Genski polimorfizmi estrogenskog receptora alfa, androgenog receptora i aromataze u izoliranoj fibrilaciji atrija

Golubić, Karlo

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:708344

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Golubić, Karlo (2013) ***Genski polimorfizmi estrogenskog receptora alfa, androgenog receptora i aromataze u izoliranoj fibrilaciji atrija [Genetic polymorphisms of the estrogen receptor alpha, androgen recptor, and aromatase in lone atrial fibrillation].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2098

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Karlo Golubić

Genski polimorfizmi estrogenskog receptora alfa, androgenog receptora i aromataze u izoliranoj fibrilaciji atrija

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena na Klinici za bolesti srca i krvnih žila, Klinici za unutrašnje bolesti i Kliničkom zavodu za medicinsku kemiju i biokemiju KBC-a Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Atrijska fibrilacija: od genoma do fenotipa i kliničke slike, br. 108-1081875-2001.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Anton Šmalcelj, specijalist interne medicine, subspecijalist kardiologije

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojem mentoru prof. dr. sc. Antonu Šmalcelju na pomoći oko planiranja istraživanje te provođenja njegovog kliničkog dijela kao i pomoći oko pisanja konačne disertacije.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Zorani Grubić na požrtvovnom radu i dr. sc. Katarini Štingl na provođenju molekularno-dijagnostičkih metoda te doc. dr. sc. Darku Kaštelanu na pomoći oko kontrolne skupine.

Hvala i dr. sc. Rajni Golubić na njenom radu na statističkoj analizi podataka kao i brojnim korisnim savjetima.

Naposljetku hvala svima koji su na bilo koji način pridonjeli nastajanju ove disertacije.

Rad posvećujem svojoj obitelji.

POPIS KRATICA

FA	fibrilacija atrija
LA	lijevi atrij
LV	lijevi ventrikl (klijetka)
GWAS	genomsko istraživanje, eng. genome wide assotiation study
PCR	lančana reakcija polimeraze, eng. polymerase cahin reaction
CI	interval pouzdanosti (engl. Confidence Interval)
AR	receptor za androgene
ESR	receptor za estrogene
OR	omjer izgleda (engl. odds ratio)

POPIS SLIKA

Slika 1 Funkcija aromataze 31

Slika 2 Protokol uključivanja ispitanika u istraživanje 41

Slika 3 Distirbucija (TA)n polimorfizma 48

Slika 4 ESR1 haplotipovi kod muškaraca 52

Slika 5 Distribucija (CAG)n polimorfizma 54

Slika 6 Haplotipovi AR kod žena 59

Slika 7 Distribucija (TTTA)n polimorfizma 61

Slika 8 Omjeri izgleda za FA za pojedine varijable prema binarnoj logističkoj regresiji 68

POPIS TABLICA

Tablica 1 Genske asocijacije FA 9
Tablica 2 Genski polimorfizmi AR 21
Tablica 3 Neki klinički istraženi ESR1 polimorfizmi 28
Tablica 4 CYP19A1 polimorfizmi 36
Tablica 5 Podjela polimorfizama na duge (L) i kratke (S) alele 45
Tablica 6 Klinički i ehokardiografski pokazatelji ispitanika s izoliranom FA i kontrola 46
Tablica 7 Distribucija pojedinih alela prema broju (TA)n 49
Tablica 8 Distribucija pojedinih alela prema broju (TA)n i spolu ispitanika 50
Tablica 9 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (TA)n prema spolu ispitanika 51
Tablica 10 Razlike frekvencija kombinacija alela ESR1 gena prema spolu ispitanika 51
Tablica 11 Distribucija pojedinih alela prema broju (CAG)n 55
Tablica 12 Distribucija pojedinih alela prema broju (CAG)n i spolu ispitanika 56
Tablica 13 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (CAG)n prema spolu ispitanika 58
Tablica 14 Razlike frekvencija kombinacija alela AR gena prema spolu ispitanika 58
Tablica 15 Distribucija pojedinih alela prema broju (TTTA)n 62
Tablica 16 Distribucija pojedinih alela prema broju (TTTA)n i spolu ispitanika 63
Tablica 17 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (TTTA)n prema spolu ispitanika 63

Tablica 18 Razlike frekvencija kombinacija alela CYP19A1 gena prema spolu ispitanika 64
Tablica 19 Modeli multivarijabilne analize 66
Tablica 20 Modeli logističke regresije međusobnih kombinacija "rizičnih" alela..... 67

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Epidemiologija 2
1.1.1. Spolne razlike 2
1.1.2. Breme bolesti 2
1.2. Mehanizmi nastanka 3
1.2.1. Elektrofiziološki mehanizmi 4
1.2.2. Čimbenici povezani s FA 5
1.3. Izolirana fibrilacija atrija 7
1.4. Genetika fibrilacije atrija 8
1.4.1. Genske asocijacije 8
1.4.2. FA kao monogenska bolest 11
1.4.3. FA povezana s drugim monogenskim bolestima 14
1.5. Spolni hormoni i aritmije 16
1.5.1. Androgeni 17
1.5.2. Estrogeni 22
1.5.3. Aromataza 29
2. HIPOTEZA 37
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 38
4. ISPITANICI I METODE 39
4.1. Ispitanici 39
4.1.1. Bolesnici 39
4.1.2. Kontrolna skupina 40
4.2. Metode 42
4.2.1. Ehokardiografija 42
4.2.2. Određivanje genotipova 42
4.2.3. Statistička obrada podataka 44
5. REZULTATI 46
5.1. Rezultati genotipizacije estrogenskog receptora alfa 47
5.2. Rezultati genotipizacije androgenog receptora 53
5.3. Rezultati genotipizacije aromataze 60
5.4. Binarna logistička regresija 65

6. RASPRAVA 69
7. ZAKLJUČAK 75
8. SAŽETAK 76
9. SUMMARY 79
10. LITERATURA 82
11. ŽIVOTOPIS 100
12. PRILOZI 101

1. UVOD

Kako bi se elektromehanički impuls mogao ispravno kretati kroz stanice miokarda, potrebna je potpuna ravnoteža strukturalnih i ionskih komponenata. Kada je ta ravnoteža poremećena, nastaje kaotična električna aktivnost odnosno fibrilacija koja može zahvatiti bilo koju srčanu komoru (1). Fibrilacija atrija (FA) je najčešća postojana aritmija (2). Njena osnovna karakteristika je neorganizirana, brza i nepravilna aktivacija atrija koja dovodi do nepravilne aktivacije ventrikula. Klinički, FA se dijeli u nekoliko podvrsta: novootkrivena, paroksizmalna (rekurentne epizode koje se spontano prekidaju u manje od 7 dana), persistentna (rekurentne epizode koje traju dulje od 7 dana), dugovječna perzistentna (perzistentna koja traje dulje od godinu dana) te permanentna (trajni osnovni ritam) (3). 1-2% opće populacije oboljeva od FA što je gotovo 90000 ljudi u Republici Hrvatskoj, a za očekivati je da će se prevalencija FA udvostručiti tijeko sljedećih 50 godina, usporedno sa starenjem populacije (4). FA je progresivna bolest koja može početi klinički inaparentno te se zatim manifestirati povremenim epizodama koje postaju sve dulje i učestalije da bi naposljetku, zbog negativnog preoblikovanja lijevog atrija (LA), postala trajna. Klasičan tijek bolesti također uključuje elektrofiziološke promjene na molekularnoj razini, kao i stvaranje fibroze i mehaničkih promjena LA. U FA izostaje normalna kontrakcija atrija što zajedno sa ranije navedenim promjenama dovodi do stvaranja trombogene sredine u LA. Najčešće mjesto stvaranja tromba u FA je aurikula LA. Jednom kada nastane tromb u LA postoji opasnost njegove mobilizacije i prelazka u lijevu klijetku te u aortu s izazivanjem tromboembolijskih komplikacija (3). FA povezana je sa peterostruko većim rizikom nastanka moždanog udara te sa težim

posljedicama i češćim recidivima moždanog udara (3). Upravo zbog navedenih rizika, lijekovi koji sprečavaju formiranje tromba čine okosnicu terapije FA. Drugi važni dio terapije FA čine lijekovi za kontrolu frekvencije odnosno ritma. U novije vrijeme bilježi se i pomak prema takozvanoj "uzvodnoj" terapiji inhibitorima ACE i statinima, prije nastanka kliničke slike bolesti i njezinih komplikacija. Zbog toga bi bilo od velike koristi identificirati dodatne čimbenike rizika nastanka FA te učiniti stratifikaciju rizika.

1.1. Epidemiologija

FA može često biti prisutna kod bolesnika bez razvoja kliničke slike te tako biti nedijagnosticirana. Mnogi bolesnici sa FA nikada ne budu hospitalizirani. Zbog toga se smatra da je stvarna prevalencija FA u općoj populaciji blizu 2%. Prevalencija FA povećava se sa starošću ispitanika od 0.5% u dobi od 40–50 godina, do 5–15% u dobi od 80 godina (4-7). Cijeloživotni rizik dobivanja FA je 25% u ljudi koji su doživjeli 40 godina (8). Incidencija FA posljednja je dva desetljeća u porastu od 13%.

1.1.1. Spolne razlike

FA češće zahvaća muškarce nego žene. Čak i nakon korekcije prema etiološkim čimbenicima poput ishemijske i hipertenzivne bolesti srca, prevalencija FA kod muškaraca je 1.5 puta veća nego kod žena (2). Te razlike mogle bi upućivati na ulogu spolnih hormona i njihovih receptora u nastanku FA.

1.1.2. Breme bolesti

FA je povezana s povećanom stopom smrtnosti, moždanog udara te drugih trombo-embolijskih događaja, zatajenjem srca i hospitalizacijama, smanjenom kvalitetom

života, smanjenom tolerancijom fizičkog napora te disfunkcijom lijeve klijetke (3). Smrtnost je udvostručena u bolesnika s FA, neovisno o drugim prediktorima (4, 9). Samo je antitrombotska terapija pokazala učinak u samanjenu smrti povezanih s FA (10). Moždani udar u FA često je opsežan te rezultiran dugoročnim posljedicama ili smrću. Oko petine moždanih udara uzrokovano je FA. Nedijagnosticirana, supklinička FA je vjerojatni uzrok kriptogenih moždanih udara (9, 11). Rizik moždanog udara jednak je, neovisno je li FA paroksizmalna, premanentna ili perzistentna (12). Hospitalizacije zbog FA čine jednu trečinu hospitalizacija zbog aritmija, a najčešći su neposredni razlozi akutni koronarni sindrom, pogoršanje popuštanja srca, trombo-embolijski događaji i tahiaritmija (3). Kognitivna disfunkcija, uključujući vaskularnu demenciju, povezana je s FA. Manje opservacijske studije sugeriraju da supklinički trombo-embolijski događaji doprinose kognitivnoj disfunkciji u bolesnika s FA kod kojih nije izražena klinička slika moždanog udara (11). FA umanjuje kvalitetu života i toleranciju fizičkog napora. Bolesnici s FA imaju značajno reduciranu kvalitetu života u usporedbi sa zdravim ljudima, općom populacijom, ili s koronarnim bolesnicima u sinusnom ritmu (13). Funkcija lijeve klijetke također je oštećena nepravilnim, brzim ritmom te gubitkom atrijske kontrakcije i povećanim tlakom punjenja u zadnjem dijelu dijastole.

1.2. Mehanizmi nastanka

Patofiziološke promjene koje prethode FA

Bilo koja strukturna bolest srca može započeti spori ali prograsivan proces strukturalnog remodeliranja kod atrija i ventrikula. U atrijima dolazi do proliferacije i diferencijacije fibroblasta u miofibroblaste, a povećano stvaranje vezivnog tkiva i

fibroza glavne su posljedice tog procesa (3). Strukturalno remodeliranje rezultira električnom disocijacijom između mišičnih vlakana i uzrokuje heterogenizaciju lokalnog provođenja facilitirajući time inicijaciju i održavanje FA. Ovakav elektroanatomski supstrat omogućuje multiple male "re-entry" krugove koji održavaju aritmiju.

Patofiziološke promjene koje su posljedica FA

Nakon započinjanja FA, elektrofiziološke karakteristike atrija, mehanička funkcija, i atrijska ultrastruktura mijenjaju se različitom brzinom i s različitim patofiziološkim posljedicama (14). Tijekom prvih dana FA zabilježeno je skraćivanje efektivnog razdoblja refraktornosti atrija (15). Električno remodeliranje pridonosi sve većoj stabilnosti FA tijekom vremena. Glavni stanični mehanizmi skraćivanja refraktornosti atrija je smanjenje ulaznog toka klacija kroz kanale L tipa i povećanje ulaznog toka kalijevih iona. Do normalizacije refraktornosti atrija dolazi nekoliko dana nakon restitucije sinisnog ritma. Tijekom prvih dana FA također dolazi do perturbacija kontraktilne funkcije atrija. Glavni stanični mehanizmi kontraktilne disfunkcije su smanjeni utok kalcijskih iona, poremećeno otpuštanje kalcija iz unutarstaničnih depozita i promjene miofibrilarne energetike. Fibroza i upalne promjene zabilježene su i u bolesnika s izoliranom FA (16).

1.2.1. Elektrofiziološki mehanizmi

Za FA potreban je aktivator za njeno započinjanje te substrat za njeno održavanje. Ovi mehanizmi se međusobno ne isključuju te često koegzistiraju tijekom patogeneze FA.

Fokalni mehanizmi

Mnogo je istraživanja provedeno nebi li se razjasnili fokalni mehanizimi koji eventualno pridonose započinjanju i održavanju FA (17). U stanične fokalne mehanizme spadaju "okidačka" aktivnost i "re-entry" (3). Zbog kraćeg perioda refraktornosti kao i nagle promjene orijentacije miocitnih vlakana, plućne vene imaju velik potencijal u započinjanju i održavanju atrijskih tahiaritmija. Ablacija mjesta s visokom dominantnom frekvencijom smještenih oko ušća pulmonalnih vena u LA rezultira progresivnom prolongacijom duljine fibrilacijskog kruga i konverzijom u sinusni ritam kod bolesnika s paroksizmalnom FA, dok su kod bolesnika s perzistentnom FA, ta mjesta raštrkana po cijelom atriju te su posljedično uspješna ablacija i konverzija u sinusni ritam teže za postići.

Hipoteza multiplih valova

Prema hipotezi multiplih valova, FA se održava kontinuiranim kaotičnim provođenjem većeg broja međusobno neovisnih valova kroz muskulaturu atrija. Njihove valne fronte podliježu stalnim konstruktivnim i destruktivnim interferencijama, zbog čega dolazi do poništenja ili stvaranja novih valova. Sve dok je broj valnih fronti iznad kritične razine, valovi će održavati aritmiju. Kod većine bolesnika s paroksizmalnom FA moguće je odrediti mjesto izvora aritmije no to često nije moguće kod perzistentne ili permanentne FA.

1.2.2. Čimbenici povezani s FA

FA je povezana s mnogim kardiovaskularnim bolestima (18-19). Konkomitantne bolesti srca sudjeluju u održavanju FA stvarajući pogodan patoanatomski supstrat. Bolesti povezane s FA također su biljezi globalnog kardiovaskularnog rizika odnosno oštećenja srca, a ne samo uzročni čimbenici. Starenje povećava rizik nastanka FA.

Jedno od mogućih objašnjenja je gubitak i izolacija atrijskog miokarda i s njima povezane smetnje provođenja. Hipertenzija je čimbenik rizika kod novodijagnosticirane FA i komplikacije FA kao što su moždani udar i sistemski trombo-embolijski događaji. Simptomatsko zatajenje srca (New York Heart Association (NYHA) razredi II–IV) prisutno je kod 30% bolesnika s FA i FA je dijagnosticirana kod 30–40% bolesnika sa zatajenjem srca (18-19). Zatajenje srca može biti i uzrok (zbog povećanog atrijskog tlaka i volumnog preopterećenja, sekundarne disfunkcije zalistaka ili kronične neurohumoralne stimulacije) i posljedica FA (npr. tahikardiomiopatija ili dekompenzacija u akutnoj epizodi FA). Tahikardiomiopatija je pojava disfunkcije lijeve klijetke u bolesnika s brzim odgovorom ventrikula, a bez strukturne bolesti srca. Restitucijom sinusnog ritma dolazi do poboljšanja ili normalizacije funkcije lijeve klijetke. Bolesti srčanih zalistaka nađene su kod oko 30% bolesnika s FA (18-19). FA uzrokovana distenzijom lijevog atrija, rana je manifestacija mitralne stenoze i/ili regurgitacije. FA se također javlja u uznapredovalim fazama bolesti aortalnog zalistka. Iako je nekada bila česta, ‘reumatska FA’ danas je relativno rijetka u Europi. Kardiomiopatije, uključujući primarno "električne" bolesti srca, nose povećan rizik nastanka FA, pogotovo kod mladih bolesnika (20). Relativno rijetki oblici kardiomiopatija nađeni su kod 10% bolesnika s FA (18-19). Kod manjeg broja bolesnika s izoliranom FA nađene su mutacije karakteristične za "električne" kardiomiopatije. Atrijski septalni defekt povezan je s FA u 10–15% slučajeva. Ostale kongenitalne srčane greške povezane s FA su: "single ventricle", stanje nakon operacije po Mustard radi korekcije transpozicije velikih arterija i stanje nakon operacije po Fontanu. Koronarna je bolest prisutna u ≥20% bolesnika s FA (18-19). Nije jasno je li nekomplicirana koronarna bolest *per se* (ishemija atrija) predisponirajući čimbenik za nastanak FA te kakva je

interakcija FA i perfuzije koronarnih arterija (21). Manifestna disfunkcija štitnjače može biti jedini uzrok FA te može biti predisponirajući čimbenik komplkacija povezanih s FA. U recentnim je istraživanjima nađen manji broj hipertireoidizama ili hipotireoza u bolesnika s FA, međutim subklinička disfunkcija štitnjače može također pridonjeti nastanku FA. 25% bolesnika s FA je pretilo, a njihov je prosječni indeks tjelesne mase 27.5 kg/m^2 (18-19). 20% bolesnika s FA ima šećernu bolest koja zahtijeva medikamentozno liječenje te može pridonjeti oštečenju atrija. Kronična opstruktivna bolest pluća nađena je kod 10–15% bolesnika s FA te je vjerojatnije biljeg globalnog kardivaskularnog rizika nego predisponirajući čimbenik za FA. Apnea u snu, pogotovo povezana s hipertenzijom, šećernom bolesti i strukturnim bolestima srca, može biti patofiziološki čimbenik za FA jer apnea uzrokuje povećanje atrijskog tlaka i veličine te promjene autonomog živčanog sustava. Kronična bolest bubrega prisutna je kod 10–15% bolesnika s FA. Kronična renalna insuficijencija povećava rizik komplikacija povezanih s FA (3).

