funkcije perifernih satova i tjelesna aktivnost, prehrana i energetske zalihe (26, 28, 29).

Smatra se da je uloga perifernih satova da pripreme organizam na dnevne promjene fizičkog i psihičkog opterećenja i omoguće prilagodbu organa na njih (27). Krvni tlak, frekvencija srca,

srčani minutni volumen poprimaju najniže vrijednosti tijekom noći, u vrijeme obnove stanica i tkiva organizma (15, 26, 28).

Plavo i zeleno svjetlo ultraljubičastog sunčevog spektra stimulira fotoreceptore koji putem retinohipotalamičkog trakta neuronalnim impulsom djeluju na suprahijazmatsku jezgru (27). Iz suprahijazmatske jezgre impuls se šalje u paraventrikularnu formaciju hipotalmusa. Impuls se dalje širi prema intermediolateralnoj kolumni cervikalnog dijela kralježnične moždine, gdje se nalaze sekundarni simpatički neuroni. Simpatički signali reguliraju funkciju perifernih organa i epifize, gdje potiču lučenje melatonina. Vrijednosti melatonina najveće su tijekom sna. Suprahijazmatska jezgra putem eferentnih projekcija stimulira i parasimpatički živčani sustav preko dorzalnih motornih jezgara vagusa (29, 30).

Cirkadijani ritam omogućuje organizmu vremensku usklađenost s okolišem te mu osigurava homeostazu na molekularnoj razini regulirajući ekspresiju gena putem pozitivne i negativne povratne sprege kako bi omogućili vršnu koncentraciju proteina u određenom vremenskom dijelu 24-satnog ciklusa u kojem su ti proteini najpotrebniji za strukturu i funkciju pojedinog tkiva (23). Povratna sprega odražava diurnalne oscilacije u stanici na transkripcijskoj i posttranskripcijskoj razini. Prema dosadašnjim istraživanjima smatra se da je 8 do 10 % gena u kardiovaskularnom sustavu podložno diurnalnim promjenama u ekspresiji (25, 31).

Centralni i periferni sat građeni su od nekoliko ključnih gena koji reguliraju vlastitu ekspresiju mehanizmima povratne sprege te ekspresiju satom reguliranih gena, CCG-a (engl. *clock-controlled genes*). Ključne komponente cirkadijanog sata, tj. pozitivnog kraka povratne sprege jesu proteini CLOCK (engl. *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) i ARNTL1 (engl. *Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1*), a negativnog kraka PER (engl. *Period 1, 2, 3*) i CRY (engl. *Cryptochrome 1, 2*). Ti proteini posjeduju funkciju transkripcijskih faktora (25, 28). CLOCK i ARNTL1 stvaraju heterodimere koji difundiraju u jezgru. Proces translokacije između jezgre i citoplazme stanice nadziran je fosforilacijom protein kinazama, kazein kinaza 1 epsilon i delta (CK1  $\epsilon$ , CK1  $\delta$ ) (27). Vežu se na *E-box* sekvencu u području promotora gena *PER* i *CRY* te potiču njihovu transkripciju. Proteini PER i CRY također stvaraju heterodimere i koče ekspresiju *CLOCK* i *ARNTL1* gena te na taj način reguliraju i vlastitu ekspresiju. Heterodimer PER i CRY proteina podliježe proteosomalnoj degradaciji tijekom noći. 24-satni ciklus nastavlja se povećanjem ekspresije *ARNTL1* i *CLOCK* gena. CLOCK i ARNTL1 heterodimer također aktivira nuklearne receptore REV-ERB $\alpha$  (engl. *NR1D1 nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*) i ROR $\alpha$  (engl. *RAR related orphan receptor alpha*) koji koče ekspresiju gena *ARNTL1* (25, 26, 28).

Ekspresija gena cirkadijanog ritma i gena koji su kontrolirani njihovim produktima ovisna je o epigenetskim procesima koji modificiraju strukturu kromatina, kao što je acetilacija histona (27).

Utjecaj svjetla na molekularnoj razini transmisije neuralnog signala iz retinohipotalamičkog trakta u suprahijazmatsku jezgru posredovan je glutamatom. Metabotropni NMDAR glutamatni receptori natrijski su i kalcijски kanali koji se vezanjem glutamata otvaraju i propuštaju kalcij. Mijenja se lokalni potencijal membrane te se otvaraju i kalcijски kanali regulirani naponom. Koncentracija intracelularnog kalcija povećava se i aktivira receptorske kanale na endoplazmatskom retikulumu. Kalcij također može direktno djelovati na transkripcijskoj ili posttranskripcijskoj razini. Učinci kalcija posredovani su kalcij kalmodulin ovisnim kinazama (25 – 27).

CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) protein, koji se veže na cikličkim adenzin monofosfatom regulirane elemente i modificira transkripciju te nekolicinu posttranskripcijskih događaja. Protein je koji povezuje više signalnih putova. Aktiviraju ga protein kinaza A i G, kalcij kalmodulin ovisna kinaza te mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPK). Mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPK) također su podložne diurnalnim varijacijama. Tijekom dana fosforilacija pojedinih kinaza povećana je kao i njihova aktivnost. Ciljna im je molekula CREB. Mitogenima aktivirane kinaze aktivirane su čimbenikom rasta neurona (NGF) i neurotrofičnim moždanim faktorom (BDNF) putem transmembranskog receptora. Ciklički adenzin monofosfat jedna je od ključnih komponenti cirkadijanog sata jer osigurava preciznu regulaciju ekspresije gena ovisno o količini svjetla. Višestruki mehanizmi povratne sprege gena cirkadijanog ritma osiguravaju cjelovitost i funkciju mehanizma u različitim fiziološkim i patološkim stanjima kada je jedan od signalnih puteva oštećen ili mu je funkcija promijenjena (27).

Još jedna od komponenti signalnog puta mogla bi biti aktivacija dušik-oksida sintetaze, kalcij kalmodulin II ovisnom kinazom (CaMKII). Fosforilacija dušik-oksida sintetaze također je bitna za promjenu u regulaciji gena ovisno o svjetlu. Tijekom rane večeri i noći svjetlosni signal putem dušikovog oksida aktivira ionske receptorske kanale na endoplazmatskom retikulumu i povećava intracelularnu mobilizaciju kalcija. U kasnije doba noći dušik oksid aktivira gvanilat ciklazu koja producira ciklički gvanozin monofosfat. On aktivira protein kinazu G. Farmakološki povećane razine cikličkog gvanozin monofosfata mijenjaju cirkadijani ritam i ponašanje kasno u noći. Mogući je mehanizam centralnog učinka metilksantina. Metilksantini, kofein, teofilin i teobromin inhibitori su fosfodiesteraza, enzima

koji sudjeluju u razgradnji cikličkih mononukleotida. U fiziološkim uvjetima koncentracija cikličkog gvanozin monofosfata i aktivnost protein kinaze G dosežu svoj maksimum tijekom dana (25 – 29).

Centralni geni cirkadijanog ritma reguliraju mnoge procese zadužene za metabolizam i staničnu produkciju energije. Neki od tih procesa jesu ritam spavanja i budnosti, plodnost, ponašanje, socijalne interakcije, kognitivne, tj. intelektualne funkcije, tjelesna temperatura, funkcija gastrointestinalnog, kardiovaskularnog, endokrinog, imunološkog sustava te funkcija jetre i bubrega (23). Regulacija imunološkog sustava te upalne reakcije od strane gena cirkadijanog ritma imaju važnu ulogu u oštećenju vaskularnog endotela i razvoju ateroma (31). Diurnalne varijacije u funkciji tih sustava, ali i funkciji endotela, produkciji dušikovog oksida i funkciji kardiovaskularnog sustava, oslobađanju katekolamina i glukokortikoida, produkciji i funkciji trombocita, fibrinolitičkog i prokoagulantnog sustava govori u prilog tome da genetski i okolišni čimbenici koji dovode do desinkronizacije okoliša i organizma rezultiraju brojnim patološkim stanjima (25, 31). Patološka stanja imaju svoj specifičan diurnalni raspored pojavljivanja s najvećom učestalosti u jutarnjim satima, što je dokazano na primjeru tromboembolijskih incidenata kao što su infarkt miokarda, ishemijski moždani udar i plućna embolija (25, 28).

Čimbenici okoliša koji mogu poremetiti funkciju unutrašnjeg sata (satova) najčešće su noćni rad, zlouporaba kofeina, hiperkalorična prehrana i nedostatak sna, koji u razvijenom svijetu zahvaćaju više od 50 % populacije, te pridonose povećanoj učestalosti kardiometaboličkih bolesti (26, 27, 30). Najčešći poremećaj cirkadijanog ritma jest sindrom brze promjene vremenske zone (engl. *jet lag*) koji nastaje putovanjem kroz vremenske zone i nemogućnošću prilagodbe na nove uvjete dnevnog svjetla. Očituje se širokim spektrom simptoma (30).

Uloga melatonina, renin-angiotenzin-aldosteronskog i simpatičkog sustava u diurnalnim varijacijama funkcije različitih organa može se upotrijebiti kao jedan oblik farmakokronoterapije prilikom desinkronizacije normalnog ritma (25, 28, 30 – 33). Dodatni oblici kronoterapije jesu terapija svjetlom i terapija tjelesnom aktivnošću (27).

Bolesti oka kao što su refrakcijske greške poput miopije (kratkovidnost), katarakta, dijabetička retinopatija, makularna degeneracija, retinitis, atrofija optičkog živca i glaukom te senilne promjene u anatomiji i fiziologiji oka i središnjeg živčanog sustava utječu na sinkronizaciju cirkadijanog ritma i okoliša. Osobe s refrakcijskim greškama, osobito

miopijom, imaju izraženu desinkronizaciju cirkadijanog ritma s češćom dnevnom pospanošću i varijancama u odlasku na počinak u usporedbi s osobama bez refraktorne greške (27, 34).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja bio je pokušati ispitati povezanost genetičkih varijanti gena *ARNTL1* cirkadijanog ritma i infarkta miokarda.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivna studija slučaja i kontrola (35).