1.3. Izolirana fibrilacija atrija

Molekularne osnove FA nisu poznate. Kod starijih je bolesnika FA često povezana s ishodišnom bolesti srca kao što su ishemijska, hipertenzivna, valvularna bolest ili kardiomiopatija. Nasuprot tome, idiopatska odnosno “izolirana” FA tipično pogađa mlade i sredovječne odrasle (srednja dob prilikom dijagnosticiranja FA bila je 44 godine) bez poznate srčane bolesti (22). Prevalencija izolirane FA se kreće, ovisno o dobi promatrane populacije, od 3% do 11% (22-23). Nepoznati je udio bolesnika s nasljednom FA među bolesnicima s izoliranom FA.

1.4. Genetika fibrilacije atrija

1.4.1. Genske asocijacije

FA ima nasljednu kompenentu, osobito u onim slučajevima kada se klinička slika javlja u ranijoj životnoj dobi bolesnika (24). Proteklih su godina identificirani mnogi nasljedni ritmološki poremećaji srčane funkcije povezani s FA kao što su sindrom produženog QT intervala, sindrom skraćenog QT intervala te Brugada sindrom (25). FA se također učestalo pojavljuje s nasljednim bolestima srca kao što su hipertrofijska kardiomiopatija i nasljedna ventrikulska preekscitacija koje su povezane s mutacijama PRKAG gena. Ostali nasljedni oblici FA povezani su s mutacijama gena atrijskog natrijurijetskog peptida, mutacijama gena za funkcionalne i regulatorne podjedinice natrijskih i kalijskih kanala te mutacijama gena renin-angiotenzin-aldosteron sustava, upalnih citokina i koneksina (26-30). Patofiziološka uloga drugih genskih promjena u započinjanju i održavanju FA, gdje je identificiran samo lokus, a ne i gen (npr. 10q22, 6q14-16 i 5p15), trenutno je nepoznata. Do sada identificirani geni odnosno lokusi povezani s FA navedeni su u Tablici 1. U dosadašnjim istraživanjima, FA je promatrana i kao monogentska bolest, kao bolest povezana s drugim monogenskim bolestima te su analizirane razne genske varijante kao mogući predisponirajući čimbenici za razvoj FA.

Tablica 1 Genske asocijacije FA

Uloga proteina	Gen/lokus	Mehanizam djelovanja	Studija/način nasljeđivanja	Referenca
Natrijski kanal	SCNA5	Povećanje stanične podražljivosti, prolongacija akcijskog potencijala atrija	Gen kandidat/ sporadično	(25, 31-39)
	SCN1B/SCN2B	Smanjenje vršne amplitude protoka natrijskih iona	Gen kandidat/ sporadično	(40)
Kalijski kanal	KCNQ1	Pojačana repolarizacija atrija	Studija povezanosti/ autosomno dominantno	(41-44)
	KCNE2	Pojačana repolarizacija atrija	Gen kandidat/ autosomno dominantno	(45)
	KCNJ2	Pojačana repolarizacija atrija	Gen kandidat/ autosomno dominantno	(46)
	KCNE5	Pojačana repolarizacija atrija	Gen kandidat/ autosomno dominantno i sporadično	(47)
	KCNA5	Odgođena repolarizacija atrija	Gen kandidat/ autosomno dominantno i sporadično	(48-50)

Uloga proteina	Gen/lokus	Mehanizam djelovanja	Studija/način nasljeđivanja	Referenca
Prekursor ANP-a	NPPA	Skraćivanje akcijskog potencijala atrija	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(26)
Koneksin	GJA5	Disperzija brzine provođenja	Gen kandidat/sporadično	(30, 51-52)
Druga	10q22	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(53)
	6q14–16	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(54)
	5p15	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(55)
	4q25 (PITX2)	Nepoznat	Genome wide association/sporadično	(56-57)
	16q22 (ZFHX3)	Nepoznat	Genome wide association/sporadično	(58)
	1q21 (KCNN3)	Nepoznat	Genome wide association/sporadično	(59)
	10p11–q21	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(1)
	12p12	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno dominantno	(1)
Nukleoporin	5p13/NUP155	Nepoznat	Studija povezanosti/autosomno recesivno	(60)

1.4.2. FA kao monogenska bolest

Obiteljska FA

Opis nasljedne odnosno obiteljske FA prvi je puta objavljen 1943. (61), ali njezina prevalencija među bolesnicima s FA još uvijek nije određena te se procjenjuje na oko 15% (1). Prvi lokus za obiteljsku FA identificiran je 1997. pomoću genetskog mapiranja triju španjolskih obitelji koje su bile u međusobnom srodstvu (53). Međutim sam gen odgovoran za FA kod tih obitelji još uvijek nije identificiran. Istraživanja su pokazala da je obiteljska FA genetski heterogena bolesti (62). Identifikacija gena odgovornih za nastanak FA pridonjela bi razjašnjenju etiologije obiteljske FA.

Mutacije gena za natrijski kanal

Ljudski natrijski kanal miokarda ovisan o naponu odgovoran je za brzu depolarizaciju kardiomiocita te je također ciljna molekula brojnih antiaritmijskih lijekova. Inicijalno su mutacije gena za njegovu alfa podjedinicu (SCN5A) nađene kod članova obitelji sa sindromom produženi QT intervala (31). Tijekom vremena identificirano je više od 200 mutacija gena SCN5A koje su povezane s raznim bolestima srca kao što su Brugada sindrom, progresivni poremećaj kondukcije, sindrom bolesnog sinusnog čvora, dilatativna kardiomiopatija i FA (32). Analize korelacije između genotipa i fenotipa pokazale su da je većina mutacija povezana sa specifičnim kliničkim manifestacijama, mada postoje preklapanja kod istog genskog defekta (33). Brugada sindrom i sindrom produženog QT intervala često se javljaju zajedno s supraventrikulskim aritmijama uključujući FA (25). Daljnji dokaz uloge mutacije gena SCN5A u patofiziologiji FA je njezino postojanje u obitelji s nasljednom dilatativnom kardiomiopatijom i FA (34). Također su opisane i mutacije istog gena u nasljednoj FA sa i bez strukturne bolesti srca (35-37). Rijetke varijante gena SCN5A javljaju se kod

otprilike 6% bolesnika s FA (36). Funkcijskom analizom dokazane su dvije grupe mutacija: mutacije s povećanjem funkcije koje dovode do depolarizacijskog pomaka u fazi inaktivacije kanala što rezultira povećanjem stanične podražljivosti (37-38) i mutacije s gubitkom funkcije kod kojih dolazi do hiperpolarizacije u fazi inaktivacije kanala što rezultira produljenjem atrijskog akcijskog potencijala (35). Produljenje repolarizacije atrija moglo bi inducirati atrijske torsade i rezultirati FA (63). Drugi mehanizmi koji uključuju povećanje i gubitak funkcije, predloženi su kod drugih sindroma. Također postoji širok spektar mutacija koje su povezane s preklapajućim sindromima što ukazuje na okolišne te druge genske čimbenike koji određuju fenotip. Mutacije gena koji kodiraju za druge podjedinice natrijskog kanala (SCN1B i SCN2B), nađene su kod bolesnika s FA, a nisu bile prisutne kod kontrola (40).

Mutacije gena za kalijski kanal

Struja kalijskih iona koja prolazi kroz kanale regulirane naponom igra važnu ulogu u repolarizaciji atrija. Ostali kalijski kanali su važni su za uspostavljanje "ispravljačkih" struja kalija u stanicu i za kontrolu staničnog potencijala u mirovanju. Poznate su brojne mutacije s povećanjem i gubitkom funkcije gena za kalijske kanale. Mutacija gena KCNQ1, koji kodira alfa podjedinicu naponom reguliranog kalijskog kanala zaduženu za stvaranje samog otvora za prolazak iona, inicijalno je shvaćena kao uzrok sindroma produženog QT intevala (41). Mutacija istog gena je prva koja je bila povezana s izoliranom FA (42). Hipotetski patogeni mehanizam sastoji se od povećanja funkcije kanala povećavanjem struje repolarizacije i time povezanim skraćivanjem atrijskog akcijskog potencijala. Razne su druge mutacije KCNQ1 opisane kod obitelji s FA kao i mutacije gena za druge podjedinice kalijskog kanala, uključujući KCNE2, KCNJ2 i KCNE5 (47). Nadalje, kod gena KCNA5, nađena je mutacija s gubitkom funkcije kod nekoliko obitelji s FA (48). Funkcijskom analizom

mutacije otkrivena je odgoda repolarizacije akcijskog potencijala i njegova prolongacija (sličan mehanizam kao i kod mutacije SCN5A) (35).

Mutacije gena prekursora atrijskog natrijurijetskog peptida (NPPA)

U istraživanju povezanosti u obitelji s autosomno dominantnom FA, nađena je mutacija gena prekursora atrijskog natrijurijetskog peptida (NPPA) (26). Mutacija uzrokuje gubitak stop kodona što rezultira ekspresijom produljenog peptida. Koncentracija produljenog peptida u plazmi bila je 5 do 10 puta veća nego koncetracija "divljeg tipa" NPPA što ukazuje na dulji poluživot molekule, vjerojatno zbog otpornosti na degradaciju. Također je zamjećeno da produljeni peptid uzrokuje skraćivanje atrijskog akcijskog potencijala (kao i kod većine mutacija gena za kalijski kanal). Još jedan mogući patofiziološki mehanizam djelovanja mutacije uključuje strukturne promjene koje rezultiraju fibrozom atrija, a uzrokovane su izlaganjem visokim koncentracijama produljenog NPPA (26).

Koneksin 40

Inicijalno otkrivene mutacije gena u obiteljima s nasljednom FA rijedak su uzrok izolirane FA (64-65). Zbog toga su se istraživanja usmjerila prema drugim patofiziološkim putevima. Među gene kandidate spadaju i geni za koneksine, proteine koji formiraju propusne veze (eng. gap junctions) i omogućuju električno povezivanje stanica uz minimalan otpor. Budući da je koneksin 40 obilno prisutan u atrijima, istraživanja su se koncentrirala na njegov gen, GJA5. Poremećaju provođenja kod miševa kojima je inaktiviran GJA5 rezultiraju u ritmološkoj vulnerabilnosti atrija (66). Sekvencioniranje genomske DNA ekstrahirane iz tkiva srca 15 bolesnika s izoliranom FA identificiralo je 4 "missense" mutacije od kojih su 3 bile stečene. Protein koji je bio produkt mutiranog gena bio je heterogeno raspoređen po

tkivu atrija. Smatra se da je mutacija sa gubitkom funkcije rezultirala u povećanoj disperziji brzine provođenja signala te tako dovela do nastajanja i održavanja FA (51). Sličan genski mozaicizam GJA1 gena, koji kodira protein koneksin 43, nađen je u tkivu atrija bolesnika s izoliranom FA (67).

Nukeloporin

Zadnji u nizu gena povezanih s FA je NUP155, mutacija kojeg izaziva kliničku sliku neonatalne FA, a nasljeđuje se autosomno recesivno (60). Gen kodira protein iz obitelji nukleoporina te se pretpostavlja da bi se patofiziološki mehanizam nastanka FA mogao odvija putem modulacije proteina koji sudjeluju u unutarstaničnom transportu kalcija. Gen se nalazi na 5p13 i povezan je i s naglom srčanom smrti.

1.4.3. FA povezana s drugim monogenskim bolestima

Kod nekoliko je kardioloških genetskih sindroma (sa i bez strukturnih anomalija), FA opisana kao dio kliničkog spektra. Sindrom dugog i kratkog QT intervala, kao i Brugada sindrom su povezani sa supraventrikulskim aritmijama, pa tako i s FA. FA se također učestalo pojavljuje s nasljednim bolestima srca kao što su hipertrofijska kardiomiopatija, nasljedna ventrikulska preekscitacija te atrio-ventrikulski poremećaji provođenja koji su povezani s mutacijama PRKAG, gena za γ2 regulatronu podjedinicu AMP-om aktivirane protein-kinaze (25, 68).

Složenost genetike FA

Genetska istraživanja obiteljske FA zahvatila su mnoge gene, ali u malom broju slučajeva, dok su epidemiološka istraživanja opće populacije zabilježila genetsku komponentu sporadične FA (63). Također je dokazano da prisutnost FA kod roditelja povećava rizik nastanka FA kod djece, a ta je povezanost značajnija i jača kod mladih ljudi i izolirane FA (24, 69-70). Istraživanja gena kandidata u sporadičnoj FA

ukazala su na ulogu genskih polimorfizama u regijama koje su se pokazale značajnima kod bolesnika s obiteljskom FA (30, 39, 52, 71-75). Također su istraženi i polimorfizmi bez do tada poznate povezanosti s FA koji uključuju gene za sustav renin-angiotenzin-aldosteron, interleukin 6, protrombin, sarkolipin te stanične proteine (76-84). Opisana je i povezanost polimorfizma gena SCN5A te GJA5 s paroksizmalnom FA (30, 39, 52). Nažalost, broj ispitanika u navedenim istraživanjima je relativno mali te se još iščekuju veće studije koje bi potvrdile dobivene rezultate. Meta-analize koje su do sada istraživale ulogu polimorfizama gena sustava renin-angiotenzin-aldosteron s FA, pokazale su moguću povezanost između insercijske/delecijske mutacije gena angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE) i rizika nastanka FA (85-86). U većim se studijama, međutim, navedena veza nije potvrdila, kao niti veza bilo kojeg drugog polimorfizma sa FA (87). Kao i kod drugih kompleksnih bolesti, položeno je mnogo nade u rezultate genomskih istraživanja povezanosti (eng. genome-wide association study, GWAS). U prvoj, nađena je povezanost FA s mutacijama na lokusu 4q25 (56). Kasnije ih je u istoj regiji nađeno još nekoliko (57). Opisane mutacije nalaze se u neposrednoj blizini PITX2, gena za čimbenik transkripcije koji je krucijalan za određivanje lijevo-desne simetrije atrija te neophodan za diferencijaciju lijevog atrija (88). Kao sljedeća genska varijanta povezana s FA identificiran je gen ZFHX3 na lokusu 16q22 (58). Treći je lokus 1q21 na kojem je KCNN3, gen koji kodira kalijski kanal bitan za repolarizaciju atrija (59). Mutacija rs2200733 na lokusu 4q25 pokazala se kao najbolji prediktor FA za koju, kao neovisni čimbenik, udvostručuje rizik (57, 89). S povećanjem broja ispitanika u genomskim istraživanjima povezanosti, vjerojatno će doći do otkića novih lokusa povezanih s FA.

1.5. Spolni hormoni i aritmije

Jedno od mogućih, a ipak vrlo očito objašnjenje različite prevalencije FA kod muškaraca i žena su razlike u djelovanju spolnih hormona. Učinci spolnih hormona na akcijski potencijal kardiomiocita manifestiraju se u opservacijama poput kraćeg ciklusa sinusnog čvora uz subsekventno bržu frekvenciju u mirovanju kod žena ili kraćeg QT intervala kod post-pubertetskih muškaraca u odnosu na žene iste dobi. Međutim, specifični mehanizam, kojim spolni hormoni moduliraju elektrofiziološke parametre srca i podložnost aritmijama, još uvijek je nepoznat (90). Dosadašnja istraživanja potvrdila su ženski spol kao neovisni čimbenik rizika za nastajanje aritmija povezanih s produljenjem QT intervala (91-93). Budući da razlike u duljini QT intervala kod muškaraca i žena ne postoje kod djece već one nastupaju u pubertetu i traju do 50 godine života, pretpostavlja se da se radi o učinku spolnih hormona na repolarizaciju miokarda (94-95). Rizik malignih aritmija povezanih s produženim QT intervalom kod žena najveći je između 15 i 40 godina (96).

Jedan od načina na koji spolni hormoni utječu na fiziološke funkcije je regulacija transkripcije. Spolni se hormoni vežu na svoje receptore koji se zatim translociraju u jezgru. U jezgri stanice, komples spolnog hormona i njegovog receptora služi kao transkripcijski čimbenik koji se veže na promotorsku regiju gena koji sadrže element koji odgovara na hormon (eng. hormone responsive element (HRE)), što dovodi do regulacije ekspresije gena. Na primjer, kompleks estradiola i estrogenskog receptora u srcu povećava transkripciju gena za lipokalin-tip prostaglandin D sintetazu (L-PDGS) (97). To je tako zvani genomski učinak spolnih hormona te je potrebno i do nekoliko sati prije nego što postane vidljiv. Uz navedeni genomski učinak, spolni hormoni djeluju i preko aktivacije mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) što

dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora, kao i aktivacije endotelne NO sintetaze (eNOS) koja je vezana za staničnu membranu (98-101).

Još jedan negenomski učinak spolnih hormona je brzo moduliranje aktivnosti ionskih kanala u srcu preko PI3K/Akt/eNOS sustava (102-104). No još uvijek preostaje izazov rasvjetljavanja točne uloge spolnih hormona kod aritmija. Za sada su se istraživanja ritmološkog učinka spolnih hormona pretežito koncentrirala na maligne aritmija, osobito *torsades de pointes* (90, 105). Supraventrikulska tahikardija kod žena varira tijekom menstrualnog ciklusa, a češća je tijekom luteinske faze te je obrnuto proporcionalno povezana sa serumskom koncentracijom estrogena (106). Što se same FA tiče, za sad je proučavan učinak hormonske nadomjesne terapije kod postmenopauzalnih žena te je pokazana ovisnost javljanja FA kod muškaraca kada bi serumske koncetracije testosterona bile niže ili više od fizioloških, najčešće zbog starenja ili zloupotrebe anabolika (107-112).