#### 3.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 200 pacijenata koji su preboljeli infarkt miokarda te su bili hospitalizirani na Kliničkom odijelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem, Klinički bolnički centar Osijek, od svibnja 2015. do prosinca 2016. i 200 prema dobi i spolu podudarnih kontrolnih pacijenata. Prije početka istraživanja od svakog sudionika zatražen je potpisan informirani pristanak.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u skupinu pacijenata bili su preboljeli infarkt miokarda tipa 1 prema Thygens i sur. (6) te zadovoljena barem dva od tri sljedeća kriterija: povišen biokemijski marker nekroze miocita troponin T (veći od 0,05; iznad 99. percentile), bol u prsištu duža od 30 minuta te promjene zabilježene na elektrokardiogramu. Kriteriji za isključivanje ispitanika iz ispitivane grupe bili su prisutnost kardiovaskularnih bolesti kao što su dekompenzacija srca, valvularna greška te ugrađeni električni uređaj (engl. *pacemaker*).

Ispitanike iz kontrolne skupine regrutirao je njihov obiteljski liječnik. Kontrolnu skupinu činili su pacijenti s troponinom T manjim od 0,05, koji nisu imali infarkt miokarda i koji nemaju medicinsku dokumentaciju o potvrđenoj teškoj kardiovaskularnoj bolesti te osobe koje nemaju dijabetes tipa 2. Iz kontrolne skupine isključeni su rođaci osoba koje su preboljele infarkt miokarda zbog složene nasljedne osnove kardiovaskularnih bolesti.

#### 3.3. Metode

U istraživanju su korišteni anamnestički upitnici i uzorci krvi dobiveni venepunkcijom. Prije početka istraživanja od svakog sudionika zatražen je potpisan informirani pristanak. Uzorci krvi prikupljeni su u epruvetu s podtlakom (*Vacutainer, Becton Dickinson*) s antikoagulansom etilendiamintetraoctena kiselina. Iz uzoraka krvi pacijenta izolirana je DNA na komercijalnim



kolonama prema protokolu proizvođača (*QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany*) u kojemu su učinjene manje promjene. Nakon postupka izolacije DNA, analizirana su tri polimorfizma jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) gena *ARNTLI* metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu na uređaju *Applied Biosystems 7500 Real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)*. Analiza je izvršena pomoću TaqMan hibridizacijskih proba. Ispitani polimorfizmi prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Popis određivanih genetičkih polimorfizama gena *ARNTLI*

GEN	POLIMORFIZAM
<i>ARNTLI</i>	rs3789327
	rs4757144
	rs12363415

### 3.3.1. Anamnestički upitnik

Pomoću anamnestičkog upitnika prikupljeni su standardni podatci o dobi, spolu, zaposlenju, konzumaciji kofeina, povijesti pušenja, obiteljskoj povijesti infarkta miokarda, prijašnjim bolestima kardiovaskularnog sustava, hipertenziji, dislipidemiji, respiratornim bolestima, dijabetesu tipa 1 i 2, bolestima štitnjače, bubrega i jetre. Obiteljska povijest 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 pectoris, infarkta miokarda, aritmije ili moždanog udara u grupi pacijenata. Prije početka istraživanja od svakog sudionika zatražen je potpisan informirani pristanak.

### 3.3.2. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz uzoraka periferne krvi upotrijebljene su komercijalne kolone sa silika-membranom. Postupak izdvajanja DNA na kolonama izveden je pomoću *QIAamp© DNA Blood Mini Kit (Qiagen Company)* kompleta reagensa. U standardnim uputama proizvođača učinjene su manje izmjene.

Izolacija DNA počinje inkubiranjem 200  $\mu$ L pune krvi u 200  $\mu$ L odgovarajućeg pufera za liziranje uz dodatak 20  $\mu$ L *QIAGEN Protease* (enzim koji neselektivno razgrađuje proteine) u 1,5 mL epruveti. Uzorak se dobro promiješa 15 sekundi te se 10 minuta inkubira na 56 °C. Nakon inkubacije, uzorak se kratko centrifugira da bi se odstranile zaostale kapljice s unutrašnjosti poklopca. Zatim se dodaje 200  $\mu$ L 100 %-tnog etanola. Uzorak se miješa 15 sekundi. U daljnjem postupku dobivena smjesa uzorka pažljivo se odpipetira u *DNeasy Mini spin column* (koja se nalazi u epruveti od 2 mL) bez da se namoče rubovi kolone te se centrifugira na 6000 g (8000 rpm) 1 minutu. Filtar se iz *DNeasy Mini spin column* prebaci u novu epruvetu od 2 mL, a epruveta s filtratom odbaci se. Izolirana DNA se zadrži u *DNeasy Mini spin column* te se dodatno pročisti dodavanjem različitih pufera. Prvo se dodaje 500  $\mu$ L AW1 pufera tako da se pažljivo otvori *DNeasy Mini spin column*, zatvori i centrifugira na 6000 g (8000 rpm) 1 minutu. Nakon centrifugiranja *DNeasy Mini spin column* potrebno je prebaciti u novu 2 mL epruvetu, a ona s preostalim filtratom odbaci se. Zatim se istim postupkom, uz pažljivo otvaranje kolone te oprez da se ne smoči rub, dodaje 500  $\mu$ L AW2 pufera. Zatvara se poklopac i smjesa se centrifugira na 20000 g (14 000 rpm) 3 minute. Završetkom postupka centrifugiranja sadržaj *DNeasy Mini spin column* prebacuje se u novu 1,5 mL epruvetu te se doda 200  $\mu$ L AE pufera. Uzorak se inkubira 1 minutu na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira na 6000 g (8000 rpm) 1 minutu. DNA izolat čuva se u AE puferu na temperaturi od -20 °C (36).

### 3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*)

Lančana reakcija polimerazom jedna je od najučinkovitijih metoda u molekularnoj biologiji. Omogućuje višestruko kopiranje specifičnih sljedova DNA koje želimo analizirati. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, eksponencijalno amplificira molekulu DNA, udvostručujući je svaki ciklus. Rezultat reakcije mjeri se nakon svakog ciklusa pomoću fluorescentne boje čiji je signal proporcionalan količini novonastalih željenih sekvencija DNA (37, 38).

Svaki PCR ciklus sastoji se od triju koraka. Prvi je korak denaturacija na visokoj temperaturi, 95 °C i razdvajanje dvolančane DNA molekule. U sljedećem koraku na temperaturi između 50 °C i 60 °C omogućeno je vezanje dviju DNA početnica veličine 20 parova baza koje se vežu uzvodno, odnosno nizvodno od željenog segmenta, u slučaju lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i specifičnih DNA proba. U trećem koraku aktivira se DNA

polimeraza, enzim koji sudjeluje u procesu sinteze komplemetarnog lanca DNA, a za čiju je optimalnu funkciju potrebna temperatura između 68 °C i 72 °C. Cijeli proces, ovisno o uporabi, sastoji se od 25 – 50 ciklusa (39, 40).

Postupak u lančanoj reakciji polimerazom temelji se na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti DNA polimeraze te uporabi dviju fluorescentnih boja, fluorofora, čija je fluorescencija potisnuta prigušivačem (engl. *quencher*). Fenomen se naziva prijenos rezonantne fluorescentne energije ili FRET (engl. *Fluourescence Resonance Energy Transfer*). *TaqMan probe* specifične za pojedine sljedove DNA obilježene su dvjema fluroforama, tj. fluorescentnim bojama. Na 5' kraju nalazi se reporterska fluorescentna boja, VIC<sup>TM</sup> ili FAM<sup>TM</sup>, a na 3' kraju nalazi se prigušivač (engl. *quencher*) obilježen bojom MGB (engl. *minor groove binder*). VIC<sup>TM</sup> je specifična za „divlji tip“ alela, a FAM<sup>TM</sup> za „mutirani tip“ alela (41). Tijekom lančane reakcije polimerazom *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* svojom 5' egzonukleaznom aktivnošću razgrađuje probu i razdvaja dvije fluorofore. Rezultat je fluorescentni signal određene valne duljine iz reporter boje. DNA polimeraza razgrađuje fluorescentno obilježenu probu samo kada je vezana za specifični željeni slijed DNA. Sama proba je na 3' kraju blokirana te je onemogućeno njeno produljenje, fragmenti probe odstranjuju se sa ciljnog segmenta DNA, a reakcija katalizirana enzimom DNA polimeraza nastavlja se. Rezultat je daljnje umnažanje DNA lanca (37, 38, 41).

Intenzitet fluorescencije, koji se bilježi laserskim čitačem, ovisi o količini nastalog produkta. Primjenom nekoliko različitih proba obilježenih različitim fluoroforima omogućene su višestruke ili multipleks analize (38, 41).

U istraživanju su upotrijebljene probe za polimorfizam jednog nukleotida prikazane u Tablici 2., koji su odabrani na temelju poznate uključenosti *ARNTL1* gena u molekularni mehanizam regulacije cirkadijanog ritma te na povezanosti polimorfizma *ARNTL1* gena s rizičnim čimbenicima za kardiovaskularne bolesti.