1.5.1. Androgeni

Prema definiciji, androgen je bilo koji kemijski spoj (najčešće steroidni hormon) koji služi kao ligand i stimulira androgeni receptor (AR). Steroidni androgeni (androstenediol, androstenedion, androsteron, dihidrotestosteron (DHT), prasteron (dehidroepiandrosteron, DHEA) i testosteron) su ujedno i prekursori svih estrogena (113). Svoj učinak kod ljudi i ostalih kralježnjaka ostvaruju putem dva glavna mehanizma: aktivacijom AR (direktno ili preko DHT) i konverzijom u estradiol i aktivacijom estrogenskih recptora (114-115). Slobodni testosteron se transportira u citoplazmu stanice, gdje se može vezati za AR ili biti reduciran do DHT pomoću enzima 5-alfa reduktaze. DHT se veže na isti AR, ali jače nego sam testosteron pa je

zato od njega 5 puta potentniji (116). Nakon određenih strukturalnih promjena, kompleks andreogen-AR ulazi u jezgru stanice te se veže na specifične nukleotidne sekvence kromosomske DNA. Te regije, zvane HRE, utječu na transkripciju određenih gena te tako očituju genomski utjecaj androgena.

Negenomski učinak testosterona i drugih androgena odvija se putem induciranja fosforilacije Ser/Thr kinaze Akt te induciranja eNOS i produkcije NO (102). NO dovodi do s-nitrozilacije cisteinskih ostataka na ionskim kanalima pojačavajući tako sporu odgođenu ispravljačku K+ struju (IKs) (104). Ca2+ struja L-tipa (ICa,L) je suprimirana od strane NO putem cGMP ovisnog sustava. Regulacija IKs i ICa,L testosteronom je ovisna o koncentraciji te dovodi do skraćivanja akcijskog potencijala i QT intervala (104, 117-119).

Serumske koncentracije testosterona kod odraslih muškaraca kreću se između 10 i 35 nM, međutim počinju padati već nakon 40 godina života (120-121).

Ukupni negenomski elektrofiziološki učinak testosterona dovodi do skraćivanja repolarizacije ventrikula te smanjenja incidencije ventrikulskih aritmija (102-103, 119, 122).

Androgeni receptor

Androgeni receptor (AR), također poznat kao NR3C4 (eng. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4), je vrsta nuklearnog receptora kojeg aktiviraju androgeni (123-124). AR spada u skupinu steroidnih nukleranih receptora zajedno s mineralokortikoidnim, glukokorticoidnim, estrogenskim i progesteronskim receptorima (125-126). AR, kao i ostali nuklearni receptori, je modularni protein koji se sastoji od 4 strukturalno i funkcionalno različite domene: varijabilne aktivacijske domene NTD (eng. N-terminal transactivation domain), visoko očuvane domene za vezanje DNA

DBD (eng. DNA binding domain), male zglobne regije i umjereno očuvane C-terminalne domene za vezanje s ligandom LBD (ligand-binding domain) (127). Njegova je glavna funckija regulacija ekspresije gena, međutim ima i druge funkcije (128-129). Kao i estrogenski receptor, AR djeluje i neovisno o vezanju za HRE, putem drugih proteina koji se vežu na DNA kao što je čimbenik serumskog odgovora (eng. serum response factor), protein koji aktivira nekoliko gena odgovornih za rast mišića (130). Bez liganda, AR se nalazi u citoplazmi povezan za razne proteine pratitelje (eng. chaperones) kao što su HSP (eng. heat shock proteins) te proteine citoskeleta (131-135). Nakon vezanja liganda on se dimerizira te premješta u staničnu jezgru gdje ostvaruje svoje genomske učinke (136). Osim dobro proučenih genomskih učinaka AR posjeduje i negenomske učinke. Negenomski učinci AR ostvaruju se unutar nekoliko minuta ili čak sekundi i time ukazuju na nedostatak transkripcije i translacije gena. AR svoje negenomske učinke ostvaruje putem proteina u membrani ili citoplazmi, pokrećući otpuštanje unutarstaničnog kalcija i aktivaciju protein kinaza kao što su MAPK (ERK), protein kinaza A (PKA), Akt i protein kinaza C (PKC) (137-139). Moguće je da negenomska aktivnost AR djeluje na njegovu genomsku aktivnost i genomsku aktivnost ostalih nuklearnih receptora. Kinaze aktivirane AR-om mogu fosforilirati AR, neovisno o tome je li AR povezan s ligandom, i tako stvoriti autokrinu pozitivnu povratnu spregu. Kinaze kao ERK1/2, PI3K i Akt mogu fosforilirati i aktivirati AR sa i bez androgena, ilustrirajući na taj način prilagodljivost genomske aktivnosti AR na okolinu s različitim koncentracijama androgena (136). AR je neophodan za ekspresiju normalnog muškog fenotipa, a neđen je i u gotovo svim hormonski neovismin tkivima kralježnjaka, uključujući srce i krvne žile (136).

Polimorfizmi gena AR

Zajedno s ostalim steroidnim nuklearnm receptorima i receptorima za hormon štitnjače, vitamin A, vitamin D te receptorima za proliferaciju preoksisoma (eng. peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) spadaju u istu nadobitelj receptora (140). Cijela se ta nadobitelj nukearnih receptora vjerojatno razvila od istog pretka kroz duplikaciju gena i mješanjem egzona te je postojala još prije 500–830 milijuna godina, u doba pojavljivanja prvih kralježnjaka (141-142).

Kod ljudi, AR je kodiran AR genom koji se nalazi na X kromosomu, na lokusu Xq11-12, i sadrži 8 egzona (143-144). Svi do sada istraživani polimorfizmi AR nalaze se na egzonu 1 (145). Počevši od amino-terminalnog kraja AR, prvo se nalazi aktivacijska domena NTD, koja je zadužena za aktivaciju transkripcije (146-147). NTD (αα 1–558) sadrži nekoliko regija važnih za konformacijske promjene i aktivnost AR. U njoj se nalaze 3 mikrosatelita s regijama trinukleotidnih ponvaljanja, od kojih su dva polimorfni segmenti trinukleotidnih ponavljanja koji kodiraju poli-glutaminski (poly-Q) i poli-glicinski (poly-G) trakt (148). Varijacije duljine tih dijelova mogu utjecati na stabilnost veze između NTD i LBD domena i njihovih liganada. Utvrđena je obrnuto proporcionalna veza duljine regija trinukleotidnih ponavljanja i ekspresije i aktivnosti AR (149-150). Tako je i utvrđena veza između duljine CAG trinukleotidnih ponavljanja (poly-Q) i nekoliko degenerativnih neuromuskularnih bolesti, uključujući Kennedy sindrom, poznat kao spinalna i bulbarna muscularna atrofija (SBMA), koji se manifestira progresivnom neuromuskulanom atrofijom i ataksijom (151). Duljina segmenata CAG trinukleotidnih ponavljanja je između 11 i 31 trinukleotida, a povezana je i sa povećanim rizikom hiperplazije prostate (≤19 trinukleotida), poremećenom spermiogenezom (≥28 trinukleotida) i karcinomom prostate (≤18 trinukleotida) (126, 152). Neki od do sada nađenih 375 polimorfizama AR (prema:

GeneCards (http://nciarray.nci.nih.gov/cards/)) navedeni su u tablici 2 i pretežito su pručavani u kontekstu karcinoma prostate i muške ćelavosti.

Tablica 2 Genski polimorfizmi AR

Polimorfizam	Fenotip/poremećaj	Referenca
(CAG)n	Povišena koncentracija slobodnog testosterona	(153)
	Rizik oboljevanja od karcinoma prostate	(154)
	Poremećaj koncentracije lipoproteina u plazmi i rizik oboljevanja od koronarne bolesti	(155)
	Poremećaj spermiogeneze	(156)
	Smanjena gustoća kosti	(157)
	Očuvanje kognitivnih sposobnosti	(158)
	Depresivni poremećaj	(159)
(GGC)n	Rizik oboljevanja od karcinoma prostate	(160)
StuI S1	Rizik oboljevanja od karcinoma prostate	(161)

1.5.2. Estrogeni

Estrogeni su skupina hormona nazvani po svojoj ulozi u reproduktivnom ciklusu. Oni su primarni ženski spolni hormoni. Svi prirodi estrogeni kod ljudi su steroidni hormoni. Nađeni su kod svih kralježnjaka i čak kod nekih insekata, što upućuje na njihovu ontogenetsku starost i važnost (162-163). Glavni prirodni estrogeni kod ljudi su estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3), a tijekom trudnoće i estetrol (E4). Svi estrogeni nastaju od androgena (testosterona i androstenediona) pomoću enzima aromataze (164). Učinak estrogen odvija se putem estrogenskog receptora (ER), dimernog nuklearnog receptora koji se veže na DNA i kontrolira ekspresiju gena. Uz genomski učinak, estrogeni imaju i negenomski učinak kojim modificiraju ponašanje ionskih kanala (165). Učinci estrogena na srce do sada su proučavani kod hipertrofije, srčanog zatajenja, ishemijske bolesti i nekih aritmija (166).

Genomski učinci estrogena

Dugoročni, genomski učinci estrogena odvijaju se putem nukleranih receptora ERα i ERβ te dovode do modifikacije ekspresije gena. Nakon što uđu u stanicu estrogeni se vežu za ER u citoplazmi, koji se nakon konformacijskih promjena translocira u jezgru te veže na DNA (167). Intracelularna kolokalizacija oba ESR podtipa (α i β) potvrđena je imunoflorescentnim bojenjem (168). Genomski učinci estrogena manifestriraju se u roku od nekoliko desetaka minuta do nekoliko sati, kao na primjer kod enzima NO sintetaze (NOS), gdje estrogeni moduliraju ekspresiju gena koja rezultira povećanom ekspresijom inducibilne (i)NOS i endotelne (e)NOS u kardiomiocitima (168). Estrogeni kao i progesteron, reguliraju transkripciju gena za koneksin 43 koji je predominantni protein u propusnim vezama (eng. gap junctions) kardiomiocita (166).

Estrogeni moduliraju ekspresiju gena kalcijskog kanala L-tipa. Nedostatak učinka estrogena povećava struju iona kroz kalcijski kanal L-tipa i time duljinu akcijskog u kardiomiocitima miševa (169). Kod ljudi koji boluju od sindroma produženog QT intervala nije međutim nađeno mutacija kalcijskog kanala L-tipa niti mutacija ER.

Estrogeni povećavaju ekspresiju atrijskog natrijurijetskog peptida (ANP), koji ima antihipertrofijski učinak i time potencijalnu ulogu u modulaciji hipertrofijskog odgovora kod postmenopauzalne hipertenzije (170). Estrogeni utječu i na renin-angiotenzin-aldosteron sustav, povećavajući aktivnost ACE (171-172). Mehanizam djelovanja kojim to postižu je brza produkcija mRNA za angiotenzinogen, vjerojatno kroz prisutnost elemenata za vezanje ER (ERE) u promotorskoj regiji gena za angiotenzinogen (173-174). Proksimalni promotor gena za renin također sadrži ERE (175).

Negenomski učinci estrogena

Opisano je mnogo staničnih učinaka estrogena koji se razvijaju toliko brzo da nije vjerojatno da su posljedica modulacije ekspresije gena. Za razliku od genomskih učinaka estrogena, putevi provođenja signala negenomskih učinaka estrogena na miokard su bitno slabije opisani. Neki od njih ovise o prisutnosti ER α i β dok su drugi o njioj neovisni (166). Na primjer, ako se estrogene spoji s goveđim albuminom i na taj način im se onemogući prolaz kroz staničnu membranu, oni su i dalje sposobni modulirati kalcijski kanal L-tipa preko cGMP puta (176). Pritom se estrogeni vežu na vanjsku na membranski receptor i time povećaju oslobađanje kalcija (177-178). Taj membranski receptor, poznat kao estrogenski receptor spojen s G-proteinom (eng. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) ili GPR30) kodiran je GPER genom

(179). GPR30 je integralni membranski protein s visokim afinitetom za estrogene (180-183). Ovaj je protein član obitelji s G-proteinom spojenih receptora sličnim rodopsinu, ima nekoliko transmembranskih domena te se nalazi u endoplazmatskom retikulumu. Nakon što se veže za estrogen, dolazi do oslobađanja intracelularnog kalcija i sinteze fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat (IP3) u staničnoj jezgri. GPR30 je glavni medijator brzih negenomskih učinaka estrogena. Na mišjem eksperimentalnom modelu dokazano je da ženke koje nemaju GPR30 boluju od intolerancije glukoze, smanjenog tjelesnog rasta, te povećanog krvnog tlaka, dok mužjaci imaju ubrzan rast, povećan udio masnog tkiva te povećanu mineralizaciju kostiju (184-185).

U negenomske učinke estrogena na kardiovaskularni sustav spada i relaksacija vaskularnih glatkih mišića, koja je neovisna o prisutnosti nuklearnog ER (186-188). Estrogeni uzrokuju i smanjenu kontraktilnost miokarda u trabekulama ljudskog atrija i papilarnim mišičima, kao i skraćivanje ventrikulskih miocita (189-190). Istraživanja na srcima štakora i kunića pokazala su da mikromolarne koncentracije estrogena imaju akutni učinak na frekvenciju sinusnog čvora koji je ovisan o koncentraciji estrogena (191). Estrogeni negenomskim putem povećavaju i stopu deaktivacije kalijskog kanala (IKr) i time smanjuju struju repolarizacije (192).

Estrogeni utječu i na unutarstaničnu signalizaciju, a osjetljivi su na djelovanje protein kinaze ERK1/2 (193). Inače je selektivna aktivacija ERK1/2 povezana s hipertrofijom miokarda kod transgenskih miševa (194). ER mogu biti aktivirani i pomoću faktora rasta, bez prisustva estrogena (195). Takav je slučaj kod inzulinu sličnom čimbeniku rasta (eng. insulin-like growth factor, IGF-1). IGF-1 ima slična svojstva estrogenima u kontroli stanične proliferacije. Aktivacija receptora za IGF-1 stimulira MAPKK kinazu što rezultira fosforilacijom ERK1/2. Aktivacija ERK1/2 dovodi do fosforilacije ERα i do

njegove, o ligandu neovisne, aktivacije (196). Drugi su faktori rasta također sposobni oponašati funkciju estrogena na sličan način, poput epidermalnog faktora rasta (eng. epidermal growth factor, EGF) (197). Načelno gledajući, negenomski učinci estrogena u srcu dokazani su u metabolizmu NO, protoku iona te unutarstaničnim putevima drugih glasnika.

ESR1

Glavni genomski put djelovanja estrogena je preko estrogenskog receptora (198-200). Postoje dvije izoforme ER: ERα i ERβ (201-202). ERα sadrži 595 aminokiseline, dok ih ERβ sadrži 530 (203). Obje izoforme spadaju u gensku obitelj nuklearnih receptora (NR) transkripcijskih čimbenika. Na molekularnoj razini, svi NR mogu se podjeliti u 6 funkcijskih regija odnosno domena, obilježenih A-F (204). Počevši od N-terminalnog kraja, prva se nalazi A/B domena varijabilne duljine koja je najvarijabilnija u obitelji NR-a. A/B domena sadrži o ligandu neovisnu transaktivacijsku regiju (AF-1), dok se o hormonu ovisna aktivacijska regija (AF-2) nalazi unutar regije za vezanje hormona (eng. hormone binding domain, HBD) domene E (205). Uz A/B domenu nalazi se regija za vezanje DNA (eng. DNA binding domain, DBD) ili C domena, najočuvanija u obitelji NR-a, koja služi za vezanje receptora na ciljne gene. C domena je spojena sa zglobnim dijelom nazvanim domena D. E domena pokazuje 53% homologije između članova obitelji NR-a. Konačno slijedi E/F domena preko koje se odvija interacija s HSP (eng. heat shock protein), vezivanje s (ant)agonistima, dimerizacija, vezivanje kofaktora, lokalizacija unutar jezgre te transaktivacija (206). U ERβ nedostaju veliki dijelovi domene F, koji se odnose na (ant)agonističko djelovanje anti-estrogena (207-208).

ESR1 Polimorfizmi

Razlike u fenotipu, ovisne o estrogenima, mogu biti povezane s koncetracijom djelujućeg estrogena ili s čimbenicima zaduženih za odgovor na hormone ("estrogenska osjetljivost") (165). S druge pak strane, varijabilnost odgovora na estrogene može ovisiti o promjeni funkcije receptora, razini njegove ekspresije ili o varijacijama u izvršnom kraku odgovora. Iz tog je razloga identifikacija genskih varijanti u signalnom putu estrogena važna i mogla bi utjecati na pozitivne i negativne učinke estrogena na dojke, kosti i kardiovaskularni sustav.

Prisutnost funkcionalnih ER dokazana je kod atrijskih i ventrikulskih miocita te u fibroblastima srca muškaraca i žena. Obje izoforme (α i β) prisutne su u ljudskom srcu (202). ESR1 i ESR2 (geni za ERα i ERβ) su značajni geni kandidati za određivanje varijabilnosti estrogenske osjetljivosti. Genski modificirani miševi, bez funkcionalnog ERα, imali su teške poremećaje reproduktivnog i koštanog sustava (209-212). Nasuprot tome, uloga ERβ je slabije istražena te obilježena suptilnijim promjenama reproduktivnog i koštanog sustava te ponašanja u slučaju njegove afunkcije (210, 212-213). Do sada je opisan samo jedan ljudski slučaj mutacije koja rezultira afunkcijom ERα, zbog preuranjenog pojavljivanja stop kodona (214). Taj nam slučaj ilustrira važnost estrogena kod muškaraca, kako je estrogenska rezistencija u bolesnika rezultirala intolerancijom glukoze, osteoporozom i teškom koronarnom bolesti (214-215).

Estrogenski receptor alfa (ER-α), poznat i kao NR3A1 (eng. nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1), je NR koji je aktiviran estrogenima. Kod ljudi, ER-α je kodiran genom ESR1 (eng. EStrogen Receptor 1). Taj se gen nalazi na kromosomu 6 (6q25–27) i sadrži 8 egzona. Osim jedinog ljudskog slučaja

preuranjenog stop kodona u ESR1, nema drugih primjera patogenih mutacija u užem smislu kod ER. Nasuprot tome, registriran je velik broj polimorfizama koji su ili "tihe" varijante u kodirajućim regijama ili su smješteni na intronima ili se nalaze uzlazno od mjesta početka translacije. Iako su neki povezani sa osjetljivošću na estrogene, još uvijek nema čvrstih dokaza o njihovoj direktnoj modifikaciji funkcije ili ekspresije ER.

DNA varijante su česte, a nalaze se u više od 1% populacije (216). Najčešći tip polimorfizama je promjena pojedinačnog nukleotida (para baza) te se naziva SNP (eng. single nucleotide polymorphisms). SNP mogu biti odgovorni za razne fenotipove, uključujući podložnost i otpornost na bolesti (217). Povezanost SNP-a i bolesti može biti izravna i neizravna, ovisno da li učinak nastaje na genu na kojem se polimorfizam nalazi, putem modifikacije ekspresije dotičnog gena ili modifikacije njegovog proteinskog produkta (216). SNP svoj utjecaj može ostavariti i kroz povezanost s drugim SNP koji posjeduje neki funkcijski učinak (217).