Tablica 2. Popis određivanih genetičkih polimorfizama gena *ARNTL1*

<b>Polimorfizmi jednog nukleotida</b>	<b>Promjena u DNA</b>	<b>Funkcija</b>
<b>rs3789327</b>	A / G	intronska supstitucija
<b>rs4757144</b>	A / G	intronska supstitucija
<b>rs12363415</b>	A / G	intronska supstitucija

Potrebni sastojci i volumeni za genotipizaciju pomoću TaqMan metodologije prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Sastojci i volumeni za genotipizaciju pomoću TaqMan metodologije

Sastojci	Volumen
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 u jažici</b>	<b>12,5 <math>\mu</math>L</b>

Postupak genotipizacije rađen je prema PCR protokolu:

- početna denaturacija na 95 °C tijekom 10 minuta.
- denaturacija tijekom 40 ciklusa 15 sekundi na 92 °C
- vezanje i sinteza tijekom 40 ciklusa 1 minutu na 60 °C

### 3.3.4. 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 testirane su t-testom za nezavisne uzorke ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o njihovoj distribuciji, a razlike između kategoričkih varijabli testirane su Pearsovim  $\chi^2$  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  $\chi^2$  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 SHEsis. Frekvencije haplotipova te povezanost haplotipova s infarktom miokarda procijenjene su pomoću mrežnog alata SHEsis i SNPStats kao i razlike u haplotipovima između pacijenata s infarktom miokarda i kontrolne skupine (42, 43). Razina značajnosti postavljena je na

$p < 0,05$ . Sve P vrijednosti prilagođene su prema Bonferronijevom testu za višestruko testiranje.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Anamnestički upitnik

Demografski i opći podatci 400 ispitanika (200 pacijenata s preboljenim infarktomiokarda i 200 kontrola) prikazani su u Tablici 4. Aritmetička sredina dobi ispitivane populacije iznosila je 64 godine sa standardnom devijacijom od 13 godina. 54,4 % ispitanika čine muškarci.

Tablica 4. Opći podatci ispitanika uključenih u istraživanje

	<b>Pacijenti</b>		<b>Kontrole</b>	
<b>Obilježja (broj)</b>	Muškarci (114)	Žene (86)	Muškarci (104)	Žene (96)
<b>Dob, aritmetička sredina (standardna devijacija)</b>	64 (12)	69 (12)	62 (13)	62 (13)
	Broj (%)	Broj (%)	Broj (%)	Broj (%)
<b>Pušenje</b>				
Nepušači	41 (35,9)	58 (67,4)	70 (67,3)	81 (84,4)
Pušači	25 (21,9)	16 (18,6)	26 (25)	13 (13,5)
Bivši pušači	48 (42,2)	12 (13,9)	8 (7,7)	2 (2,1)
<b>Obrazovanje</b>				
Osnovna škola	19 (16,7)	51 (59,3)	16 (15,4)	37 (38,5)
Srednja škola	77 (67,5)	29 (33,8)	70 (67,3)	44 (45,8)
Viša/fakultet	18 (15,8)	6 (6,9)	18 (17,3)	15 (15,7)
<b>Radni status</b>				
Zaposlen	25 (21,9)	7 (8,2)	30 (28,9)	27 (28,1)
Nezaposlen	18 (9,7)	12 (13,9)	7 (6,7)	6 (6,3)
Umirovljen	78 (68,4)	67 (77,9)	67 (64,5)	63 (65,6)
<b>Konzumacija kofeina</b>				
DA	99 (86,8)	72 (83,7)	82 (78,9)	67 (69,8)
NE	15 (13,2)	14 (16,3)	22 (21,1)	29 (30,2)

Kod ispitanica i u kontrolnoj skupini postoji statistički značajna razlika u pušenju povezana sa životnom dobi ( $\chi^2 = 103,9$ ;  $df = 76$ ;  $P = 0,018$  i  $\chi^2 = 129,8$ ;  $df = 74$ ;  $P < 0,001$ ), dok značajna razlika ne postoji kod muškaraca u ispitivanoj i kontrolnoj skupini ( $\chi^2 = 89,9$ ;  $df = 88$ ;  $P = 0,421$  i  $\chi^2 = 89,5$ ;  $df = 88$ ;  $P = 0,435$ ). Učestalost kardiovaskularnih rizičnih čimbenika svih ispitanika prikazana je u Tablici 5.

Tablica 5. Učestalost kardiovaskularnih rizičnih čimbenika među ispitanicima

KVB* čimbenici rizika	Pacijenti		Kontrole	
	Muškarci	Žene	Muškarci	Žene
	Broj (%) ispitanika	Broj (%) ispitanika	Broj (%) ispitanika	Broj (%) ispitanika
Hipertenzija	57 (50)	50 (58,1)	27 (25,9)	32 (33,3)
Dislipidemija	9 (7,9)	17 (19,8)	9 (8,7)	14 (14,6)
Respiratorne bolesti	2 (1,8)	0	3 (2,9)	5 (5,2)
Dijabetes mellitus I	1 (0,9)	1 (1,2)	2 (1,9)	0
Dijabetes mellitus 2	26 (22,8)	18 (20,9)	0	0
Bolesti štitne žlijezde	2 (1,8)	6 (6,9)	0	6 (6,3)
Bolesti bubrega	4 (3,5)	11 (12,8)	7 (6,7)	5 (5,2)
Bolesti jetre	1 (0,9)	9 (10,5)	4 (3,9)	5 (5,2)
Pozitivna obiteljska anamneza na KVB*	29 (25,4)	18 (20,9)	12 (11,5)	15 (15,6)
Prijašnje KVB*	82 (71,9)	61 (70,9)	7 (6,7)	7 (7,3)
Infarkt miokarda	37 (32,5)	20 (23,3)	0	0
Drugo (aritmije, angina pectoris, moždani udar)	45 (39,5)	41 (47,7)	7 (6,7)	7 (7,3)
Ništa	32 (28,1)	25 (29,1)	97 (93,3)	89 (92,7)

\*kardiovaskularne bolesti

#### 4.2. Analiza polimorfizma gena *ARNTL1* cirkadijanog ritma

Učestalost genotipova istraživanih polimorfizama u ispitivanoj i kontrolnoj skupini u skladu je s predviđenima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi. Raspodjela alela polimorfizama

gena *ARNTLI* kao i učestalost dominantnih i recesivnih modela genotipova prikazana je u Tablici 6. Učestalost genotipova polimorfizma gena *ARNTLI* prikazana je na Slici 1. Raspodjela i učestalost genotipova istraživanih gena cirkadijanog ritma prikazane su u Tablici 7.

Statistički značajna razlika nije pronađena kod polimorfizma rs3789327, rs4757144, rs12363415 gena *ARNTLI*. Razlike u učestalosti alela i genotipova, nakon korekcije za višestruko testiranje prema Bonferroniju, nisu dosegle zadani prag značajnosti.

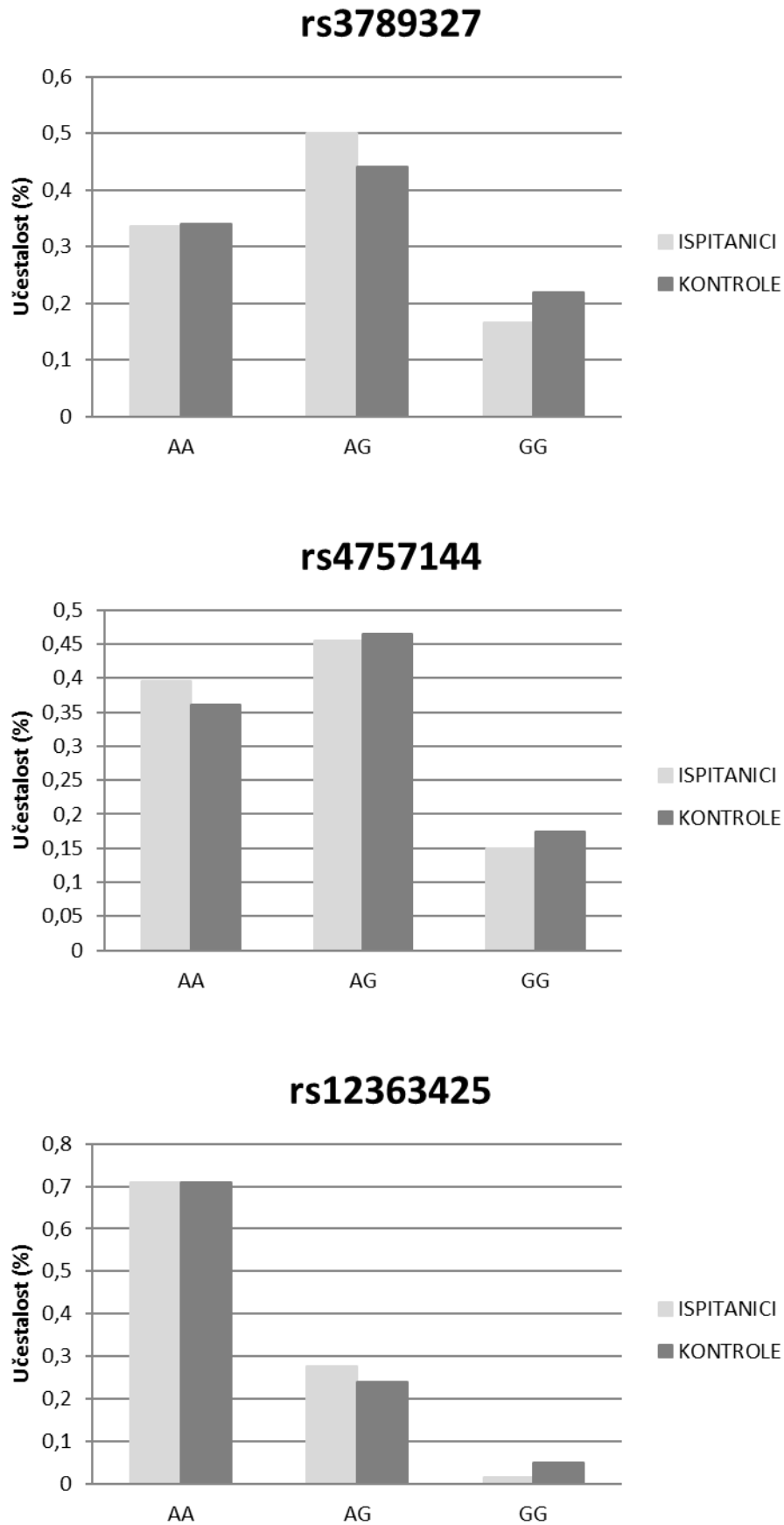
Tablica 6. Raspodjela alela i modela genotipova polimorfizama gena *ARNTLI*

	Učestalost alela				Modeli genotipova					
	Rjeđi alel	MAF* ispitanici	MAF* kontrole	P†	Dominantni model			Recesivni model		
<i>ARNTLI</i>					P†	OR	95 % CI	P†	OR	95 % CI
rs3789327	G	0,415	0,44	0,475	0,916	0,98	0,65 – 1,48	0,163	0,7	0,42 – 1,16
rs4757144	A	0,623	0,593	0,385	0,498	0,83	0,49 – 1,42	0,47	1,16	0,77 – 1,74
rs12363415	G	0,152	0,17	0,501	0,048	0,3	0,06 – 1,02	0,99	1	0,65 – 1,54

\*učestalost rijedeg alela (engl. *minor allele frequency*)

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



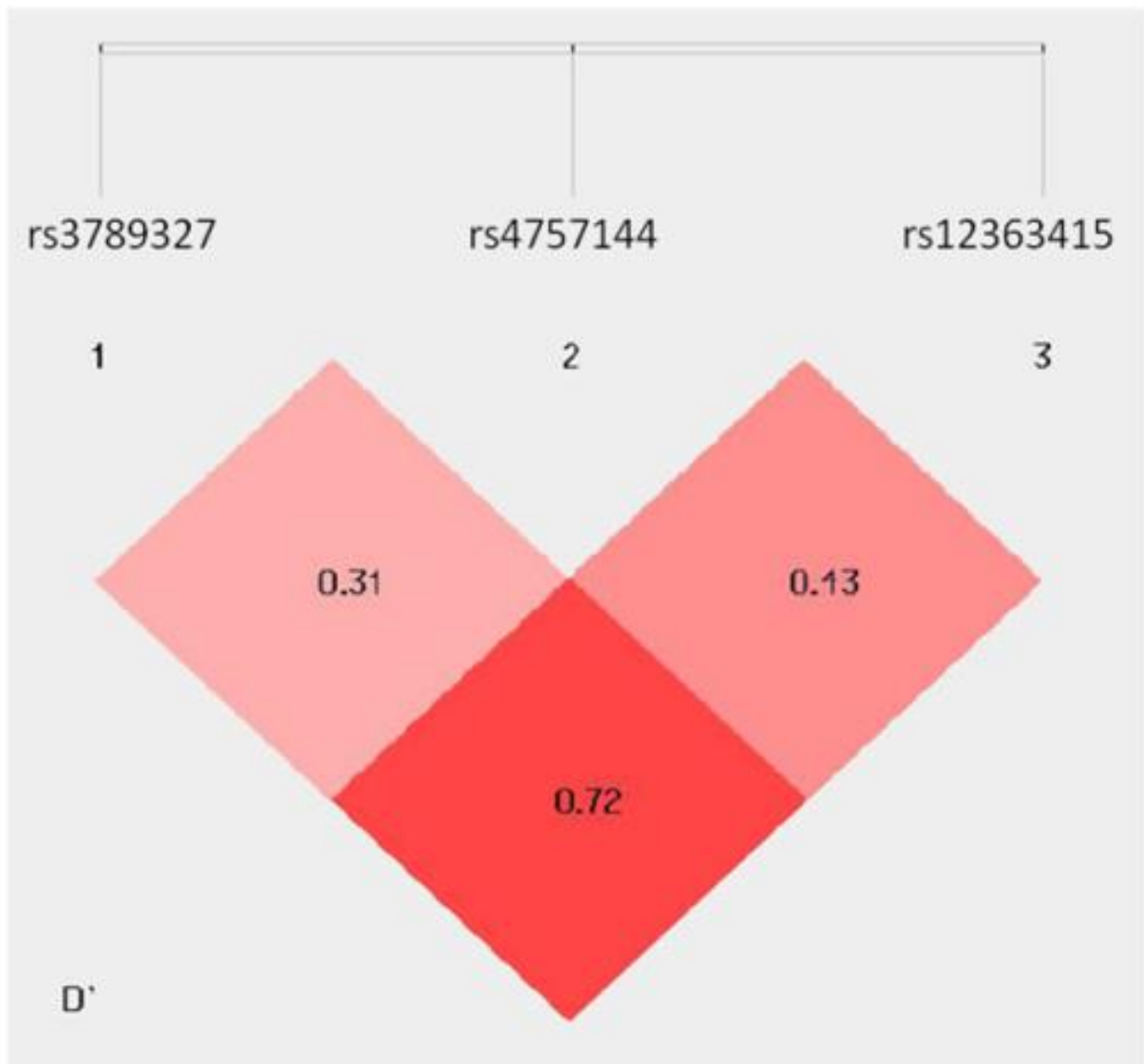
Slika 1. Učestalost genotipova istraživanih polimorfizama gena *ARNTL1*

Tablica 7. Raspodjela i učestalost genotipova polimorfizama gena *ARNTL1*

SNP	Aleli		Genotipovi							
	1	2	Ispitanici s infarktom miokarda, broj ispitanika (%)			Kontrole, broj ispitanika (%)			P*	$\chi^2$
			11	12	22	11	12	22		
rs3789327	A	G	67 (33,5 %)	100 (50 %)	33 (16,5 %)	68 (34 %)	88 (44 %)	44 (22 %)	0,301	2,34
rs4757144	A	G	79 (39,5 %)	91 (45,5 %)	30 (15 %)	72 (36 %)	93 (46,5 %)	35 (17,5 %)	0,694	0,73
rs12363415	A	G	142 (71 %)	55 (27,5 %)	3 (1,5 %)	142 (71 %)	48 (24 %)	10 (5 %)	0,120	4,24

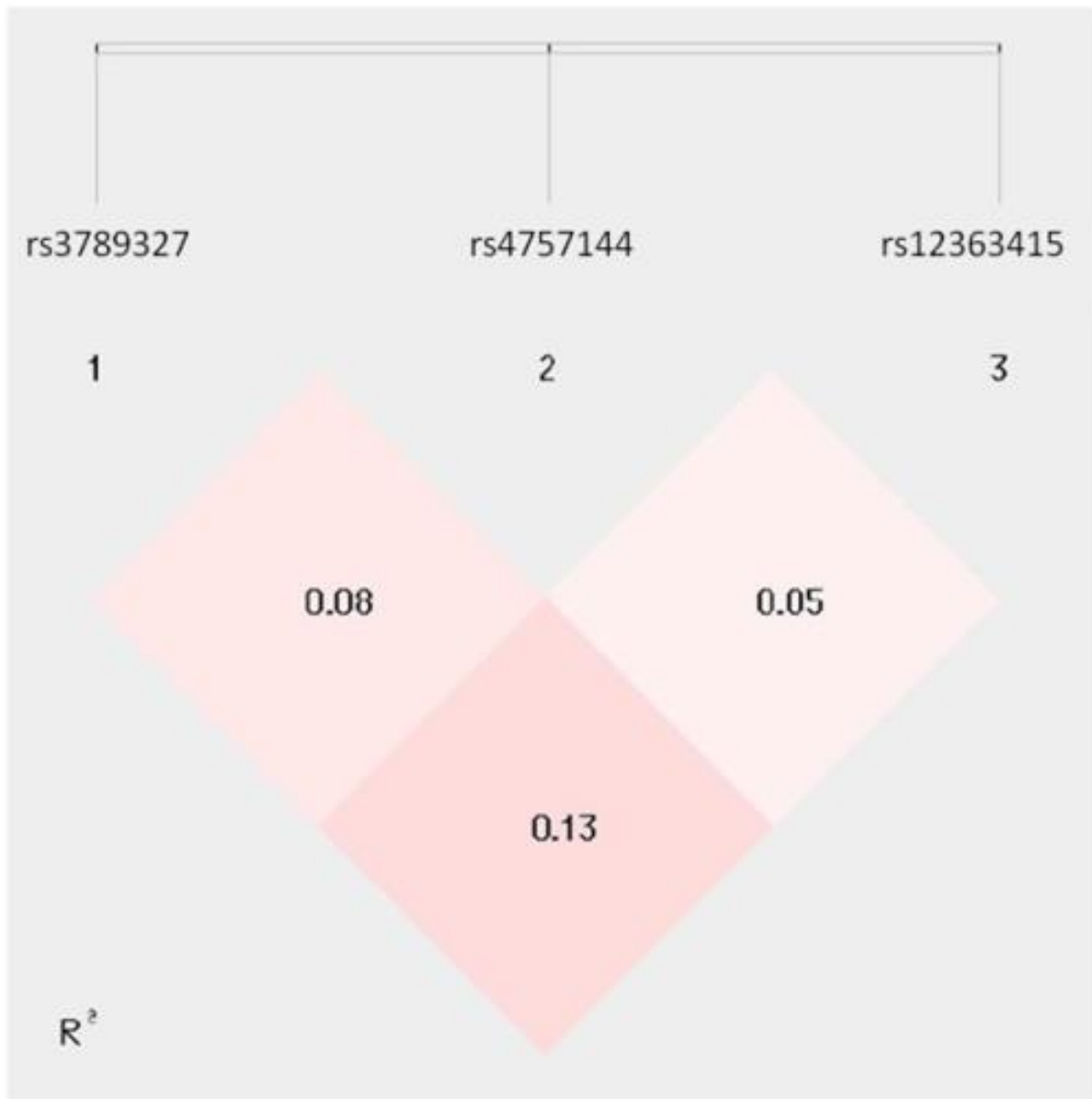
\*P vrijednosti dobivene su Pearsonovim  $\chi^2$  (chi kvadrat) testom

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 je velika. Na temelju  $D'$  iz Slike 2. vidljivo je da između rs3789327 i rs12363415 SNP-ova gena *ARNTL1* postoji mala mogućnost rekombinacije.