Do sada je nađeno 2057 ESR1 polimorfizama (prema: GeneCards, http://nciarray.nci.nih.gov/cards/). Među njima, tri su ekstenzivno proučavana: PvuII, XbaI, te polimorfna timin–adenine (TA) dinukleotidna regija koja se nalazi 1,174 parova baza uzlazno od egzona 1, u promotorskoj regiji gena (218-219). Fenotipovi koji su povezani s ovim polimorfizmima uključuju karcinom dojke (220-221), karcinom endometrija (222), migrenu (223), gustoću kosti (224) i druge. Što se kardiovaskularnih bolesti tiče, navedeni polimorfizmi povezani su s hiperlipoproteinemijom (225) i koronarnom bolesti (219, 226-227). Do sada provedenim istraživanjima međutim nedostaje međusobne konzistenije, a otežano je i biološko objašnjenje promatranih povezanosti.

Tablica 3 Neki klinički istraženi ESR1 polimorfizmi

Lokacija	Polimorfizam	Fenotip/poremećaj	Referenca
Intron 1	PvuII (rs2234693)	Smanjena gustoća kostiju kod mladih muškaraca	(224)
		Koronarna bolest	(228)
	XbaI (rs9340799)	Niži rast mladih muškaraca	(224)
		Smanjen rizik karcinoma prostate	(229)
	$(GGGA)_n$	Povećan rizik karcinoma prostate	(230)
Promotorska regija	$(TA)_n$	Rizik fraktura u osteoporotički promjenjenoj kosti	(231)
		Koronarna bolest	(226)
	G>A (-721E) (rs6915267)	Hiperltrofija lijeve klijetke	(232)
	ERNE (T>C) (rs9478245)	Bolja endotelna funkcija	(233)
	ERNE-145 C>T; rs488133	Razina lipoproteina u serumu	(234)
	A>C rs651971	Karcinom dojke	(165)

Lokacija	Polimorfizam	Fenotip/poremećaj	Referenca
Egzon 1	BstUI	Karcinom dojke	(220)
	kodon 10 (T392C)	Karcinom dojke	(235)
Egzon 4	ER325	Karcinom prostate	(161)
Egzon 8	G594A	Migrena	(223)
	G2014A	Postmenopauzalna osteoporoza	(236)

1.5.3. Aromataza

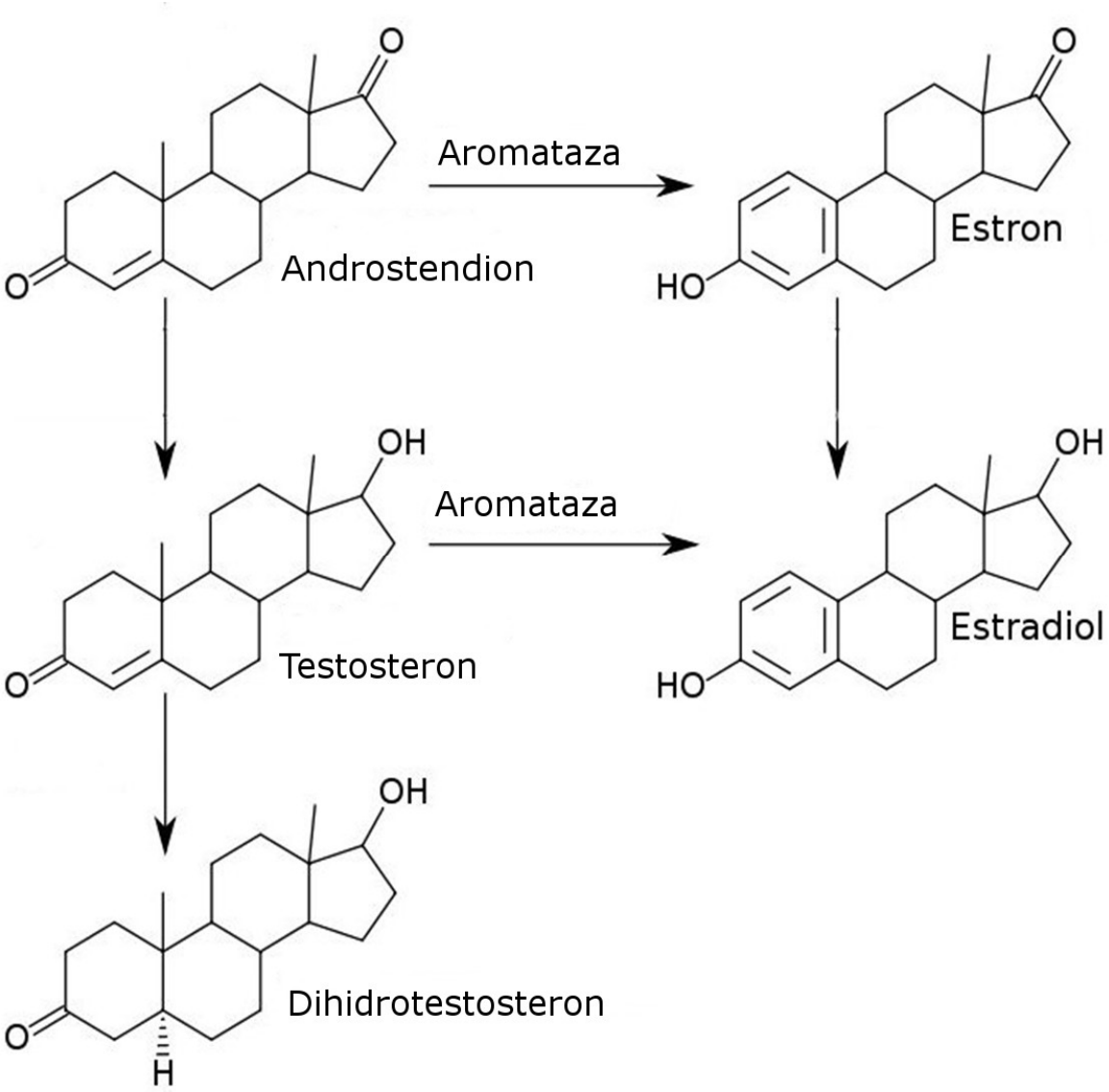
Aromataza, poznata i kao estrogen sintetaza ili estrogen sintaza, je enzim odgovoran za ključni korak u biosintezi estrogena iz androgena (237). Ona pripada nadobitelji citokrom P450, velikoj obitelji enzima, nazvani hidroksilaze, koji kataliziraju uvođenje atoma kisika u organske molekule (238). To su široko rasprostranjeni membranski proteini koji su prisutni u većini životinjskih, biljnih i ljudskih tkiva (npr. jetra). Neophodni su za sintezu kolesterola i steroidnih hormona te metabolizaciju ksenobiotika i masnih kiselina. Zajedničko svojstvo obitelji je prisutnost hema u aktivnom dijelu enzima. Hem sadrži željezo koje se može oksidirati i reducirati. Za obavljanje funkcije, potreban im je nikotinamid-adenine-dinukleotid-fosfat (NADPH) kao koenzim. Naziv obitelji potječe od valne duljine svjetla pri maksimalnoj apsorpciji (450 nm) (239-240). Gen koji kodira aromatazu CYP19A1 nastao je rano tijekom

evolucije svitkovaca te nije nađen kod drugih bezkralježnjaka (npr. insekata, školjki, spužvi i koralja) koji estrogene sintetiziraju drukčijim putem.

Ljudska aromataza je 58 kDa težak protein izoliran iz placentalnih mikrosoma krajem dvadestog stoljeća (241-244). Taj je protein visokoočuvan kod svih kralježnjaka. U enzimaksom kompleksu s flavoproteinom, NADPH-citokrom P450 reduktazom, ona katalizira konverziju androgena (C19), testosterona i androstenediona, u estrogene (C18), estradiol i estron (Slika 1.) (245-247). Aromataza se nalazi u endoplazmatskom retikulumu stanice te je njena aktivnost regulirana tkivno specifičnim promotorima koji su pak podložni utjecaju hormona, citokina i drugih čimbenika (248).

Aromataza je nađena u više vrsti stanica: granuloza stanicama, Leydigovim i Sertolijevim stanicama, stanicama posteljice, neuronima, preadipocitima i fibroblastima, stanicama vaskularnih glatkih mišića, hondrocitima i osteoblastima (242-244, 249-257). Dakle, estrogeni se proizvode u raznim tkivima, a ne samo u tradicionalno poznatim, poput gonada ili posteljice, nego i u mozgu, masnom tkivu, dojkama, koži, krvnim žilama, kosti i hrskavici (258). Ekspresija aromataze razlikuje se ne samo među tkivima i pojedincima, nego i tijekom različitih razdoblja života, npr. aromataza se nalazi u fetalnoj jetri, ali ne i u jetri odraslog čovjeka (247). U janicima žena u reproduktivnoj dobi nalaze se velike količine aromataze, glavnog izvora estrogena. Nakon menopauze, periferna tkiva postaju najvažnija mjesta sinteze estrogena. Kod muškaraca, 85% estradiola i više od 95% estrona proizvede se u vanžljezdanom tkivu kao posljedica aromatizacije cirkulirajućih androgena (258-259). Estrogeni koji nastaju u vanžljezdanom tkivu najčešće ne ulaze u cirkulaciju, nego imaju intrakrine, autokrine, parakrine i jukstakrine učinke na susjedne stanice (255). Interakcije na razini tkiva teško je klinički mjeriti pa zato često ostaju neprepoznate.

Slika 1 Funkcija aromataze



Nedostatak aromataze je vrlo rijedak autosomno recesivni poremećaj te je do danas opisano tek dvadesetak slučajeva (260-273). Nastaje zbog mutacija u kodirajućoj regiji gena CYP19A1 što dovodi do smanjenja ili gubitka funkcije enzima, a klinički se prezentira kao manjak estrogena. Većina opisanih mutacija su mutacije jednog nukleotida u egzonima 9 i 10 koji kodiraju regije enzima za vezanje supstrata i hema. Klinička slika kod oba spola nastaje još prije rođenja, kada se kod trudne majke javljaju znakovi virilizacije zbog nemogućnosti posteljice da aromatizira androgene. Povećane koncentracije androgena intrauterino dovode do androgenizacije ženskih

fetusa koji se rađaju s ambiguoznim spolovilima. Tijekom puberteta, djevojčice boluju od primarne amenoreje i nerazvijenih dojki. Prisutan je hipergonadotropni hipogonadizam s hiperandrogenizmom uz pojavu akni i hirzutizam. Također dolazi do zakašnjelog zatvaranja epifiza dugih kosti i smanjene mineralizacije kostiju (260, 262-264, 266, 268, 271). Za razliku od žena, kod muškaraca se simptomi nedostatka aromataze pojavljuju nakon puberteta. Karakterističan je visoki rast zbog zakašnjelog zatvaranja epifiza, bez obzira na visoke koncentracije testosterona. Također se nalaze: genu valgum, eunuhoidni izgled, osteopenija i osteoporoza. Muškarci sa sindromom nedostatka aromataze su pretili te im sa starenjem prijeti nastanak metaboličkog sindroma karakteriziranog abdominalnom pretilošću, hiperlipoproteinemijom, hiperinzulinemijom, rezistencijom na inzulin i šećernom bolesti. Prisutni mogu biti i smanjena plodnost, smanjeni libido te kriptorhizam (264-265, 267, 269-274). Hormonskom analizom seruma nije nađen estradiol ni estron, koncentracija gonadotropina je bila povišena, dok su koncentracije androstenediona i testosterona bile povišene ili normalne, što ukazuje na negativnu povratnu spregu estrogena i FSH i LH kod muškaraca (275). Fenotip muškaraca sa sindromom nedostatka aromataze nalikuje na ranije opisani fenotip muškarca sa inaktivirajućom mutacijom ESR1 (214). Za razliku od estrogenske rezistencije, muškarci s nedostatkom aromataze uspješno se liječe egzogenim estrogenima (265, 269, 273, 276).

Kod nekoliko je obitelji opisan sindrom viška estrogena zbog prevelike ekspresije aromataze (277-283). Karakteriziran je izraženom prepubertalnom ginekomastijom kod dječaka i makromastijom, preuranjenim pubertetom, povećanom maternicom i nepravilnom menstruacijom kod djevojčica. Preuranjeno zatvaranje epifiza dovodi do niskog rasta kod oba spola. U tom sindromu, povećana aromatizacija androgena

dovodi do visokih serumskih koncentracija estrogena uz niske koncentracije androgena i gonadotropina. U dvije obitelji s autosomno dominantnom ginekomastijom opisana je snažna povezanost s TTTA polimorfizmom CYP19A1, gena koji kodira aromatazu te je dokazana njezina povećana aktivnost u fibroblastima (279, 282). U nekoliko su slučajeva prepubertalne ginekomastije kod dječaka i hipogonadotropnog hipogonadizma uzrokovanog povišenom razinom estrogena, registrirane mutacije nekoliko promotorskih regija koje su dovele do pojačane aktivacije CYP19A1 i hiperfunkcije aromataze. (280, 283). CYP19A1 koristi nekoliko promotora čija aktivnost ne mora biti jednaka u svim tkivima te može ponekad uzrokovati suptilnu kliničku sliku viška estrogena koja može biti neprepoznata (238). Lokalno povećanu sintezu estrogena je nemoguće izmjeriti u normalnim kliničkim uvjetima, a promjene u koncentraciji cirkulirajućih spolnih hormona mogu biti nesignifikantne (238). Čak i suptilna lokalna hiperekspresija aromataze može biti patogena kod hormonalno ovisnih stanja poput karcinoma dojke i endometrija, endometrioze i ginekomastije (284).

Uloga u srcu

Istraživanjem na štakorima, dokazana je translacija mRNA aromataze te je dokazan i enzim u tkivu srca. Aromataza je u srcu eksprimirana u manjim koncentracijama nego u posteljici ili masnom tkivu (285). Za razliku od AR i ER, utjecaj funkcije aromataze u srcu uvijek je posredan i to modulacijom lokalnih koncentracija spolnih hormona. Na taj se način može bitno izmijeniti odgovr srca na ishemiju i reperfuziju, a dokazano je i izrazito proaritmijsko djelovanje zbog nedostatka funkcije aromataze

(285). Što se kardioloških bolesti ljudi tiče, do sada je promatrana veza funkcije aromataze i hipertenzije (286-287) te hipertrofijske kardiomiopatije (288).

Genetika

Aromatazu kodira gen CYP19A1 koji se nalazi na kromosomu 15, lokus (15q21) (289-290). Gen je dug oko 120 kb i sadrži 10 egzona. devet kodirajućih egzona (II-X) nalaze se na 30kb, a postoji i nekoliko alternativnih nekodirajućih prvih egzona koji su različito zastupljeni u pojedinim tkivima. Npr I.1 i I.2 u posteljici, I.3 u masnom tkivu, I.4 u fibroblastima kože, I.5 u fetusu, I.6 u kostima, I.7 u epitelu i I.f u mozgu (249-250, 291-295). Kako svako tkivo koristi vlastite promotore i s njima povezane pojačivače i supresore, tkivno specifična regulacija sinteze estrogena je vrlo kompleksna. Iako transkripti aromataze imaju različite 5' krajeve, ovisno o prpotoru u dotičnom tkivu, ti prvi egzoni se spajaju u zajedničku 3' poveznicu uzlazno od početka translacije, što rezultira sintezom identičnih proteina aromataze (250, 291-292). Dakle, upotreba različitih promotora ne utječe na strukturu aromataze, već na razinu njezine ekspresije.

Polimorfizmi aromataze

Osim mutacija u užem smislu koje zahvaćaju CYP19A1, najčešće genske promjene koje se pojavljuju su SNP. Ti se polimorfizmi javljaju u više od 1% populacije i uzrokuju pojavljivanje različitih alelnih formi gena. Oni su nasljedni i njihova je konfiguracija jedinstvena kod svake osobe (238). Do sada su nađena 942 polimorfizma gena CYP19A1 (prema: GeneCards, http://nciarray.nci.nih.gov/cards/).

Većina ih je prisutna u nekodirajućim regijama ili su kodirajuće, ali sinonimne mutacije (296). Postoje samo 4 nesinonimna kodirajuća SNP: Trp 39 Arg i Thr 201 Met, koji ne utječu na aktivnost aromataza te Arg 264 Cys i Met 364 Thr, koji smanjuju njezinu enzimatsku funkciju (238). Najekstenzivnije proučavani su vjerojatno polimorfizmi introna 4: mikrosatelit tetranukleotidnih (TTTA)n ponavljanja na položaju 77 i TCT insercija/delecija na položaju 27. Do sad su polimorfizmi aromataze povezani s njezinom aktivnosti, koncentracijom spolnih hormona u serumu (297-300) i stanjima ovisnim o estrogenima poput karcinoma dojke (299, 301-304), osteoporoze (297-298, 305), karcinoma endometrija (306-307), endometrioze (308-309), karcinoma prostate (310-311) i ginekomastije (279, 282, 312). Dulji aleli (TTTA)n polimorfizma s više od 8 tetranukleotidnih ponavljanja i TCT insercija bili su povezani sa povećanom incidencijom hiperestrogenih stanja (313). Neki su rezultati, međutim, kontradiktorni. Također, ni molekularni mehanizmi patogeneze nisu razjašnjeni, budući da se polimorfizmi nalaze unutar introna. U obzir dolazi povezanost s drugim funkcijskim polimorfizmima ili utjecaj na ekspresiju gena. In vitro studije su potvrdile povećanu aktivnost aromataze u fibroblastima kože ispitanika s više od 9 (TTTA)n ponavljanja (297).

Tablica 4 CYP19A1 polimorfizmi

Lokacija	Polimorfizam	Fenotip/poremećaj	Referenca
Intron 4	(TTTA)n (rs743572)	Karcinom dojke, lejomiom maternice	(304, 314-316)
	(TCT) insercija/delecija (rs11575899)	Karcinom i fibrocistična bolest dojke	(317)
Egzon 10	T>C (rs10046)	Hipertenzija, gustoća kosti, karcinom jajnika	(304, 318-320)
Egzon 3	G>A (rs700518)	Hipertenzija, tjelesna visina	(321-323)

2. HIPOTEZA

(TA)n polimorfizam gena ESR1, (CAG)n polimorfizam gena za AR te (TTTA)n polimorfizam gena CYP19A1, povezani su s povećanom prevalencijom izolirane fibrilacije atrija.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Analizirati povezanost genotipa s obzirom na polimorfizme (TA)n ESR1, (CAG)n AR i (TTTA)n CYP19A1 s pojavom izolirane fibrilacije atrija u odnosu na kontrolnu skupinu.

4. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno na Klinici za bolesti srca i krvnih žila, Klinici za unutrašnje bolesti i Kliničkom zavodu za medicinsku kemiju i biokemiju KBC-a Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Atrijska fibrilacija: od genoma do fenotipa i kliničke slike, br. 108-1081875-2001, voditelj projekta je prof.dr.sc. Anton Šmalcelj, specijalist interne medicine, subspecijalist kardiologije.

4.1. Ispitanici

U ovoj studiji parova sudjelovalo je 117 bolesnika s izoliranom FA i 197 zdravih ispitanika koji su služili kao kontrole. Svi ispitanici (bolesnici i kontrole) bili su bijele rase, porijeklom iz Grada Zagreba i šire okolice. U istraživanje su uključeni redom, kako su se pojavljivali u stacionaru ili ambulanti Klinike od siječnja 2010. do prosinca 2012. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak. Protokol istraživanja sukladan je etičkim smjernicama objavljenim 1975. u Helsinškoj deklaraciji. Istraživanje je odobreno od etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1.1. Bolesnici

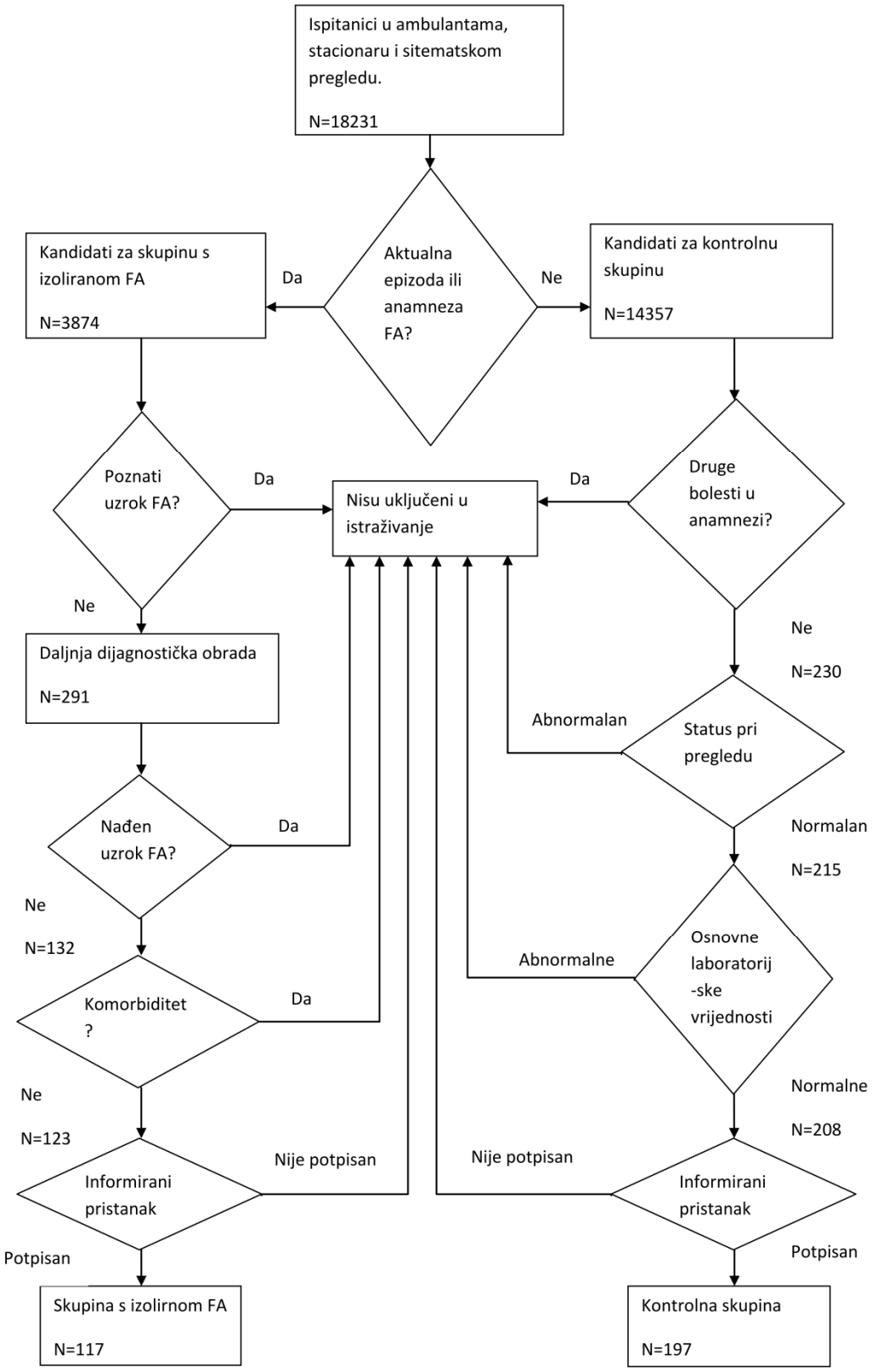
Glavni kriterij uključivanja u skupinu bolesnika s izoliranom FA bila je elektrokardiografski dokumentirana epizoda FA, bez poznatih etioloških čimbenika za FA (tj. arterijska hipertenzija, srčano popuštanje, bolest srčanih zalistaka, kardiomiopatija, kongenitalne srčane greške, koronarna bolest, bolest štitnjače, pretilost, šećerna bolest, kronična opstruktivna bolest pluća, apneja u spavanju i

kronična bolest bubrega) (324). Svi bolesnici s izoliranom FA podvrgnuti su neinvazivnoj kardiološkoj evaluaciji, uključujući ehokardiografiju. Iz ispitivanja su isključeni bolesnici pušači te korisnici alkohola i droga. Proces uključivanja i isključivanja bolesnika iz istraživanja prikazan je u slici 2.

4.1.2. Kontrolna skupina

Kontrolnu su skupinu činili zdravi zaposlenici KBC-a Zagreb podvrgnuti sistematskom pregledu, kao i drugi zdravi korisnici usluga KBC-a Zagreb (npr. darivatelji koštane srži) sa zdravim srcima i normalnim elektrokardiogramima. Pregledani su od strane liječnika, koji nije našao znakove ili anamnestičke podatke bolesti. Proces uključivanja i isključivanja kontrola iz istraživanja prikazan je u slici 2.

Slika 2 Protokol uključivanja ispitanika u istraživanje



4.2. Metode

Visina ispitanika mjerena je Harpenderovim stadiometrom, a masa digitalnom vagom. Indeks tjelesne mase (BMI) izračunat je kao kvocijent mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima. Krvni tlak mjeren je sfingomanometrom. Srednji arterijski tlak (MAP) izračunat je prema formuli: sistolički tlak (SBP) x 1/3 + dijastolički tlak (DBP) x 2/3.

4.2.1. Ehokardiografija

Svim ispitanicima učinjen je standardni transtorakalni ehokardiogram pomoću uređaja GE Vivid 7 opremljenim sondom M4S (1.5 – 4.0 MHz). Pretragu je uvijek izvršio iskusni ehosonografičar, a podaci su kasnije reanalizirani koristeći kompjuterski program GE Health Care EchoPac Dimension software, PC version 108.1.4.

4.2.2. Određivanje genotipova

Svim ispitanicima izvađeno je 5 ml krvi iz periferne vene te pohranjena u epruvetu s Na-EDTA i čuvana na 4°C. Nakon transporta u laboratorij, genomska je DNA izolirana iz leukocita koristeći set za ekstrakciju Nucleon II DNA extraction kit (Scotlab, Coatbridge, Lanarkshire, UK) prema uputama proizvođača. Ekstrahirana je DNA priređena za daljnju analizu i pohranjena na -30°C.

PCR primeri bili su napravljeni za amplifikaciju polimorfne regije (TA)n ponavljanja 1174 bp uzvodno mjesta početka prvog egzona humanog gena ESR1. 5' primer obilježen je fluoroscentnom bojom cijaninom (Cy5), dok 3' primer nije bio obilježen. Lančana reakcija polimeraze (PCR) odvijala se u volumenu od 50 µL koji je sadržavao 100 ng DNA, 10 pmol svakog primera (prednji: 5'-GACGCATGATATACTTCACC, reverzni: 3'-GCAGAATCAAATATCCAGATG), 200

μM svakog od četiri deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 10x pufersku otopinu (100 mM Tris-HCl, pH 8.3 na 25°C; 500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; 0.01% želatine) za optimalnu aktivnost i stabilnost DNA polimeraze, 1.25 U Taq DNA polimeraze. Provedeno je trideset PCR-ciklusa (prvi korak (denaturacija) - 2 minute na 94°C, drugi korak (prijanjanje, eng. annealing) - 1 minutu na 58°C i treći korak (ekstenzija/elongacija) - 1 minutu na 74°C). Nakon amplifikacije, produkti PCR podvrgnuti su elektroforezi na gelu od 6% poliakrilamida u automatiziranom uređaju za sekvencioniranje (ALFexpress, Amersham Pharmacia). Određivanje alela učinjeno je pomoću računalnog programa AlleleLocator software (Amersham Pharmacia) koji računa duljinu fragmenata prema ljestvici alela (eng. allelic ladder), standardiziranom uzorku koji sadržava sve alele određenog gena. Kao dodatni standardi, na svakom su gelu korišteni i ALFexpress Sizer od 200 bp (Amersham Pharmacia) kao i ALFexpress Sizer od 100 bp.

(CAG)n polimorfizam egzona 1 gena AR amplificiran je koristeći PCR na analogan način kao i (TA)n polimorfizam ESR1 s 10 pmol svakog primera: prednji: 5′ GCGCGAAGTGATCCAGAAC 3′ obilježen Cy5 fluoroscentnom bojom i reverzni 5′ CTCATCCAGGACCAGGTAGC 3′ koji nije bio obilježen. Puferska otopina, deoksinukleozid trifosfati (dNTP) i Taq DNA polimeraza isti su kao i kod ranije opisanog ESR1 polimorfizma. Provedeno je 35 ciklusa PCR, a svaki se sastoja od tri koraka: denaturacija na 94 °C kroz dvije minute, prijanjanje (eng. annealing) na 58 °C kroz 60 s i polimerizacija na 74 °C kroz 60 s. Nakon amplifikacije, produkti PCR podvrgnuti su elektroforezi na gelu od 6% poliakrilamida u automatiziranom uređaju za sekvencioniranje (ALFexpress, Amersham Pharmacia). Određivanje alela učinjeno je pomoću računalnog programa AlleleLocator software (Amersham Pharmacia).

Tetranukleotidni polimorfizam u intronu 4 gena CYP19A1 također je amplificiran prema analognom protokolu. PCR amplifikacija polimorfnog fragmenta provedena je koristeći primere, 5'-CAA CTC GAC CCT TCT TTA TG-3' (prednji, obilježen s Cy5) i 5'–GTT TGA CTC CGT GTG TTT GA–3' (reverzni). Lančana reakcija polimeraze (PCR) odvijala se u volumenu od 50 µL koji je sadržavao 100 ng DNA, 10 pmol svakog primera, pufersku otopinu, deoksinukleozid trifosfate (dNTP) i Taq DNA polimerazu kao što je navedeno ranije. Provedeno je 35 ciklusa PCR, a svaki se sastoja od tri koraka: denaturacija na 94 °C kroz dvije minute, prijanjanje (eng. annealing) na 58 °C kroz 60 s i polimerizacija na 74 °C kroz 60 s. Nakon amplifikacije, produkti PCR podvrgnuti su elektroforezi na gelu od 6% poliakrilamida u automatiziranom uređaju za sekvencioniranje (ALFexpress, Amersham Pharmacia). Određivanje alela učinjeno je pomoću računalnog programa AlleleLocator software (Amersham Pharmacia).

Kod svih su reakcija korištene pozitivne kontrole koje su sadržavale genomsku DNA i negativne kontrole koje su sadržavale sve osim DNA.

Genotipizacija je provedena od strane laboratorijskog osoblja kojima nije bio poznat status ispitanika s obzirom na izoliranu FA.

4.2.3. Statistička obrada podataka

Metode

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti uz standardnu devijaciju (SD) za kontinuirane vrijable te apsolutni brojevi uz relatvne frekvencije (%) za kategorijske varijable. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli provjerena je Kolmogorov-Smirnov testom. Mann–Whitney U test korišten je za uspoređivanje razlika između

bolesnika i kontrola za kontinuirane varijable, a za kategorijske varijable korišten je χ2 test. Svi polimorfizmi analizirani su isprva zasebno, prema broju ponavljanja polinukleotidnih sekvencija, a potom su razmatrani kao kombinacije alela. Podjela polimorfizama prema alelima prikazana je u tablici 5.

Povezanost pojedinih genotipova s FA, analizirana je pomoću logističke regresije; načinjeni su modeli s FA kao ishodom za svaki pojedini gen. Za sve analize, $p<0.05$ (double-sided) smatran je signifikantnim. Za sve analize korišten je statistički program Statsoft, Inc. (2010) STATISTICA (data analysis software system), inačica 9.1. www.statsoft.com.

Tablica 5 Podjela polimorfizama na duge (L) i kratke (S) alele

Alel	ESR1 (TA)n	AR (CAG)n	CYP19A1 (TTTA)n
S	8-21	7-20	7(-3pb)-9
L	22-27	21-34	10-14

5. REZULTATI

Kao što je vidljivo iz tablice 6. nije bilo razlike između skupine s FA i kontrolne skupine prema kliničkim i ehokradigrafskim parametrima, što je bila i namjera istražiavanja i pokazatelj kvalitete kontrolne skupine.

Tablica 6 Klinički i ehokardiografski pokazatelji ispitanika s izoliranom FA i kontrola

	FA (N=117)	Kontrole (N=197)	p vrijednost*
Dob (godine)	43.07±10.65	43.92±10.32	0.849
Ženski spol	44 (37.6%)	65 (33%)	0.407
SBP (mmHg)	119.8±7.3	119.4±7.2	0.66
DBP (mmHg)	77.3±4.8	77.5±4.7	0.803
BMI (kg/m^2)	24.1±3.1	23.9±2.9	0.629
LVIDd† (cm)	5.09±0.34	5.05±0.33	0.865
IVSTh‡ (cm)	0.94±0.15	0.92±0.16	0.768
PWTh§ (cm)	0.84±0.15	0.85±0.14	0.840
EF‖ %	66±5.0	66±4.5	0.775
LA¶ (cm)	3.6±0.66	3.5±0.52	0.557
LAvol** (mL)	41.74±20.1	41.64±19.2	0.816
RAvol†† (mL)	30.42±14.71	30.37±13.3	0.854

* Kontinuirane vrijable uspoređene su pomoću dvostranog Mann–Whitney testa, †promjer lijeve klijetke na kraju dijastole, ‡debljina interventrikulskog septuma, §debljina stražnje stijenke lijeve klijetke, ‖ejekcijska frakcija lijeve klijetke, ¶duljina uzdužne osi lijevog atrija na kraju sistole, **volumen lijevog atrija na kraju sistole, ††volumen desnog atrija na kraju sistole

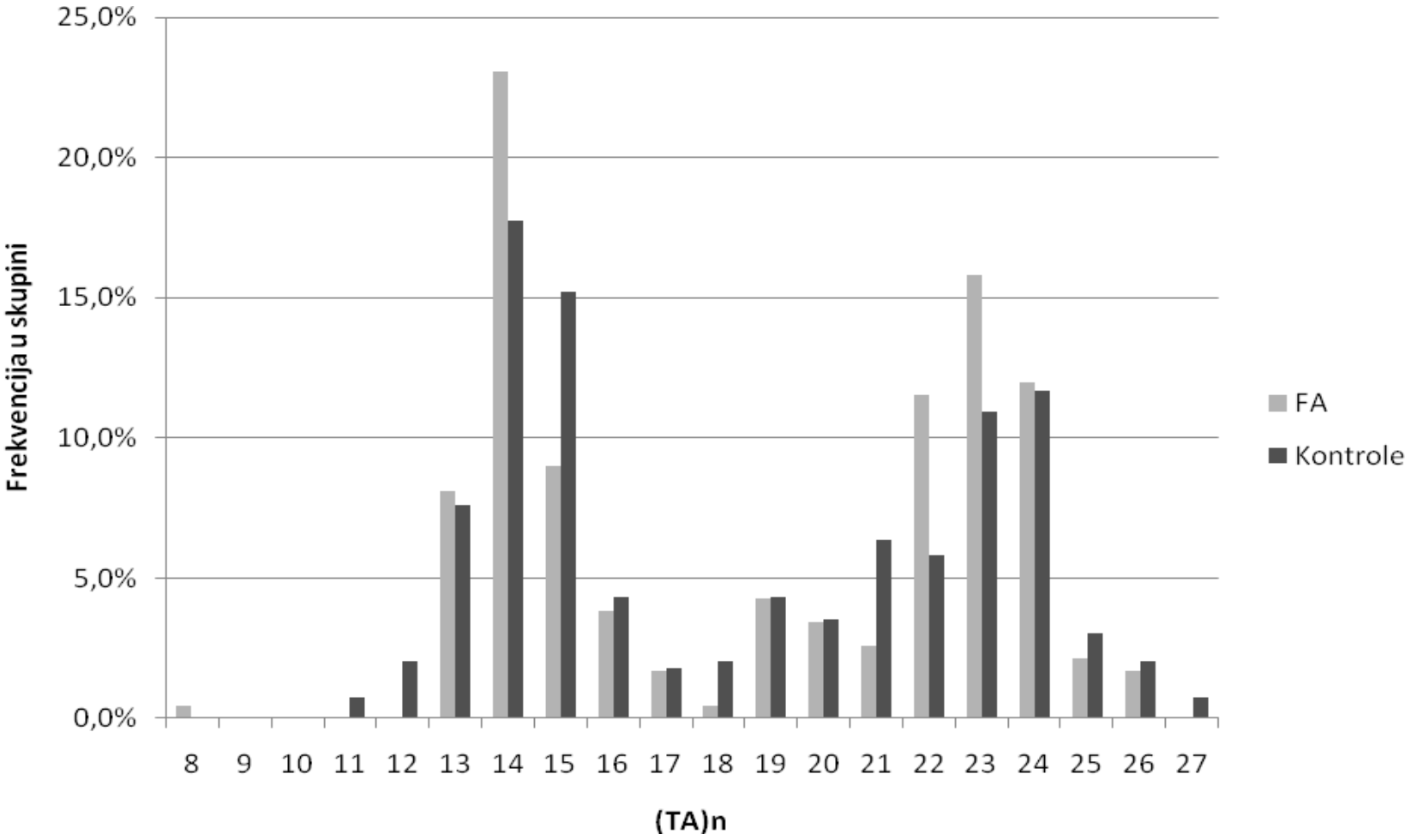
Svi su ispitanici (bolesnici i kontrole) imali strukturno zdrava srca i normalan krvni tlak.