Slika 2. Neravnoteža povezanosti polimorfizama gena *ARNTL1* 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 rs4757144 i rs12363415, a najveće odstupanje populacije od ravnoteže vidljivo je između polimorfizama rs3789327 i rs4757144.



Slika 3. Povezanost polimorfizama gena *ARNTL1* i koeficijent neravnoteže ( $R^2$ ).

Analizirani su haplotipovi gena *ARNTLI*. Učestalost predviđenih haplotipova prikazana je u Tablici 8. Usporedbom četiriju najčešćih haplotipa između ispitanika i kontrolne grupe za tri polimorfizma gena *ARNTLI* nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 8. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova polimorfizama gena *ARNTLI* kod ispitanika s infarktom miokarda i kontrolne skupine.

	rs3789327	rs4757144	rs12363415	Učestalost (pacijenti)	Učestalost (kontrolne)	P*
<b>1</b>	A	G	A	0,19	0,16	0,562
<b>2</b>	G	A	A	0,18	0,16	0,604
<b>3</b>	G	G	A	0,13	0,13	0,627
<b>4</b>	A	A	A	0,35	0,39	<b>0,073</b>

\*P vrijednosti dobivene su SNPStats programom za analizu haplotipova

Povezanost polimorfizama gena *ARNTLI* i rizičnih čimbenika za KVB za pojedinu skupinu ispitanika prikazani su u Tablici 9. (Mann-Whitneyjev U test). Polimorfizam rs12363415 gena *ARNTLI* povezan je s dijabetesom tipa 2 ( $P = 0,049$ ).

Tablica 9. Povezanosti rizičnih čimbenika za KVB i polimorfizama gena *ARNTL1*

	<b>P*</b>					
	rs3789327		rs4757144		rs12363415	
	<b>Pacijenti</b>	<b>Kontrole</b>	<b>Pacijenti</b>	<b>Kontrole</b>	<b>Pacijenti</b>	<b>Kontrole</b>
<b>Pušenje</b>	0,421	0,82	0,072	0,332	0,595	0,433
<b>Hipertenzija</b>	0,741	0,756	0,983	0,25	0,326	0,626
<b>Dislipidemija</b>	0,661	0,348	0,546	0,012	0,287	0,431
<b>Respiratorne bolesti</b>	0,505	0,315	0,512	0,218	0,528	0,281
<b>Dijabetes mellitus I</b>	0,819	0,874	0,512	0,544	0,528	0,369
<b>Dijabetes mellitus II</b>	0,9	-	0,077	-	<b>0,049</b>	-
<b>Bolesti štitne žlijezde</b>	0,434	0,644	0,57	0,288	0,291	0,684
<b>Bolesti bubrega</b>	0,919	0,184	0,988	0,352	0,735	0,045
<b>Bolesti jetre</b>	0,747	0,595	0,231	0,913	0,508	0,598
<b>Pozitivna obiteljska anamneza KVB†</b>	0,882	0,099	0,104	0,876	0,561	0,009
<b>Prijašnji KVB-i†</b>	<b>0,013</b>	0,893	0,408	0,589	0,775	0,056

\*P vrijednosti dobivene su Mann-Whitneyjev U testom

†kardiovaskularne bolesti

## 5. RASPRAVA

U istraživanje je uključeno 200 pacijenata s preboljenim infarktom miokarda tipa 1 hospitaliziranih na Kliničkom odjelu za bolesti srca i krvnih žila s intenzivnim liječenjem, Klinički bolnički centar Osijek. Kriteriji uključivanja u istraživanje bila su zadovoljena najmanje dva od triju sljedećih kriterija: povišen biokemijski marker nekroze miocita troponin T (veći od 0,05; iznad 99. percentile), bol u prsištu duža od 30 minuta te promjene zabilježene na elektrokardiogramu. Kontrolnu je skupinu činilo 200 zdravih ispitanika koje je odabrao obiteljski liječnik. Uključeni su ispitanici koji nemaju medicinsku dokumentaciju o potvrđenoj teškoj kardiovaskularnoj bolesti te osobe koje nemaju dijabetes mellitus tipa 2. Istraživanjem smo pokušali utvrditi postoji li polimorfizam na razini jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) gena *ARNTL1* kod pacijenata s infarktom miokarda.

Analizirajući kardiovaskularne čimbenike rizika prema anamnestičkom upitniku utvrđeno je da kod ispitanica i kontrolne skupine postoji statistički značajna razlika u pušenju povezana sa životnom dobi.

U istraživanju su analizirana tri SNP-a gena *ARNTL1* (rs3789327, rs4757144, rs12363415). Statistički značajna razlika nije potvrđena za polimorfizme rs3789327, rs4757144 i rs12363415 kod pacijenata s infarktom miokarda i kontrolnih ispitanika. Razlike u učestalosti alela i genotipova, nakon korekcije za višestruko testiranje prema Bonferroniju, nisu dosegle zadani prag značajnosti.

Analiziranjem frekvencije alela u skupini pacijenata s infarktom miokarda i kontrolnoj skupini uočeno je da su većina pacijenata i kontrolne skupine heterozigoti A/G za SNP rs3789327 i rs4757144, a homozigoti A/A za SNP rs12363415. Statistički značajna razlika između pacijenata i kontrolne skupine nije uočena.

Vjerojatnost rekombinacije između polimorfizma rs3789327 i rs12363415 mala jer je vrijednost relativnog koeficijenta vezane neravnoteže 0,72 te da se ta dva polimorfizma nasljeđuju zajedno. Najveća je mogućnost rekombinacije između polimorfizama rs3789327 i rs4757144 jer je vrijednost relativnog koeficijenta vezane neravnoteže 0,31. Što je vrijednost relativnog koeficijenta vezane neravnoteže ( $D'$ ) bliže jedan, povezanost ispitivanih polimorfizama je veća, mogućnost zajedničkog nasljeđivanja je veća, a mogućnost

rekombinacije je manja. Populacija je najbliža ravnoteži za polimorfizme rs4757144 i rs12363415.

Analizom haplotipova gena *ARNTLI* i usporedbom četiriju najčešćih, između ispitanika i kontrolne skupine ne postoji statistički značajna razlika. Postoji težnja zajedničkog nasljeđivanja haplotipa AAA kod pacijenata s infarktom u odnosu na kontrolnu skupinu.

U ovom istraživanju možemo vidjeti povezanost polimorfizma rs12363415 i dijabetesa mellitusa tipa 2. Također, za polimorfizam rs3789327 postoji povezanost s prijašnjom dokazanom kardiovaskularnom bolešću u skupini pacijenata s infarktom miokarda. Osobe koje boluju od dijabetesa mellitusa tipa 2 i osobe s postojećom kardiovaskularnom bolesti u većem su riziku obolijevanja od infarkta miokarda. Nije pronađena izravna povezanost između triju proučavanih polimorfizama gena *ARNTLI* s pojavom infarkta miokarda. Povezanost s dijabetesom mellitusom tipa 2 značajna je jer je dijabetes jedan od rizičnih čimbenika za razvoj ateroskleroze te bolesti koronarnih arterija. To pridonosi povećanoj učestalosti infarkta miokarda.

Iz prethodnih istraživanja možemo uočiti povezanost cirkadijanog ritma i infarkta miokarda, tj. mutacija samih gena i utjecaja iz okoliša na same te gene. Mnoge druge bolesti također su povezane s genima cirkadijanog sata pa ih jednim imenom možemo nazvati kardiometaboličke bolesti (44 – 58).

Cirkadijana distribucija pojave infarkta miokarda zabilježena je prije više od četiri desetljeća u istraživanjima Svjetske zdravstvene organizacije (44). Najučestalija pojava simptoma vidljiva je između 6 i 12 sati prijepodne. Druga vršna vrijednost pojave infarkta miokarda bilježi se između 17 i 19 sati uvečer. Smatra se da je pojava infarkta miokarda tijekom jutarnjih sati povezana s diurnalnim varijacijama aktivnosti simpatičkog živčanog sustava, lučenjem glukokortikoida, aktivnosti renin-angiotenzin-aldosteron sustava, pojačane prokoagulantne i smanjene fibrinolitičke aktivnosti u krvožilnom sustavu, što za posljedicu ima povišenje krvnog tlaka, srčane frekvencije, kontraktilnosti te povećanje udarnog volumena srca i lokalne te sustavne hiperkoagulabilnosti (44, 45). Nasuprot tome, cjelokupna metabolička aktivnost, kontraktilnost, ionska homeostaza smanjeni su tijekom noći. Aktivnost vagusa pojačana je. Svi procesi usmjereni su ka obnovi stanične membrane kardiomiocita, kontraktilnog aparata, staničnih signalizacijskih puteva te energetske rezerve glikogena (46). Navedeni čimbenici koje bilježimo u jutarnjim satima utječu na porast krvnog tlaka i srčane frekvencije, a time i porast potrošnje kisika u miokardu. Istodobno je zabilježen i povećan



tonus koronarnih arterija sa smanjenom opskrbom miokarda kisikom. Sve to pridonosi rupturi aterosklerotskih plakova u koronarnoj arteriji i nastanku okluzivnog tromba (44, 47). Zabilježeno je da su navedene pojave povezane s ustajanjem iz kreveta te da kod osoba koje se nisu uspravljale nema izraženijih promjena u hemodinamici. Uspravan stav rezultira povećanjem srčane frekvencije i krvnog tlaka te pojačanim lučenjem katekolamina i glukokortikoida. Kortizol povećava osjetljivost koronarnih arterija na norepinefrin, a simpatikus pojačava agregabilnost trombocita (44, 48).

Mnogi čimbenici, kao što su demografski i geografski, sezonska promjena računanja vremena, lijekovi, komorbiditet, životni stil, prehrana, tjelesna aktivnost i mnogi drugi mogu utjecati na cirkadijanu varijaciju u pojavi infarkta miokarda. Zaključak o tome donesen je na temelju usporedbe istraživanja o cirkadijanoj varijaciji pojave infarkta miokarda iz prošlosti sa sadašnjima. Unatoč velikim promjenama životnog stila, prehrane, dijagnostike te terapije, isti uzorak pojave infarkta miokarda prisutan je i danas (44).