5.1. Rezultati genotipizacije estrogenskog receptora alfa

Registrirano je 20 različitih alela s brojem (TA)n dinukleotidnih ponavljanja između 8 i 27. Ovaj polimorfizam pokazuje bimodalnu distribuciju s dva vrška (maksimuma) i to sa 14 ponavljanja (19.8% alela) i 23 ponavljanja (12.6% alela) te minimumom na 18 (TA)n dinukleotidnih ponavljanja kao što je opisano ranije (325). Ista bimodalna distribucija prati se kod bolesnika s FA i kod ispitanika iz kontrolne skupine kao što je prikazano na slici 3, a apsolutni su podaci u tablici 7.

Nakon rangiranja prema spolu, po broju dinukleotidnih ponavljanja (tablica 8.), zamjetna je veća zastupljenost duljih alela u skupini bolesnika s FA koja se nakon raščlanjivanja po spolu jasno može pripisati muškarcima s FA (43.1% vs. 33%, tablica 9, p=0.012). Osim toga, potvrđena je i povećana učestalost haplotipova s kombinacijom dviju "dugih" alela ((TA)n>21) u skupini muškaraca s FA (19.2% vs. 7.6%,tablica 10, slika 3, p=0.021).

Slika 3 Distirbucija (TA)n polimorfizma



Tablica 7 Distribucija pojedinih alela prema broju (TA)n

(TA)n	FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)
8	1	0.4	0	0.0
9	0	0.0	0	0.0
10	0	0.0	0	0.0
11	0	0.0	3	0.8
12	0	0.0	8	2.0
13	19	8.1	30	7.6
14	54	23.1	70	17.8
15	21	9.0	60	15.2
16	9	3.8	17	4.3
17	4	1.7	7	1.8
18	1	0.4	8	2.0
19	10	4.3	17	4.3
20	8	3.4	14	3.6
21	6	2.6	25	6.3
22	27	11.5	23	5.8
23	37	15.8	43	10.9
24	28	12.0	46	11.7
25	5	2.1	12	3.0
26	4	1.7	8	2.0
27	0	0.0	3	0.8
Ukupno	234	100.0	394	100.0

Tablica 8 Distribucija pojedinih alela prema broju (TA)n i spolu ispitanika

(TA)n	Muškarci				Žene			
	FA		Kontrole		FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)
8	1	0.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0
9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
10	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
11	0	0.0	3	1.1	0	0.0	0	0.0
12	0	0.0	8	3.0	0	0.0	0	0.0
13	13	8.9	18	6.8	6	6.8	12	9.2
14	30	20.5	55	20.8	24	27.3	15	11.5
15	12	8.2	38	14.4	9	10.2	22	16.9
16	5	3.4	11	4.2	4	4.5	6	4.6
17	2	1.4	4	1.5	2	2.3	3	2.3
18	1	0.7	7	2.7	0	0.0	1	0.8
19	8	5.5	13	4.9	2	2.3	4	3.1
20	6	4.1	8	3.0	2	2.3	6	4.6
21	5	3.4	19	7.2	1	1.1	6	4.6
22	19	13.0	13	4.9	8	9.1	10	7.7
23	22	15.1	35	13.3	15	17.0	8	6.2
24	19	13.0	23	8.7	9	10.2	23	17.7
25	2	1.4	6	2.3	3	3.4	6	4.6
26	1	0.7	3	1.1	3	3.4	5	3.8
27	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	2.3
Ukupno	146	100.0	264	100.0	88	100.0	130	100.0

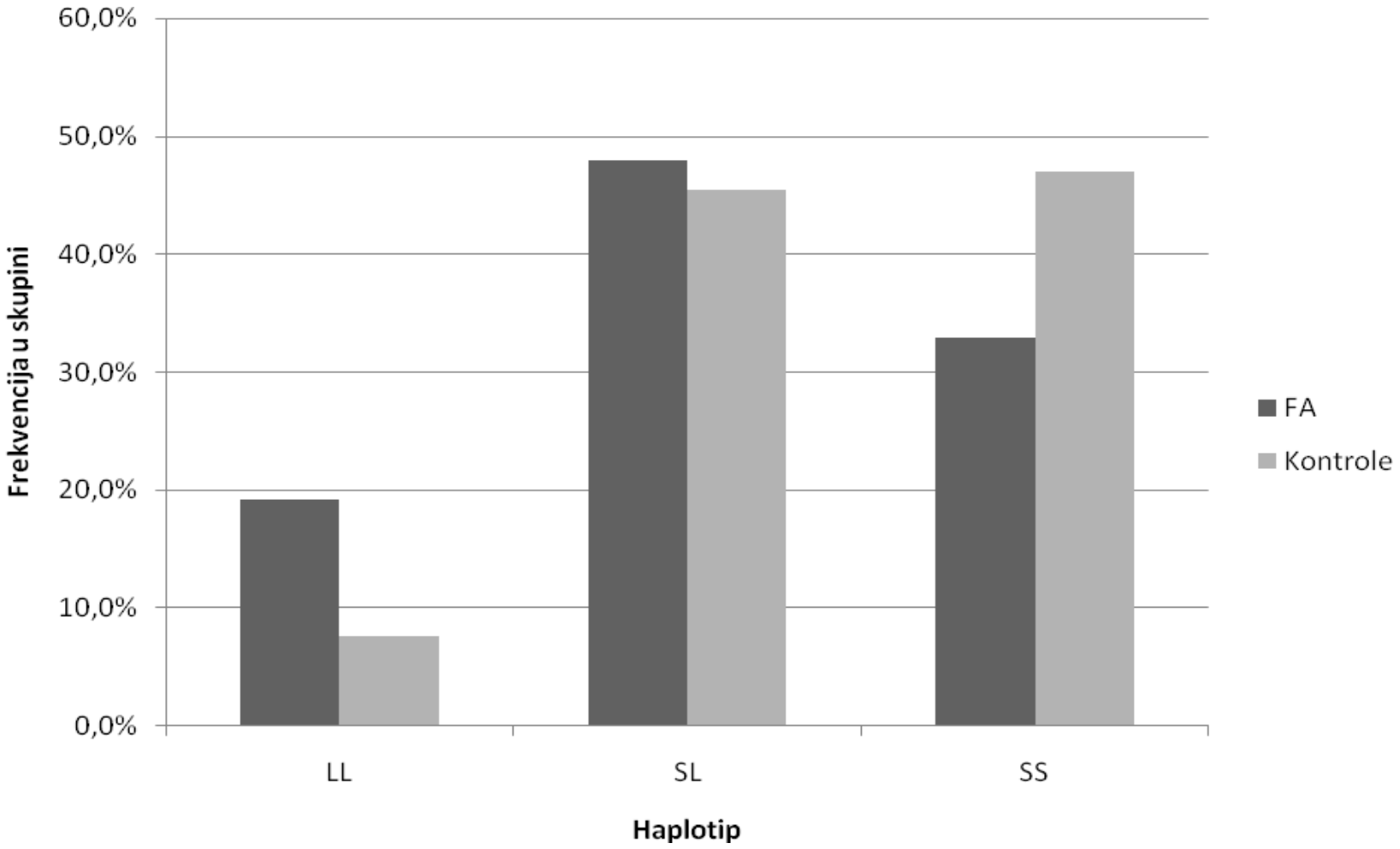
Tablica 9 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (TA)n prema spolu ispitanika

ESR1 genotip	Muškarci			Žene			Ukupno		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
8-21	83 (56.9)	184 (69.7)		50 (56.8)	75 (57.7)		133 (56.8)	259 (65.7)	
22-27	63 (43.1)	80 (30.3)	0.012	38 (43.2)	55 (42.3)	0.899	101 (43.2)	135 (34.3)	0.032
Ukupno	146	264		88	130		234	394	

Tablica 10 Razlike frekvencija kombinacija alela ESR1 gena prema spolu ispitanika

Haplo-tip	Muškarci			Žene			Ukupno		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
LL	14 (19.2)	10 (7.6)		8 (18.2)	10 (15.4)		22 (18.8)	20 (10.2)	
SL	35 (47.9)	60 (45.4)	0.021	22 (50)	35 (53.8)	0.901	57 (48.7)	95 (48.2)	0.057
SS	24 (32.9)	62 (47)		14 (31.8)	20 (30.8)		38 (32.5)	82 (41.6)	
Ukupno	73	132		44	65		117	197	

Slika 4 ESR1 haplotipovi kod muškaraca



* p=0.021

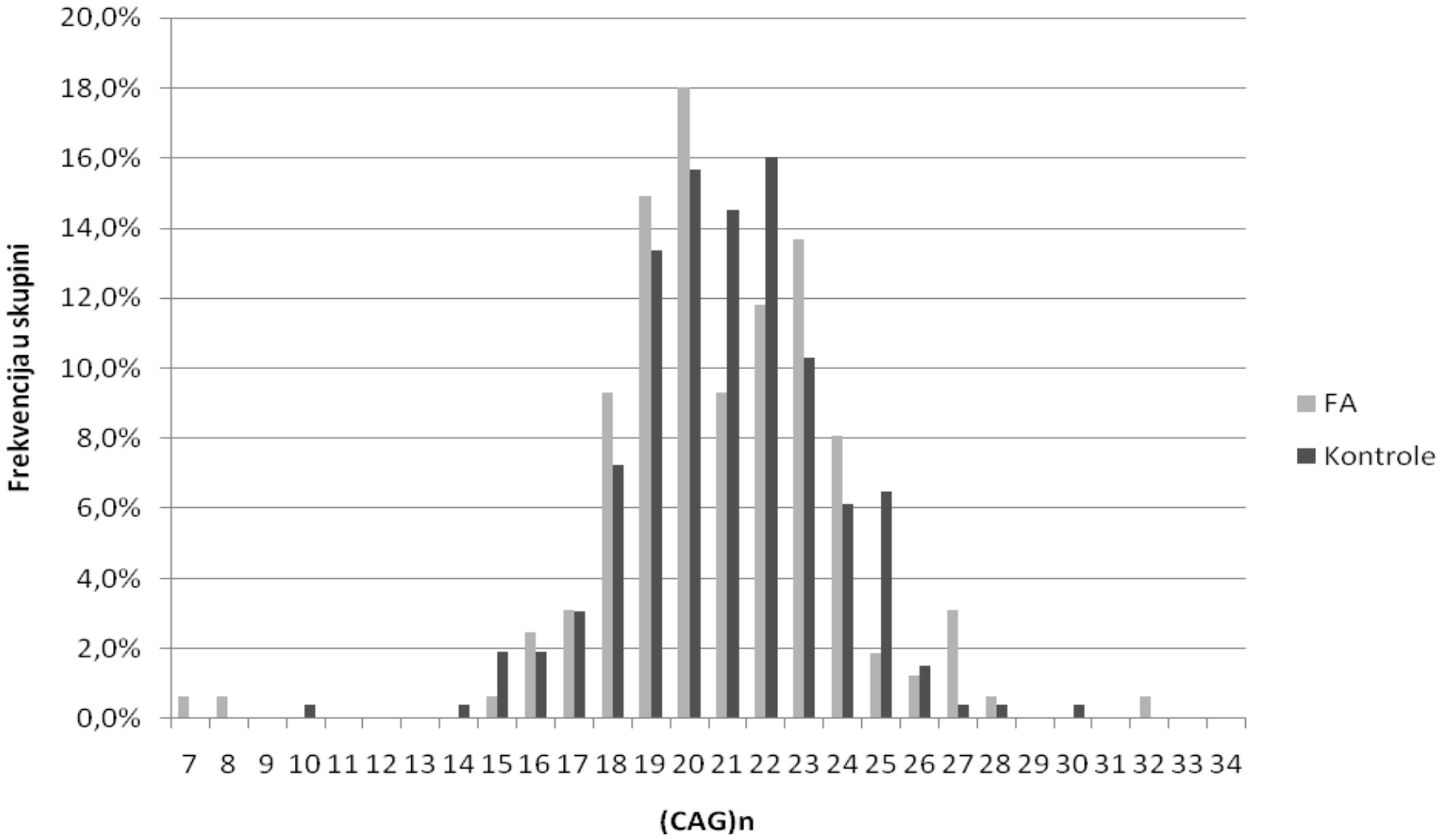
5.2. Rezultati genotipizacije androgenog receptora

Registrirano je 28 različitih alela s brojem (CAG)n trinukleotidnih ponavljanja između 7 i 34. Ovaj polimorfizam pokazuje normalnu distribuciju s vrškom na 20 ponavljanja (16.5% alela), (slika 5, tablica 11.) kao što je opisano ranije (326).

Nakon analize po spolu, nije registrirano značajnih odstupanja osim nešto niže zastupljenosti alela s 21 i 22 (CAG)n ponavljanja kod žena s FA u odnosu na kontrolnu skupinu (tablice 12. i 13.).

Prilikom analize haplotipova, primjećen je manji udio LL genotipa kod žena s FA u odnosu na zdrave kontrole, rezultat međutim nije statistički značajan (tablica 14, slika 6). S obzirom na mali broj ispitanih žena i statističku snagu testa od 60%, moglo bi se raditi o lažno negativnom rezultatu.

Slika 5 Distribucija (CAG)n polimorfizma



Tablica 11 Distribucija pojedinih alela prema broju (CAG)n

(CAG)n	FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)
7	1	0.6	0	0.0
8	1	0.6	0	0.0
9	0	0.0	0	0.0
10	0	0.0	1	0.4
11	0	0.0	0	0.0
12	0	0.0	0	0.0
13	0	0.0	0	0.0
14	0	0.0	1	0.4
15	1	0.6	5	1.9
16	4	2.5	5	1.9
17	5	3.1	8	3.1
18	15	9.3	19	7.3
19	24	14.9	35	13.4
20	29	18.0	41	15.6
21	15	9.3	38	14.5
22	19	11.8	42	16.0
23	22	13.7	27	10.3
24	13	8.1	16	6.1
25	3	1.9	17	6.5
26	2	1.2	4	1.5
27	5	3.1	1	0.4
28	1	0.6	1	0.4
29	0	0.0	0	0.0
30	0	0.0	1	0.4

31	0	0.0	0	0.0
32	1	0.6	0	0.0
33	0	0.0	0	0.0
34	0	0.0	0	0.0
Ukupno	161	100.0	262	100.0

Tablica 12 Distribucija pojedinih alela prema broju (CAG)n i spolu ispitanika

(CAG)n	Muškarci				Žene			
	FA		Kontrole		FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)
7	1	1.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
8	1	1.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
10	0	0.0	1	0.8	0	0.0	0	0.0
11	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
12	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
13	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
14	0	0.0	1	0.8	0	0.0	0	0.0
15	1	1.4	2	1.5	0	0.0	3	2.3
16	3	4.1	5	3.8	1	1.1	0	0.0
17	4	5.5	4	3.0	1	1.1	4	3.1
18	6	8.2	11	8.3	9	10.2	8	6.2
19	13	17.8	19	14.4	11	12.5	16	12.3
20	9	12.3	21	15.9	20	22.7	20	15.4
21	6	8.2	9	6.8	9	10.2	29	22.3

22	8	11.0	17	12.9	11	12.5	25	19.2
23	9	12.3	15	11.4	13	14.8	12	9.2
24	5	6.8	8	6.1	8	9.1	8	6.2
25	2	2.7	13	9.8	1	1.1	4	3.1
26	2	2.7	4	3.0	0	0.0	0	0.0
27	2	2.7	1	0.8	3	3.4	0	0.0
28	0	0.0	0	0.0	1	1.1	1	0.8
29	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
30	0	0.0	1	0.8	0	0.0	0	0.0
31	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
32	1	1.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
33	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
34	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Ukupno	73	100.0	132	100.0	88	100.0	130	100.0

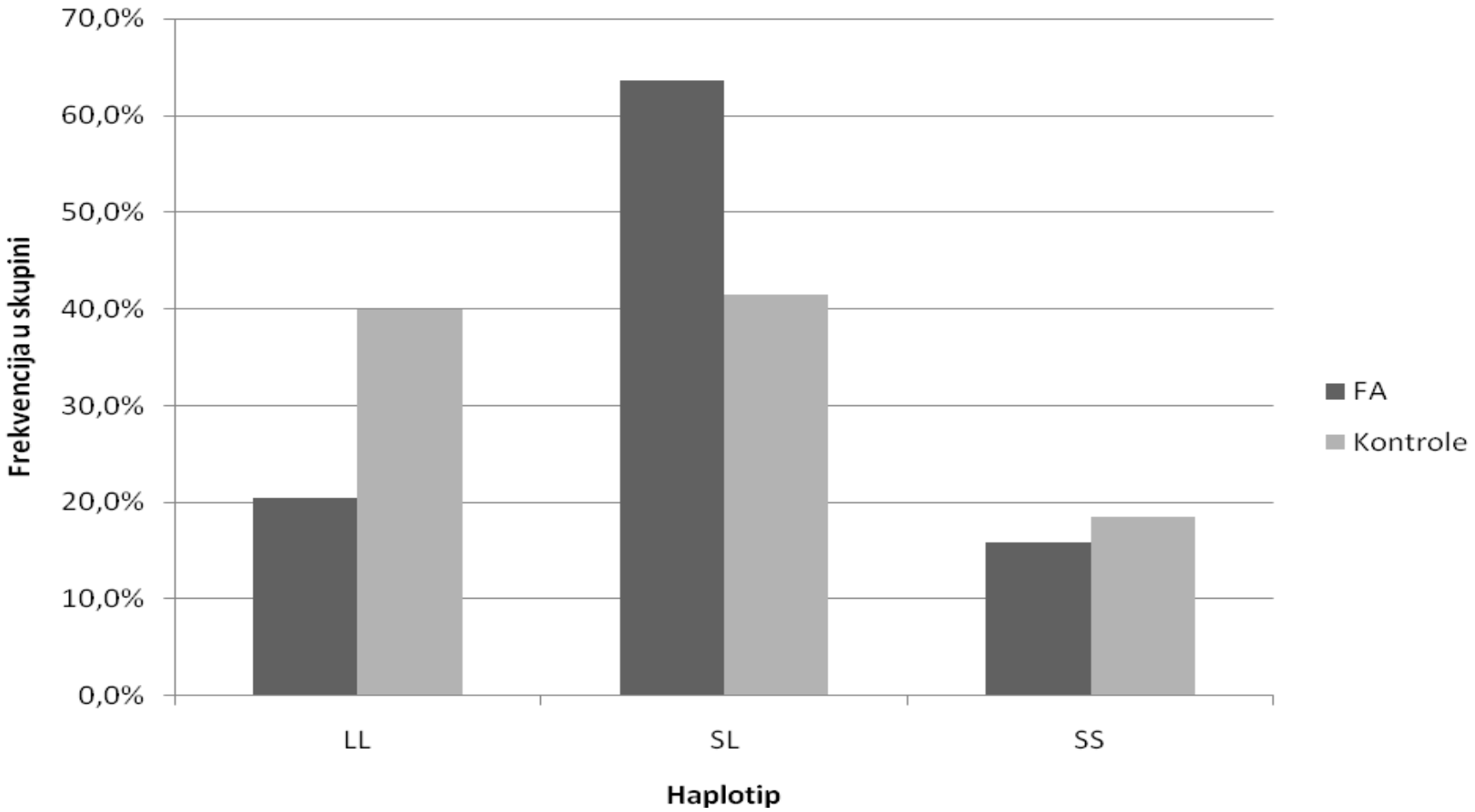
Tablica 13 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (CAG)n prema spolu ispitanika

AR genotip	Muškarci			Žene			Ukupno		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
7-20	38 (52)	64 (48.5)		42 (42.7)	51 (39.2)		80 (49.7)	115 (43.9)	
21-34	35 (48)	68 (51.5)	0.624	46 (57.3)	79 (60.8)	0.213	81 (50.3)	147 (56.1)	0.246
Ukupno	73	132		88	130		161	262	

Tablica 14 Razlike frekvencija kombinacija alela AR gena prema spolu ispitanika

Haplotip	Muškarci			Žene		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
LL	35 (47.9)	68 (51.5)	0.624	9 (20.5)	26 (40)	0.056
SL	0	0		28 (63.6)	27 (41.5)	
SS	38 (52.1)	64 (48.5)		7 (15.9)	12 (18.5)	
Ukupno	73	132		44	65	

Slika 6 Haplotipovi AR kod žena



*p=0.056

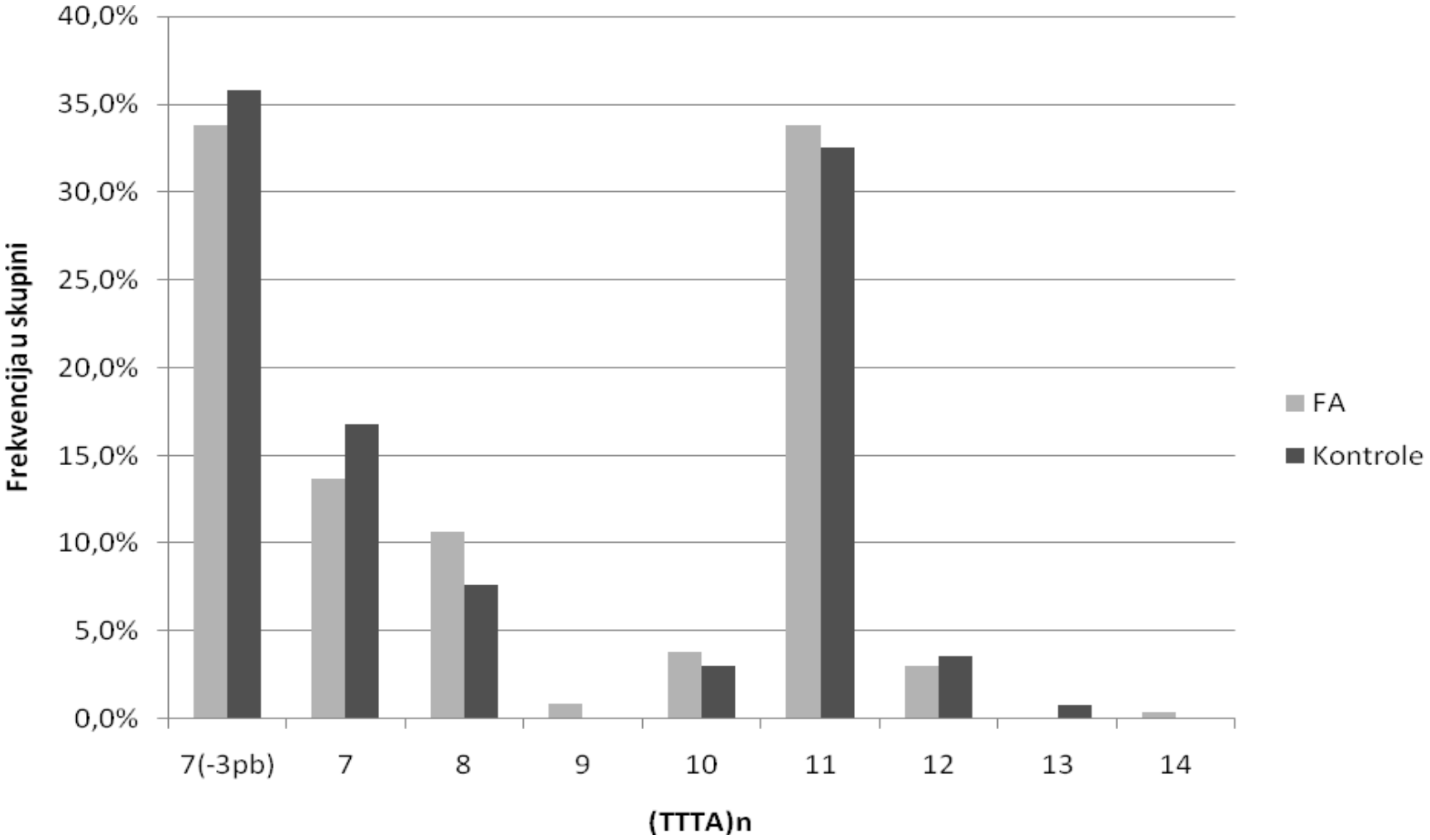
5.3. Rezultati genotipizacije aromataze

Registrirano je 9 različitih alela s brojem (TTTA)n tetranukleotidnih ponavljanja između 7 i 14 uz varijantu 7(-3pb) sa odgovarajućim veličinama alela od 168–195 bp. Ovaj mikrosatelit sadrži dva oblika (TTTA) 7 alela ovisno o TCT inserciji/deleciji 50-bp uzvodno od (TTTA)n regije, što rezultira PCR produktima veličine od 168 odnosno 171 bp. PCR produkt veličine 168 bp odgovara (TTTA) 7-3 alelu, dok PCR produkt veličine 171 bp odgovara (TTTA) 7 alelu. Ovaj polimorfizam pokazuje bimodalnu distribuciju s vrškovima na 7(-3pb) ponavljanja (35% alela) i 11 ponavljanja (33% alela) te minimumom na 9 (TTTA)n tetranukleotidnih ponavljanja kao što je opisano ranije (slika 6, tablica 15.).

Nakon analize po spolu, nađene su statistički nesignifikantne razlike koje kod svakog spola idu u suprotnom smjeru tako da ukupno gledajući razlike gotovo i nema (tablice 16. i 17.).

Pojedine se haplotipske kombinacije alela također nisu pokazale signifikantno različitima i to kod oba spola (tablica 18).

Slika 7 Distribucija (TTTA)n polimorfizma



Tablica 15 Distribucija pojedinih alela prema broju (TTTA)n

(TTTA)n	FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)
7(-3pb)	79	33.8	141	35.8
7	32	13.7	66	16.8
8	25	10.7	30	7.6
9	2	0.9	0	0.0
10	9	3.8	12	3.0
11	79	33.8	128	32.5
12	7	3.0	14	3.6
13	0	0.0	3	0.8
14	1	0.4	0	0.0
Ukupno	234	100.0	394	100.0

Tablica 16 Distribucija pojedinih alela prema broju (TTTA)n i spolu ispitanika

(TTTA)n	Muškarci				Žene			
	FA		Kontrole		FA		Kontrole	
	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)	n	udio (%)
7(-3pb)	54	37.0	98	37.1	25	28.4	43	33.1
7	13	8.9	50	18.9	19	21.6	16	12.3
8	13	8.9	19	7.2	12	13.6	11	8.5
9	1	0.7	0	0.0	1	1.1	0	0.0
10	8	5.5	8	3.0	1	1.1	4	3.1
11	52	35.6	79	29.9	27	30.7	49	37.7
12	5	3.4	9	3.4	2	2.3	5	3.8
13	0	0.0	1	0.4	0	0.0	2	1.5
14	0	0.0	0	0.0	1	1.1	0	0.0
Ukupno	146	100.0	264	100.0	88	100.0	130	100.0

Tablica 17 Razlike u distribuciji prema skupinama alela definiranim brojem (TTTA)n prema spolu ispitanika

CYP19A1 genotip	Muškarci			Žene			Ukupno		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
6-9	81 (55.5)	167 (63.3)		57 (64.8)	70 (53.8)		138 (59)	237 (60.2)	
10-14	65 (44.5)	97 (36.7)	0.123	31 (35.2)	60 (46.2)	0.108	96 (41)	157 (39.8)	0.771
Ukupno	146	264		88	130		234	394	

Tablica 18 Razlike frekvencija kombinacija alela CYP19A1 gena prema spolu ispitanika

Haplo-tip	Muškarci			Žene			Ukupno		
	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p	FA	Kontrole	p
LL	15 (20.5)	18 (13.6)		5 (11.4)	17 (26.2)		20 (17.1)	35 (17.8)	
SL	35 (48)	61 (46.2)	0.305	21 (47.7)	26 (40)	0.168	56 (47.9)	87 (44.2)	0.81
SS	23 (31.5)	53 (40.2)		18 (40.9)	22 (33.8)		41 (35)	75 (38)	
Ukupno	73	132		44	65		117	197	

5.4. Binarna logistička regresija

Načinjena su tri univarijabilna modela binarne logističke regresije sa sljedećim varijablama kao prediktorima: LL genotip ESR1 gena (dakle oba alela s (TA)n>21, 1-da, 0-ne), LL genotip AR gena (oba alela s (CAG)>20, 1-da, 0-ne) i LL genotip CYP19A1 gena (oba alela s (TTTA)n>9, 1-da, 0-ne). Prema rezultatima (tablica 19, slika 8) nosioci ESR1 LL genotipa izvrgnuti su dvostruko većem riziku FA od ostalih ispitanika, p=0.032. AR LL genotip smanjuje rizik FA, međutim ne statistički signifikantno, p=0.08. Genotip LL CYP19A1 gena nije signifikantan prediktor izolirane FA. U drugom koraku u modele su uključene i ostale varijable: krvni tlak (MAP u mmHg), starost ispitanika (u godinama), indeks tjelesne mase (BMI u kg/m^2) te muški spol (1-da, 0-ne). ESR1 LL genotip ostao je signifikantan prediktor bez značajne promjene rizika (tablica 19.). Nije bilo drugih neovisnih prediktora izolirane FA. U posljednjem su koraku načinjena četiri univarijabilna modela radi ispitivanja eventualne međusobne povezanosti polimorfizama koji su se pokazali učestalijima kod bolesnika s FA. Najjača je povezanost bila između ESR1 LL genotipa i AR SS+SL genotipa (non-LL), iako nije bila statistički signifikantna, p=0.066 (tablica 20.).

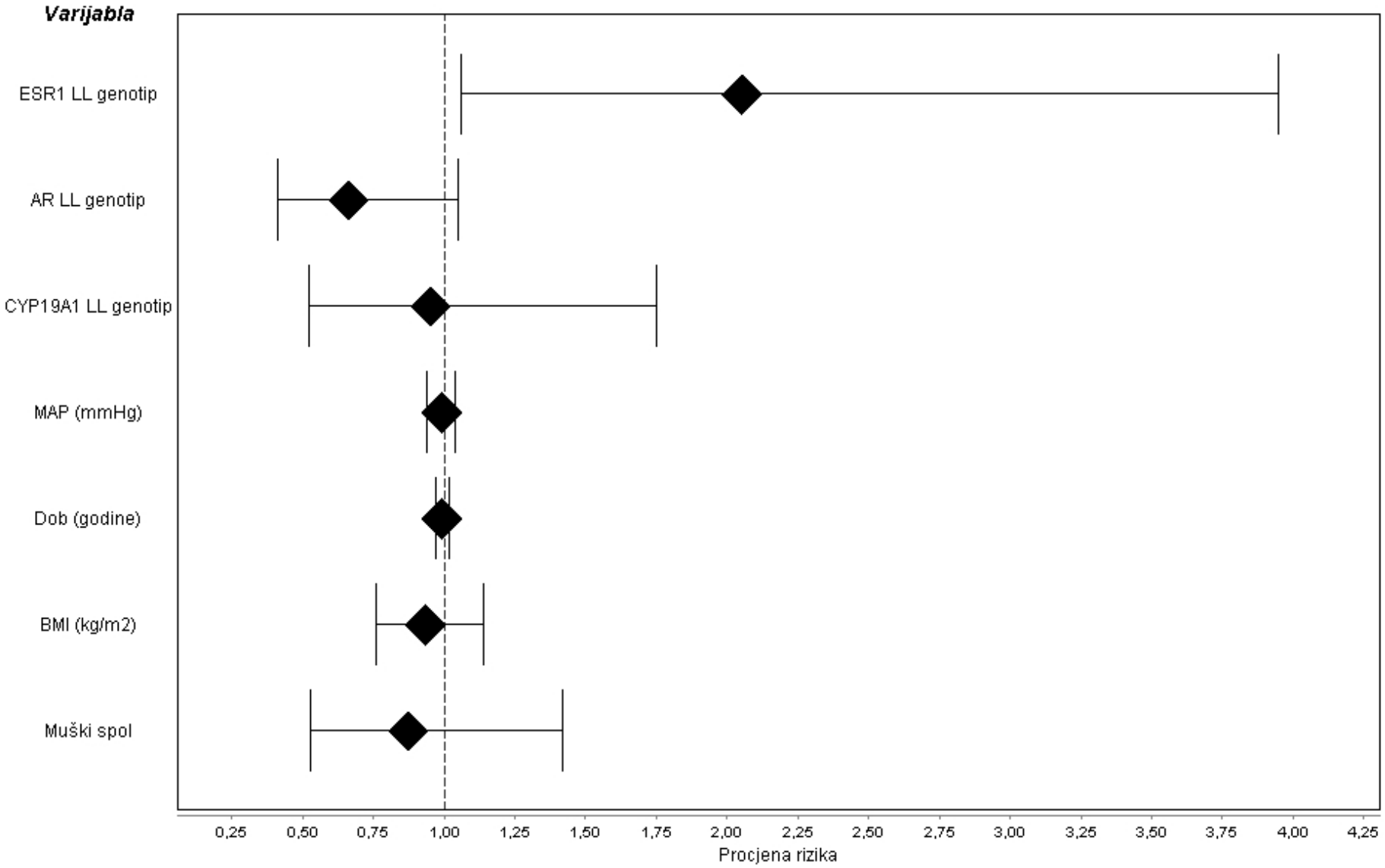
Tablica 19 Modeli multivarijabilne analize

Modeli	Varijabla	OR	CI	p
Model 1 (Univarijabilni)	ESR1 LL genotip	2.05	1.06-3.95	0.032
Model 2 (Univarijabilni)	AR LL genotip	0.66	0.41-1.05	0.08
Model 3 (Univarijabilni)	CYP19A1 LL genotip	0.95	0.52-1.75	0.879
Model 4 (Multivarijabilni)	ESR1 LL genotip	2.05	1.06-3.97	0.033
	MAP (mmHg)	0.99	0.94-1.04	0.616
	Dob (godine)	0.99	0.97-1.02	0.529
	BMI (kg/m^2)	0.93	0.76-1.14	0.508
	Muški spol	0.87	0.53-1.42	0.583
Model 5 (Multivarijabilni)	AR LL genotip	0.69	0.43-1.12	0.134
	MAP (mmHg)	1	0.95-1.05	0.877
	Dob (godine)	0.99	0.97-1.02	0.643
	BMI (kg/m^2)	0.94	0.77-1.16	0.579
	Muški spol	0.89	0.54-1.46	0.644
Model 6 (Multivarijabilni)	CYP19A1 LL genotip	0.93	0.51-1.71	0.816
	MAP (mmHg)	0.99	0.91-1.04	0.68
	Dob (godine)	0.99	0.97-1.02	0.557
	BMI (kg/m^2)	0.94	0.77-1.14	0.518
	Muški spol	0.84	0.52-1.36	0.476

Tablica 20 Modeli logističke regresije međusobnih kombinacija "rizičnih" alela

Model	Varijabla	OR	CI	p
ER/AR	ESR1 LL/AR non LL	2.08	0.95-4.55	0.066
ER/CYP	ESR1 LL/CYP19A1 LL	1.73	0.59-5.05	0.321
AR/CYP	AR non LL/ CYP19A1 LL	1.17	0.56-2.47	0.678
ER/AR/CYP	ESR1 LL/AR non LL/ CYP19A1 LL	2.61	0.72-9.44	0.144

Slika 8 Omjeri izgleda za FA za pojedine varijable prema binarnoj logističkoj regresiji



6. RASPRAVA

Glavni rezultat

Genotip ESR1 sa više od 21 (TA)n češći je u osoba s izoliranom FA nego kod zdravih ispitanika. Nakon analize po spolu vidljiva je izrazita razlika kod muškaraca dok kod žena razlika u distribuciji ovog genotipa nije statistički značajna. Kod muškaraca sa homozigotnom kombinacijom (TA)n>21 veća je prevalencija izolirane FA nego kod drugih alelnih kombinacija. Nije bilo statistički značajnih razlika u distribuciji promatranih polimorfizama AR i CYP19A1.

Na učinjenoj binarnoj logističkoj regresiji ESR1 (TA)n polimorfizam se pokazao kao neovisni prediktor izolirane FA. Nije nađena međusobna povezanost promatranih polimorfizama gena ESR1, AR i CYP19A1.