Ipak, neki čimbenici mogu promijeniti postojeći uzorak pojave infarkta miokarda u jutarnjim satima. Pacijenti koji su primali terapiju  $\beta$ -blokatorima, pacijenti s anamnezom dijabetesa mellitusa te oni s disfunkcijom autonomnog živčanog sustava imali su potpuno poništen cirkadijani uzorak pojave infarkta miokarda. Prema znanstvenim dokazima smatra se da je to posljedica dijabetičke autonomne neuropatije, nedostatka autonomne inervacije ili vlakana te blokade receptora simpatičkog živčanog sustava (44 – 46).

Neki drugi čimbenici poput mlađe životne dobi, ženskog spola, terapije statinima i aspirinom poništili su, ali ne u potpunosti, klasični uzorak cirkadijane pojave infarkta miokarda (44). Aspirin ireverzibilno acetilira ciklooksigenazu tipa 1 u trombocitima, enzim bitan za sintezu prostanglandina. Time smanjuje sintezu tromboksana A<sub>2</sub>, glavnog posrednika u agregaciji trombocita (49). Statini stabiliziraju koronarni plak inhibirajući leukocitne metaloproteaze te imaju antilipemični, antiinflamatorni, antiagregacijski i fibrinolitički učinak (7, 50, 51).

Koncentracije nekih kardioprotektivnih lijekova koji se uzimaju jednom u 24 sata u jutarnjim su satima najniže, tj. tijekom buđenja i ustajanja iz postelje. Pacijenti koji su dozu antihipertenziva uzimali prije spavanja imali su bolju regulaciju krvnog tlaka tijekom noći, ali i tijekom dana. Smanjen je kardiovaskularni rizik naspram pacijenata koji su antihipertenzive uzimali u drugo vrijeme dana. Pozitivni učinak na smanjenje agregabilnosti trombocita potvrđen je i prilikom aplikacije acetilsalicilne kiseline uvečer umjesto u jutarnjim satima (45, 52). Primjena lijekova u skladu s cirkadijanom funkcijom organizma te pokušajem

utjecaja na nju farmakološkim susptancama naziva se farmakokronoterapijom. Važnu ulogu u farmakokronoterapiji ima i melatonin. Otkrićem uloge u diurnalnim varijacijama funkcije različitih organa može biti upotrijebljen kao jedan oblik terapije prilikom desinkronizacije normalnog ritma. Ramelteon, sintetički analog melatonina rabi se u poremećajima spavanja i sindromu brze promjene vremenske zone (engl. *jet lag*) (30). Poznavanjem njegovog antioksidativnog i protektivnog učinka na stanice, spektar stanja u kojima se može rabiti kao terapija ili prevencija proširen je. Kao što je već navedeno renin-angiotenzin-aldosteron i simpatički sustav imaju važnu ulogu u fiziološkim funkcijama kao što je održavanja krvnog tlaka, elektrolitne i acidobazne ravnoteže te imaju ulogu neuro-humoralnih posrednika u diurnalnim varijacijama te patološkim stanjima poput remodeliranja kardiovaskularnog sustava. Na temelju tih spoznaja lijekovi koji djeluju na renin-angiotenzin-aldosteronski i simpatički sustav, poput inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima, blokatora angiotenzinskih receptora i  $\beta$ -blokatora, mogući su oblik farmakokronoterapije (25, 28, 32, 33).

Prije nepune dvije godine provedena je studija na 25 499 pacijenata s infarktom miokarda u Ausburgu, u Njemačkoj. Cilj je bio utvrditi postoji li povezanost između promjena ljetno i zimsko računanje vremena (pomicanje sata unaprijed ili unazad) te pojavnosti infarkta miokarda uslijed akutnog poremećaja cirkadijanog ritma. Studija je obuhvatila muškarce i žene od 25 do 74 godine. Podatci su prikupljeni od 1985. do 2010. godine. Rezultat studije upućuje da nema značajnog povećanja incidencije infarkta miokarda, ali pojedine podgrupe pacijenata bile su u većem riziku. To su osobe s prethodnim preboljelim infarktom miokarda te osobe koje u terapiji imaju jedan od inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima. Studija provedena 2013. godine u Hrvatskoj na 2412 hospitaliziranih pacijenata zbog akutnog infarkta miokarda zabilježila je značajan porast broja infarkta miokarda u prva četiri dana nakon proljetnog pomicanja sata unaprijed, posebno prvi ponedjeljak. Smještaj države u kojoj je provedena studija ima važan učinak na rezultat jer geografska dužina i širina utječu na to kako svjetlost i tama ulaze u interakciju s cirkadijanim ritmom čovjeka (53).

Utjecaj cirkadijanog ritma na kardiovaskularni sustav proučen je i u mnogim drugim istraživanjima. Smjenski rad može povećati rizik za hipertenziju, upalna stanja i kardiovaskularne bolesti zbog poremećaja cirkadijanog ritma unatoč kontroli klasičnih rizičnih čimbenika. Te promjene dokazane su u kontroliranim pokusima na ljudima. Rezultat noćne aktivnosti i deprivacije sna bio je porast krvnog tlaka, nedovoljno sniženje tlaka tijekom noći, porast srčane frekvencije i smanjenje vagalne aktivnosti do 15 %. Povećane su

vrijednosti IL-6, CRP-a, TNF $\alpha$  i rezistina. Svi ti čimbenici pomažu razvoju upale i kardiovaskularnih bolesti (54).

Provedena su istraživanja na životinjama, najčešće glodavcima i to miševima. Stvoreni su sojevi bez pojedinih centralnih i perifernih gena cirkadijanog ritma. Tim istraživanjima rasvijetljene su funkcije pojedinih gena cirkadijanog ritma unutar kardiovaskularnog, ali i drugih organskih sustava. Miševi kojima nedostaje centralni gen *ARNTLI* pokazivali su nedostatak dnevnih varijacija u promjenama krvnog tlaka te poremećaje u ponašanju. Miševi bez *ARNTLI* gena u vaskularnom endotelu imali su oštećenu funkciju endotela (endotelna disfunkcija) te poremećaj odgovora na acetilkolin i smanjenu sintezu dušikovog oksida. Arterije miševa s oštećenim perifernim vaskularnim *ARNTLI* genom bile su široke i sklone trombozi. Transplantacija zdrave karotidne arterije kod miša bez endotelnog *ARNTLI* gena rezultirala je višestrukim aterosklerotičnim lezijama u njoj. Nedostatak tog perifernog gena nije utjecao na druge funkcije u organizmu. Miševi bez kardiomiocitnog *ARNTLI* gena razvili su i neke druge promjene poput dilatativne kardiomiopatije, strukturne promjene skeletnih mišića te neplodnost. Kod starijih miševa zabilježeno je progresivno smanjenje ejskijske frakcije i zatajenje srca. Miševi su pokazivali i sporiju srčanu frekvenciju i produžene RR intervale s većom vjerojatnošću pojave aritmije (45, 47). Također, kod tih miševa struktura kontraktilnog aparata bila je dezorganizirana, a funkcija srčanog mišića oslabljena. Zabilježen je smanjen volumen mitohondrija i poremećaj u respiracijskom lancu. Iz istraživanja na glodavcima znanstvenici su zaključili da je funkcija *ARNTLI* gena zapravo kardioprotektivna (55).

Studijama na štakorima uočeno je da pojedine proteinske komponente kalijjskih, natrijskih i kalcijjskih naponom reguliranih kanala podliježu diurnalnim varijacijama u sintezi, što se očituje na različitoj propusnosti membrane za te ione, a time i autonomnoj aktivnosti srca te kontraktilnosti (46).

Kako za funkciju kardiovaskularnog sustava, tako i za održavanje metaboličke ravnoteže iznimno su važne diurnalne varijacije u aktivaciji pojedinih gena cirkadijanog ritma (56). Normalne dnevne oscilacije hranjenja i gladovanja podudaraju se s diurnalnim varijacijama u apsorpciji i metabolizmu nutrijenata. Istraživanjima na glodavcima i ljudima dokazane su te varijacije. Metabolički putevi pod nadzorom su gena cirkadijanog ritma izravno ili diurnalnim varijacijama u koncentraciji hormona. Glavni hormoni koji nadziru metaboličke funkcije jesu inzulin, kortizol, melatonin, norepinefrin i epinefrin, hormon rasta, testosteron, estrogen i hormoni štitnjače (55, 57). Hrana različito utječe na gene cirkadijanog sata. Kad zdrava

odrasla osoba pojede ugljikohidratima bogat obrok (doručak, ručak, večera) najniže vršne vrijednosti glukoze bilježe se nakon doručka, a najveće nakon večere. Kontinuirana infuzija glukoze tijekom 24 sata pokazuje najveći porast glukoze tijekom noći, a pad razine glukoze u jutarnjim satima. Na temelju tog istraživanja objašnjena je dostupnost makronutrijenata ovisno o obroku koji pojedemo te osjetljivost pojedinih tkiva na inzulin u različito doba dana (47, 55, 57).

U mnogim dosadašnjim epidemiološkim istraživanjima dokazano je da smjenski rad, nedostatak sna, unos nekvalitetne hrane te zapadnjači stil života utječu na desinkronizaciju centralnog i perifernih satova. Kronična disrupcija cirkadijanog ritma povećava rizik za razvoj metaboličke disfunkcije. Rezultat su pretilost i dijabetes mellitus tipa 2 (56 – 58).

Jedana od osnovnih pretpostavki da poremećaji cirkadijanog ritma uzrokovani zapadnjačkim stilom života dovode do razvoja metaboličkih bolesti proizlazi iz promatranja sisavaca koji ulaze u hibernaciju tijekom hladnijeg razdoblja godine. Tijekom kasnog proljeća, ljeta i rane jeseni te životinje dulje ostaju budne i konzumiraju veće količine hrane, što im povećava zalihe masnog tkiva, dovodi do inzulinske i leptinske rezistencije. Ulaskom u hibernaciju te životinje iskorištavaju metaboličke zalihe i tako postupno povećavaju inzulinsku i leptinsku osjetljivost do novog razdoblja u kojem će svakodnevno moći konzumirati hranu. Budući da je kod ljudi takav obrazac ponašanja neprihvatljiv i evolucijski napušten, ljudi su u cjeloživotnom stanju „ljeta“ izloženi velikim količinama kalorija i umjetne svjetlosti (26).

U bijelom masnom tkivu pretilih osoba razvija se sterilna upalna reakcija s pojačanom proizvodnjom adipocitnih citokina. Citokini masnog tkiva djelujući na suprahijazmatsku jezgru i hipotalamički centar za prehranu uzrokuju rezistenciju na leptin, jedan od glavnih produkata bijelog masnog tkiva. Time dovode do pogoršanja metaboličke disfunkcije te nastanka metaboličkog sindroma. Ekspresija leptinskog gena pod utjecajem je proteinskih produkata gena cirkadijanog ritma. Funkcija je leptina da centralnim učinkom smanji osjet gladi, apetit te da poveća utrošak energije (56).

U pokusima provedenima na miševima i ostalim glodavcima utvrđene su i mnoge važne uloge *ARNTL1* gena u metaboličkim procesima. Miševi s delecijom centralnog *ARNTL1* gena imali su narušenu ravnotežu oreksigeničnih i anoreksigeničnih neuropeptida u hipotalamičkom centru za glad, a također i diurnalne varijacije u prehrani i lokomotornoj aktivnosti, s povećanjem inzulinske rezistencije cijelog organizma te porastom tjelesne težine i povećanim unosom hrane u vrijeme neaktivnosti (55, 56). Slične promjene uočene su i kod glodavaca s

delecijom *ARNTL1* gena u  $\beta$  stanicama gušterače te adipocitima. Te promjene mogu biti povezane i sa starenjem jer je uočeno da pokusne životinje s delecijom *ARNTL1* gena stare brže nego kontrole (58).

Istražen je i nedostatak gena u pojedinim perifernim tkivima s utjecajem na metabolizam ili pojedini metabolički put. Nedostatak *ARNTL1* u masnom tkivu rezultirao je povećanjem adipocita, u jetri povećanom inzulinskom osjetljivošću i napadajima hipoglikemije te povećanjem koncentracije LDL-a (engl. *low-density lipoprotein*) i VLDL-a (engl. *very low-density lipoprotein*) zbog disfunkcije kompleksa PCSK9 (engl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) molekule i LDL receptora (56, 58). Budući da je jetra središnji organ u kojemu se odvija metabolizam i detoksikacija u organizmu, istraživanja na tom organu doprinijela su sveukupnom shvaćanju metabolizma. Također je utvrđena važnost REV-ERB $\alpha$ . To je jezgrin receptor s važnom funkcijom u metabolizmu ugljikohidrata i lipida u jetri, ali i u masnom tkivu i mišiću. On je poveznica između metabolizma i termogeneze u smeđem masnom tkivu (58).

Funkcija i količina crijevne mikroflore također oscilira tijekom 24-satnog ciklusa te različito utječe na apsorpciju hrane. Utjecajem slatkiša i antibiotika može doći do promjene u ravnoteži određenih bakterija crijevne mikroflore, što za rezultat ima poremećaj u funkciji crijeva i jetre (56, 57).

U prethodnim istraživanjima zabilježena je povezanost SNP-a gena *ARNTL* s dijabetesom mellitusom tipa 2 kao i u našem istraživanju. Neki od polimorfizama tog gena bili su povezani s hipertenzijom, što u našem istraživanju nije potvrđeno (56, 58). Budući da različita istraživanja na ljudima nisu etički prihvatljiva zato jer pojedine uzorke tkiva nije moguće dobiti ili zahtijevaju ponovljene bolne procedure, postoji relativno manje podataka u istraživanjima na ljudima. Subkutanom biopsijom ljudi s dijabetesom mellitusom tipa 2 te zdravih pojedinaca uočena je razlika u sintezi melatonina u tim dvjema skupinama. Zabilježena je značajna redukcija sekrecije kod osoba s dijabetesom mellitusom tipa 2. U studijama deprivacije sna uočeno je povećanje tjelesne mase povezano s unosom velikih količina kalorične hrane, poremećajem diurnalne sekrecije melatonina te pojavom inzulinske rezistencije (58). Dijabetes je dosegao epidemiološke razmjere rasprostranjenosti diljem svijeta. Višestruko povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da dijabetes mellitus tipa 2 i kardiovaskularne bolesti imaju zajedničku osnovu, disrupciju gena cirkadijanog ritma. Zato ih nazivamo jednim imenom, kardiometaboličkim bolestima. Osobe s dijabetesom imaju poremećene dnevne varijacije u koncentraciji glukoze te krvnog tlaka.

Također, kod takvih osoba češće su hipertenzivne komplikacije i akutni događaji poput infarkta miokarda i ishemijskog moždanog udara (47). Kardiometabolička bolest povezana je i s dislipidemijom te povećanjem vrijednosti markera upale poput C-reaktivnog proteina. On je važan prediktivni čimbenik kardiovaskularnog rizika te je u korelaciji s aktivnošću upale u aterosklerotskim plakovima (51).

Poremećaj sna koji je vrlo čest među sredovječnim pretilim muškarcima, opstruktivna apneja u snu (OSA, engl. *opsturctive sleep apnea*), uvelike pridonosi povećanju rizika od kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti. Takve osobe izložene su varijacijama u trajanju kvalitetnog sna, sistemnoj i plućnoj hipertenziji, neravnoteži aktivnosti simpatikusa i parasimpatikusa i poremećajima zgrušavanja krvi. Ti čimbenici povećavaju rizik nastanka iznenadne srčane smrti, infarkta miokarda ili moždanog udara. Također zbog poremećaja cirkadijanog ritma dolazi i do povećanog rizika razvoja dijabetesa mellitusa tipa 2. Terapija kontinuiranom aplikacijom pozitivnog tlaka (CPAP, engl. *continous positive airway pressure*) tijekom sna poboljšava ventilaciju i smanjuje rizik, što se direktno može dokazati plinskom analizom krvi i redukcijom broja crvenih krvnih stanica na normalnu razinu (31, 46, 58).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- Ne postoji direktna povezanost između polimorfizama *ARNTL1* gena cirkadijanog ritma i pojavnosti infarkta miokarda. Nije pronađena statistički značajna razlika između SNP-a rs3789327, rs4757144 i rs12363415 između ispitanika iz dvije skupine.
- Najčešći čimbenici rizika za razvoj infarkta miokarda kojima su bili izloženi ispitanici iz skupine pacijenata hipertenzija, dislipidemija, dijabetes mellitus tip 2, pozitivna obiteljska te osobna anamneza na kardiovaskularne bolesti. Većina pacijenata sa preboljenim infarktom miokarda u nekom razdoblju života konzumirala je kofein i pušila cigarete.
- SNP rs12363415 je statistički značajno učestaliji kod pacijenata s dijabetesom mellitusom tip 2 te rs3789327 kod pacijenata s anamnezom prijašnjih kardiovaskularnih bolesti. Dijabetes mellitus i prijašnje kardiovaskularne bolesti predstavljaju čimbenik rizika u nastanku infarkta miokarda.
- Analizom haplotipova gena *ARNTL1* i usporedbom četiriju najčešćih, između skupine ispitanika i kontrola ne postoji statistički značajna razlika. Postoji težnja zajedničkog nasljeđivanja haplotipa AAA kod pacijenata s infarktom u odnosu na kontrolnu skupinu.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja.** Glavni cilj istraživanja bio je pokušati dokazati povezanost genetičkih varijanti gena *ARNTLI* i infarkta miokarda.

**Ustroj studije.** Studija slučaja i kontrola.

**Ispitanici i metode.** Naše istraživanje provedeno je na ukupno 400 osoba. U prvoj skupini bilo je 200 pacijenta sa preboljenim infarktom miokarda tip 1 liječenih u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Drugu skupinu činilo je 200 zdravih osoba regrutiranih od strane obiteljskog liječnika. Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost polimorfizama jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) gena *ARNTLI* i infarkta miokarda. Svi ispitanici genotipizirani su na tri polimorfizma gena *ARNTLI* (rs3789327, rs4757144, rs12363415).

**Rezultati.** Nije potvrđena statistički značajna razlika polimorfizama gena *ARNTLI* između pacijenata i kontrola. Istraživanje je pokazalo da ne postoji direktna povezanost infarkta i polimorfizama gena *ARNTLI*, ali polimorfizmi rs3789327 i rs12363415 povezane su sa čimbenicima rizika za razvoj akutnih komplikacija. To su dijabetes mellitus tip 2 za polimorfizam rs12363415 te prijašnja dijagnoza kardiovaskularnih bolesti za polimorfizam rs3789327. Dijabetes mellitus tip 2 je važan rizični čimbenik jer je povezan sa razvojem ateroskleroze i bolesti koronarnih arterija.

**Zaključak.** Rezultati su pokazali da ne postoji direktna veza između SNP-ova *ARNTLI* gena i infarkta miokarda. Povezanost je pronađena između SNP-ova i čimbenika rizika za razvoj infarkta miokarda. Na temelju toga možemo reći da polimorfizam *ARNTLI* gena ima određenu ulogu u nastanku infarkta miokarda.

**Ključne riječi:** *ARNTLI* gen; cirkadijani ritam; infarkt miokarda



## 8. SUMMARY

### **Variation in *ARNTLI* gene in patients with myocardial infarction**

**Objectives.** The main aim of the study was to establish the association of genetic variants of the *ARNTLI* gene with the onset of myocardial infarction.

**Study design.** Case-control study

**Participants and Methods.** Our research is conducted on a total of 400 people. In the first group there were 200 patients with myocardial infarction type 1 treated at Clinical Hospital Center Osijek. The second group consisted of 200 healthy persons recruited by a family physician. The goal of the study was to determine the correlation between single nucleotide polymorphisms of *ARNTLI* gene and myocardial infarction. All subjects were genotyped into three polymorphisms of the *ARNTLI* gene (rs3789327, rs4757144, rs12363415).

**Results.** There was no statistically significant difference between polymorphisms of *ARNTLI* gene in patients and controls. Research has shown that there is no direct link between infarction and single nucleotide polymorphisms of the *ARNTLI* gene, but rs3789327 and rs12363415 polymorphisms are associated with risk factors for the development of acute complications. These are diabetes mellitus type 2 for rs12363415 polymorphism and previous diagnosis of cardiovascular diseases for rs3789327 polymorphism. Type 2 diabetes mellitus is an important risk factor because it is associated with the development of atherosclerosis and coronary artery disease.

**Conclusion.** The results show that there is no direct link between SNP's of *ARNTLI* gene and myocardial infarction. The association of SNPs and risk factors in the development of the infarction was found. Based on this, the polymorphism of the *ARNTLI* gene has a certain role in the emergence of myocardial infarction

**Key words:** *ARNTLI* gene; circadian rhythm; myocardial infarction

## 9. LITERATURA

1. The joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial Infarction redefined –A consensus document of the the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee redefinition myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2000;2:1502-13.
2. Duraković Z, Šmalcelj A. Poremećaji koronarnog krvotoka. U: Gamulin S, urednik. *Patofiziologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 891-901.
3. 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.
4. Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Alan S. Population Trends in the Incidence and Outcomes of Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2010;362:2155-65.
5. HZJZ. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2014. godinu. Dostupno na: [http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/04/ljetopis\\_20141.pdf](http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/04/ljetopis_20141.pdf). Datum pristupa: 20.4.2017.
6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, White HD. Third Universal definition of Myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:1-18.
7. Hadžibegović I. Statinska terapija-DA ili NE: sigurna odluka o primarnoj i sekundarnoj prevenciji. *Medicus.* 2016;25:153-7.
8. Ernst A, Gašparović H. Revaskularizacija miokarda. U: Vrhovac B i sur, urednici. *Interna medicina*. 4. izdanje. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 601-6.
9. Zehnder JL. Lijekovi za liječenje poremećaja koagulacije. U: Katzung BG i sur, urednici. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 587-603.
10. Jelić I, Gašparović H. Ishemijska bolest srca. U: Tomislav Šoša i sur, urednici. *Kirurgija*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2007. str 823-30.
11. Prpić I i suradnici. *Kirurgija za medicinare*. 3. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
12. Ivanuša M. Sekundarna prevencija nakon akutnog infarkta miokarda: Važnost kardiovaskularne rehabilitacije i farmakološkog liječenja. *Medicus* 2015;25:127-31.
13. Krčmar T. Što je muškarac bez stenta? Kako dugoročno liječiti bolesnike nakon preboljelog infarkta miokarda. *Medicus.* 2016;25:159-66.
14. 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.

15. Nikolić-Heitzler V. Infarkt miokarda (sa ST-elevacijom). U: Vrhovac B i sur, urednici. Interna medicina. 4. izdanje. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 587-599.
16. Čustović F. Anamneza i fizikalni pregled. 5. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2009.
17. Normalni elektrokardiogram. Hall JE, Guyton AC. Medicinska fiziologija. 12. izd. Philadelphia: Saunders; 2011. str. 121-7.
18. Mirat J. EKG u kliničkoj praksi. 1. izd. Osijek: Medicinski fakultet Osijek, Poliklinika kardioton, Studio HS d.o.o: 2014.
19. David RF. Basic electrocardiography in ten days. 10th ed. Singapur: Mc Graw-Hill: 2001.
20. Klinkenberg LJJ, Van Dijk JW, Tan FES, Van Loon LJC, Van Diejen-Visser MP, Meex SJR. Circulating Cardiac Troponin T Exhibits a Diurnal Rhythm. J Am Coll of Cardiol. 2014;63:1788-95.
21. Schumacher MA, Basbaum AI, Way WL. Opioidni analgetici i antagonisti. U: Katzung BG i sur, urednici. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 531-52.
22. Katzung BG, Parmley WW. Lijekovi za liječenje zatajenja srca. U: Katzung BG i sur, urednici. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 209-24.
23. ARNTL gene (protein coding) Dostupno na adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARNTL> Datum pristupa: 21.4.2017.
24. Kovanen L, Saarikoski ST, Aromaa A, Lonnqvist J, Partonen T. ARNTL (BMAL1) and NASP2 Gene Variations Contribute to Fertility and Seasonality. PloS ONE. 2010;5:1-6.
25. Takeda N, Maemura K. Circadian clock and vascular disease. Hypertens res. 2010; 33:645-51.
26. Prasai MJ, George JT, Scott EM. Molecular clock, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Diabetes Vasc Dis Res. 2008;5:89-95.
27. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of Circadian Entrainment. Physiol Rev. 2010;90:1063-02.
28. Martino TA, Sole MJ. Molecular Time An Often Overlooked Dimension to Cardiovascular Disease. Circ Res. 2009;105:1047-61.
29. 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.

30. Zee PC, Attratian H, Videnovic A. Circadian Rhythm Abnormalities. *Continuum*. 2013;19:132-47.
31. Takeda N, Maemura K. The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015;345:1008-15.
32. Portaluppi F, Tiseo R, Smolensky MH, Hermida RC, Ayala DE, Fabbian F. Circadian rhythms and cardiovascular health. *Sleep Med Rev*. 2012;16:151-66.
33. Trevor A, Way WL. Anksolitici i sedativi-hipnotici. U: Katzung BG i sur, urdenici. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 371-86.
34. Bušić M, Kuzmanović-Elajber B, Bosnar D. *Seminaria ophtalmologica*. 3 izd. Zagreb: Cerovski d.o.o.; 2014.
35. Kolačić I. Istraživanje slučajeva i kontrola. U: Kolačić I, Vorko-Jović A, urednici. *Epidemiologija*. 1. izd. Zagreb: Medicinske naklada; 2012. str. 65-78.
36. QIAGEN. Dostupno na adresi: <file:///C:/Users/KOrisnik/Downloads/HB-0329-003-1090246-HB-QIAmp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW.pdf>. Datum pristupa: 25.4.2017.
37. Thermo Fisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html> Datum pristupa: 26.4.2017.
38. Thermo Fisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html> Datum pristupa: 26.4.2017.
39. Cooper GM, Hausmann RE. *Stanica: Molekularni pristup*. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
40. DNA-tehnologija i njezina primjena. Turnpenny P, Ellard S. Emeryjeve osnove medicinske genetike. 14. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 53-72.
41. Malkki M, Petersdorf EW. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by 5' Nuclease Allelic Discrimination. *Methods Mol Biol*. 2012;882:1-10.
42. Young SHI, Lin HE. SHEsis a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 2005;15:97-8.
43. 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.
44. Kanth R, Ittaman S, Rezkalla S. Circadian Patterns of ST Elevation Myocardial Infarction in the New Millennium. *Circulation*. 2013;11:66-72.

45. Takeda N, Maemura K. Circadian clock and the onset of cardiovascular events. *Hypertens Res.* 2016;39:383-90.
46. Martino TA, Young ME. Influence of the Cardiomyocyte Circadian Clock on Cardiac Physiology and Pathophysiology. *J Biol Rhythms.* 2015;20:1-23.
47. Scott EM. Circadian clocks, obesity and cardiometabolic function. *Diabetes Obes Metab.* 2015;7:84-9.
48. Holmes DR, Aguirre FV, Aplin R, Lennon RJ, Nestler DM, Bell MR i suradnici. Circadian Rhythms in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2014;3:382-9.
49. Bielen L, Knežević A. Niske doze acetilsalicilne kiseline: pregled indikacija. *Medicus.* 2015;25:115-20.
50. Malloy MJ, Kane JP. Lijekovi za liječenje dislipidemija. U: Katzung BG i sur, urdenici. *Temeljna i klinička farmakologija.* 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 605-19.
51. Zhang L, Jain MK. Beating against the clock. Circadian time signatures of fitness and disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:2558-9.
52. Chen L, Yang G. Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system. *Front Pharmacol.* 2015;6:1-7.
53. Kirchberger I, Wolf K, Heier M, Kuch B, von Scheidt W, Peters A i suradnici. Are daylight saving time transition associated with changes in myocardial infarction incidence? Results from the German MONICA/KORA Myocardial Infarction Registry. *BMC Public Health.* 2015;15:1-8.
54. Moris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FAJL. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:1402-11.
55. McGinnis GR, Young ME. Circadian regulation of metabolic homeostasis: causes and consequences. *Nat Sci Sleep.* 2016;8:163-80.
56. Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. A role for circadian clock in metabolic disease. *Hypertens Res.* 2016;39:483-91.
57. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science.* 2016;354:1008-15.
58. Dubiner C, Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J Int Med.* 2015;277:513-27.

## 10. ŽIVOTOPIS

Anton Šarčević  
Medicinski fakultet Osijek  
J. Huttlera 4, 31000 Osijek  
asarcevic@mefos.hr

Datum i mjesto rođenja:  
12. siječnja, 1993.  
Osijek, Hrvatska  
Kućna adresa:  
Ulica svete Ane 36, 31000 Osijek  
tel: +385958721972  
asarcevic1201@gmail.com

### Obrazovanje:

Od 2011. Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2007. – 2011. Prirodoslovno – matematička gimnazija u Osijeku

1999. – 2007. Osnovna škola Svete Ane

### Ostale aktivnosti:

Od 2009. aktivno se bavim karateom

2013. godine sudjelovanje na pripremama Hrvatske karate reprezentacije u Zagrebu kao predstavnik karate kluba Hrvatski sokol Osijek