Moguća objašnjena

Provedeno istraživanje sugerira pozitivnu povezanost između broja (TA)n ponavljanja u promotorskoj regiji gena ESR1 i prevalencije izolirane FA. Značajnost navedene povezanosti nakon korekcije prema dobi, spolu, BMI i MAP ukazuje na činjenicu da je učinak polimorfizma neovisan o navedenim čimbenicima.

Estrogeni vrše temeljne funkcije kod oba spola, uključujući modulaciju imunološkog odgovora, oksidativnog stresa, upale, staničnog rasta, proliferacije i apoptoze te utječu na središnji živčani, kardiovaskularni i koštani sustav (101, 327). Njihova ekstragonadalna produkcija, kao i njihovi lokalni učinci, dokazani su u srcu i krvnim žilama žena, kao i muškaraca, gdje nastaju konverzijom androgena pomoću aromataze (328).

Mogući mehanizam preko kojeg spolni hormoni utječu na srčanu elektrofiziologiju uključuju njihov učinak na nuklearne i membranske receptore u kardiomiocitima (329-331), moduliranje ekspresije gena preko sustava drugih glasnika (332), ali i vršenjem negenomskih radnji poput utjecaja na provodljivost ionskih kanala i mijenjanjem staničnog potencijala (333).

(TA)n jedan je od mnogih polimorfizama ESR1 gena (165), a njihova fenotipska ekspresija je suptilna (334). Molekularni mehanizam preko kojeg bi (TA)n polimorfizam mogao utjecati na FA je nejasan. Tri su moguća načina na koji polimorfizmi gena utječu na njihovu funkciju: kvalitativni (mutacija koja se zbiva u egzonu dotičnog gena), kvantitativni (mutacija koja se zbiva na bilo kojem regulatornom elementu dotičnog gena, npr. promotorska regija) ili povezanost s nekom drugom mutacijom koja ima neposredni učinak na bolest (335). ESR1 posjeduje vrlo kompleksnu genomsku organizaciju sadržavajući nekoliko promotorskih regija s alternativnim mjestima spajanja (eng. splice sites), iz kojih proizlaze ekspresije alternativnih prvih egzona i različitih ER-α transkripata (336). Budući da se promatrani polimorfizam ne nalazi u kodirajućoj regiji ESR1, kvalitativni utjecaj nije moguć. Kvantitativno, broj (TA)n dinukleotida može imati utjecaj na korištenje alternativnih promotora, što rezultira različitom ekspresijom ER-α u određenim tkivima (335). Nadalje, otprilike 200 pb nizvodno od (TA)n regije nalazi se regulatorni element koji povećava transkripciju ESR1 te, čini se, djeluje kao element koji odgovara na steroide (eng. steroid response element) (337). Iako uloga ovog elementa još uvijek nije jasna, njegova blizina u odnosu na polimorfnu (TA)n regiju čini ga potencijalnim čimbenikom funkcijskih utjecaja broja (TA)n dinukleotida. U obzir dolazi i mogućnost da broj (TA)n dinukleotida ne utječe na srce izravno, već

preko neravnoteže povezanosti gena (eng. linkage disequilibrium) s drugim kodirajućim regijama.

Kod žena s izoliranom FA manje je zastupljen LL genotip ((CAG)21-34) AR nego kod zdravih žena, iako se razlika nije pokazala statistički značajnom (p=0.056). Za napomenuti je da je broj žena u istraživanju bio manji nego broj muškaraca te da je statistička snaga testa (60%) premala za adekvatnu interpretaciju tog rezultata s obzirom na povećanu vjerojatnost pogreške tipa 2. S obzirom na dosada dokazanu obrnuto proporcionalnu vezu duljine regije trinukleotidnih (CAG)n ponavljanja i ekspresije i aktivnosti AR (149-150) te potencijalnu ulogu u lokalnoj ravnoteži učinaka estrogena i androgena i protuupalnu aktivnost androgena (338), ovakva bi tendencija mogla biti temelj budućih istraživanja navedenog polimorfizma kod većeg broja žena s izoliranom FA.

U provedenom istraživanju nije nađeno dokaza o ulozi (TTTA)n polimorfizma gena CYP19A1 u izoliranoj FA.

Usporedba s dosadašnjim studijama

Elektrofiziološka istraživanja polimorfizama gena receptora spolnih hormona do sada su se provodila uglavnom na ventrikulskim, a ne atrijskim aritmijama. Prema do sada objavljenoj literaturi, ovo je tek drugo istraživanje utjecaja (TA)n polimorfizma ESR1 gena na FA te prvo koje proučava utjecaj polimorfizma AR gena i CYP19A1 gena na FA uz jedan rad koji se bavio proučavanjem razina estrogena i testosterona u izoliranoj FA (109). Dokazane su smanjene razine testosterona kod ispitanika s FA i jednake razine estradiola. Što se tiče polimorfizama gena hormonskih receptora, do sada je dokazana pozitivna korelacija između homozigota s alelima koji posjeduju

broj (TA)n ponavljanja veći od 17 (339). Istraživanja u drugim područjima pokazala su da geni s većim brojem (TA)n ponavljanja produciraju kemijski manje aktivne estrogenske receptore, što se podudara s ovdje dobivenim rezultatima (340-341).

Prednosti i nedostaci istraživanja

Provedeno istraživanje ima nekoliko limitirajućih čimbenika. Proučavan je samo (TA)n polimorfizam ESR1 gena. Moguće je da drugi polimorfizmi istog gena ili polimorfizmi gena ESR2 također igraju ulogu u patogenezi izolirane FA. Također su proučavani samo (CAG)n polimorfizam AR gena i (TTTA)n gena CYP19A1 koji, iako najistraženiji do sada i s najjačim dokumentiranim kliničkim učinkom, su jedni od mnogih polimorfizama navedenih gena.

U obzir nisu uzete ni vrijednosti cirkulirajućih spolnih hormona, njihova lokalna koncentracija niti koncentracija proteina plazme za koje se vežu spolni hormoni. Razlozi za to su višestruki. Bilo bi nemoguće uspoređivati estrogene i androgene između dva suprotna spola, koncentracije spolnih hormona mjenjaju se i za jedan red veličine tijekom menstrualnog ciklusa žena (342), a lokalne koncentracije bilo bi gotovo nemoguće odrediti praktično. Niti jedan ispitanik nije imao kliničku sliku hipogonadizma, a žene u reproduktivnoj dobi imale su normalne menstruacijske cikluse. Kod muškaraca je negatina povratna sprega s LH i FSH primarno određena androgenima, a kod žena estrogenima i progestronom, a koncentracije estrogena kod muškaraca i androgena kod žena reguliraju se pasivno - kod muškaraca brzinom aromataze, a kod žena aktivnošću kore nadbubrežne žlijezde (342). Naposljetku, iako navedeni čimbenici imaju moguć utjecaj na rezultat istraživanja, njegova bi distribucija trebala biti ravnomjerna kod bolesnika i kontrola.

Sustav spolnih hormona kod ljudi vrlo je složen te obuhvaća mnogo enzima koji nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem npr. 5-alfa reduktaza odnosno polimorfizmi njezinog gena, kao ni drugi polimorfizmi brojnih enzima steroidogeneze. Značajni defekti na toj razini dali bi međutim izraženiju kliničku sliku.

Točan molekularni mehanizm kojim bi spolni hormoni utjecali na FA je nepoznat. Ta činjenica otežava pravilnu interpretaciju rezultata ne samo ovog već i srodnih istraživanja. Zaključci se stoga mogu svesti samo na moguću povezanost, a ne na uzročno-posljedičnu vezu između polimorfizama receptora spolnih hormona i FA.

Broj ispitanika u istraživanjima utjecaja polimorfizama gena obično je nekoliko stotina do nekoliko tisuća, i do stotinu tisuća ako uračunamo genomska istraživanja (GWAS). Postavlja se pitanje koliko je ovih 117 bolesnika reprezentativno za izoliranu FA. Prevalencija FA je oko 2000 bolesnika na 100,000 populacije u SAD-u i zemljama zapadne Europe (343). Prema do sada objavljenim epidemiološkim podacima, oko 2% svih slučajeva FA odnosi se na izoliranu FA (343). Kada bi primijenili te podatke na hrvatsku polulaciju, procjenjujemo da u Republici Hrvatskoj ima oko 1800 bolesnika s izoliranom FA. Prema toj procjeni, uzorak od 117 bolesnika bio bi dovoljno velik za donošenje zaključaka o povezanosti. Statistička snaga testova korištenih na cijelom uzorku bila je dovoljna za detekciju srednje velikih do velikih učinaka, no možda nije bila dostatna za opažanje malih učinaka.

Značenje rezultata

Rezultati ovog istraživanja donose nove spoznaje o ulozi spolnih hormona u izoliranoj FA te pridonose stvaranju novih hipoteza. Da bi se veza između broja (TA)n dinukleotidnih ponavljanja te kvalitete i kvantitete ER-α transkripata s jedne strane i

prevalencije izolirane FA s druge strane mogla cjelovito i pouzdano istražiti, potrebna su istraživanja na velikom broju ispitanika i u različitim populacijama. Također su potrebna istraživanja na molekularnoj razini za daljnje rasvjetljavanje uloge receptora spolnih hormona u izoliranoj FA. Osim registrirane povezanosti (TA)n polimorfizma ESR1 gena, dobar kandidat za daljnja istraživanja je i (CAG)n polimorfizam AR gena kod žena s izoliranom FA.

7. ZAKLJUČAK

Postoji pozitivna povezanost između broja dinukleotidnis ponavljanja (TA)n polimorfizma ESR1 gena s izoliranom FA kod muškaraca. Ta povezanost mogla bi upućivati na ulogu estrogena i njihovih receptora u patofiziologiji FA. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika te istraživanja na molekularnoj razini kako bi se ta uloga razjasnila i iskoristila kao potencijalna metoda liječenja.

8. SAŽETAK

Uvod: Prema do sada objavljenoj literaturi, postoje naznake da bi polimorfizmi estrogenskog receptora mogli biti povezani s izoliranom FA. S obzirom na njihovu biološku ulogu i povezanost, moguće je da i polimorfizmi drugih receptora odnosno enzima igraju ulogu u izoliranoj FA.

Cilj: Analizirati povezanost genotipa s obzirom na polimorfizme (TA)n ESR1, (CAG)n AR i (TTTA)n CYP19A1 s pojavom izolirane fibrilacije atrija u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ispitanici i metode: U ovoj studiji parova sudjelovalo je 117 bolesnika s izoliranom FA i 197 zdravih ispitanika koji su služili kao kontrole. Glavni kriterij uključivanja u skupinu bolesnika s izoliranom FA bila je elektrokardiografski dokumentirana epizoda FA, bez poznatih etioloških čimbenika za FA (tj. arterijska hipertenzija, srčano popuštanje, bolest srčanih zalistaka, kardiomiopatija, kongenitalne srčane greške, koronarna bolest, bolest štitnjače, pretilost, šećerna bolest, kronična opstruktivna bolest pluća, apneja u spavanju i kronična bolest bubrega). Iz ispitivanja su isključeni bolesnici pušači te korisnici alkohola i droga. Kontrolnu su skupinu činili zdravi zaposlenici KBC-a Zagreb podvrgnuti sistematskom pregledu, kao i drugi zdravi korisnici usluga KBC-a Zagreb (npr. darivatelji koštane srži) sa zdravim srcima i normalnim elektrokardiogramima. Svim ispitanicima izvađeno je 5 ml krvi iz periferne vene te im je iz leukocita izolirana genomska DNA. Određivanje genotipa učinjeno je pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) sa obilježenim prednjim i neobilježenim reverznim primerima. Nakon amplifikacije, produkti PCR podvrgnuti su elektroforezi na gelu od 6% poliakrilamida u automatiziranom uređaju za sekvencioniranje.

Određivanje alela učinjeno je pomoću računalnog programa. Genotipizacija je provedena od strane laboratorijskog osoblja kojima nije bio poznat status ispitanika s obzirom na izoliranu FA. Mann–Whitney U test korišten je za uspoređivanje razlika između bolesnika i kontrola za kontinuirane varijable, a za kategorijske varijable korišten je $\chi 2$ test. Svi polimorfizmi analizirani su isprva zasebno, prema broju ponavljanja polinukleotidnih sekvencija, a potom su razmatrani kao kombinacije alela. Povezanost pojedinih genotipova s FA, analizirana je pomoću binarne logističke regresije; načinjeni su modeli s FA kao ishodom za svaki pojedini gen. Za sve analize, $p<0.05$ (double-sided) smatran je signifikantnim.

Rezultati: Nakon rangiranja prema spolu, po broju dinukleotidnih ponavljanja, zamjetna je veća zastupljenost duljih alela ((TA)n>21) u skupini bolesnika s FA koja se nakon raščlanjivanja po spolu jasno može pripisati muškarcima s FA, 43.1% vs. 33%, p=0.012. Osim toga, potvrđena je i povećana učestalost haplotipova s kombinacijom dviju "dugih" alela u skupini muškaraca s FA, 19.2% vs. 7.6%, p=0.021. Prilikom analize haplotipova gena androgenog receptora, primjećen je manji udio LL genotipa ((CAGn<22)) kod žena s FA u odnosu na zdrave kontrole, rezultat međutim nije statistički značajan. Nije nađeno razlika u distribuciji (TTTA)n polimorfizma CYP19A1 gena između skupine s FA i kontrolne skupine. Prema rezultatima binarne logističke regresije, nosioci ESR1 LL genotipa izvrgnuti su dvostruko većem riziku FA od ostalih ispitanika, OR=2.05, CI=1.06-3.95, p=0.032. Nakon što su u modele su uključene i ostale varijable: krvni tlak (MAP u mmHg), starost ispitanika (u godinama), indeks tjelesne mase (BMI u kg/m^2) te muški spol (1-da, 0-ne). ESR1 LL genotip ostao je signifikantan prediktor bez značajne promjene rizika.

Zaključak: Postoji pozitivna povezanost između broja dinukleotidnis ponavljanja (TA)n polimorfizma ESR1 gena s izoliranom FA kod muškaraca. Ta povezanost mogla bi upućivati na ulogu estrogena i njihovih receptora u patofiziologiji FA. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika te istraživanja na molekularnoj razini kako bi se ta uloga razjasnila i iskoristila kao potencijalna metoda liječenja.

Ključne riječi: izolirana fibrilacija atrija; estrogenski receptor alfa, androgeni receptor, aromataza, genski polimorfizmi.

9. SUMMARY

Genetic polymorphisms of the estrogen receptor alpha, androgen recptor, and aromatase in lone atrial fibrillation

Karlo Golubić, 2013

Introduction: According to published data, there could be an association between polymorphisms of the estrogen receptor gene and lone atrial fibrillation. Considering their biological role and connection, it is possible that polymorphisms of other sex hormone receptors and enzymes involved in sex hormone metabolism could also be associated with lone atrial fibrillation.

Aim: To establish whether there is an association between the (TA)n ESR1, (CAG)n AR as well as (TTTA)n CYP19A1 polymorphisms and the prevalence of lone atrial fibrillation (AF).

Methods: We conducted a case-controlled study involving 117 patients with lone AF and 197 healthy controls. The main inclusion criterion for the lone AF group was an electrocardiographically (ECG) documented episode of AF, without known etiological factors (i.e. arterial hypertension, heart failure, valve disease, cardiomyopathy, congenital heart defects, coronary disease, thyroid disease, obesity, diabetes, chronic obstructive lung disease, sleep apnea and chronic renal disease). Patient with a history of smoking, alcohol and drug abuse were excluded from the study. The control group consisted of healthy employees of the university hospital center Zagreb who have undergone preemptive examination, as well as other healthy clients of the center (e.g. bone marrow donors) with healthy hearts and normal ECGs. All

participants had 5 ml of blood drawn from a peripheral vein, and genomic DNA was extracted from their leukocytes. The genotype was determent by PCR with labeled forward and unlabeled reverse primers. After the amplification, the PCR products were run on a 6% polyacrylamide gel in an automated sequencer. Assignment of alleles was performed using computer software. The determination of genotype was performed by laboratory personnel blinded to participant status regarding AF. Mann–Whitney U test was conducted to compare the differences between cases and controls in continuous variables and $\chi 2$ test for categorical variables. All polymorphisms were analyzed at first separately, then according to groups of similar numbers of polynucleotide repeats, and at last as genotype combinations. To assess the association of genotype with AF, binary logistic regression models were built with AF as outcome for each polymorphism. For all analyses, a double-sided $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results: After ranking by sex, and number of dinucleotide repeats, an increased frequency of "long" alleles ((TA)n>21) was registered in the AF group which was entirely driven by the male sex, 43.1% vs. 33%, p=0.012. Furthermore, there was an increased frequency of haplotypes with the combination of two "long" alleles in the AF group of men, 19.2% vs. 7.6%, p=0.021. There was also decreased frequency of the LL genotype ((CAGn<22)) in women with AF compared to the control group, albeit the result is not statistically significant. There were no differences in distribution of the (TTTA)n polymorphism of the CYP19A1 gene between the AF and the control group. According to the results of the binary logistic regression, carriers of the ESR1 LL genotype were twice as likely to develop AF compared to controls, OR=2.05, CI=1.06-3.95, p=0.032. When adjustment was made for age, sex, BMI, and blood

pressure were added, the observed association remained statistically significant and its magnitude did not change.

Conclusions: There is a positive association between the number of (TA)n repeats of the ESR1 gene and lone AF in men. This association could indicate a role of estrogen and its receptors in the pathophysiology of AF. Large-scale studies conducted in different populations are required to more comprehensively and reliably assess the relationship of (TA)n length with the quantity and quality of ER-α transcripts, and the occurrence of AF, and perhaps use its curative potential.

Key words: lone atrial fibrillation; estrogen receptor alpha; androgen receptor; aromatase; genetic polymorphism.

10. LITERATURA

1. Campuzano O, Brugada R. Genetics of familial atrial fibrillation. Europace. 2009;11(10):1267-71.
2. Kannel WB, Benjamin EJ. Current perceptions of the epidemiology of atrial fibrillation. Cardiol Clin. 2009;27(1):13-24, vii.
3. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2010;31(19):2369-429.
4. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. Heart. 2001;86(5):516-21.
5. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. JAMA. 2001;285(18):2370-5.
6. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. Eur Heart J. 2006;27(8):949-53.
7. Naccarelli GV, Varker H, Lin J, Schulman KL. Increasing prevalence of atrial fibrillation and flutter in the United States. Am J Cardiol. 2009;104(11):1534-9.
8. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. Circulation. 2004;110(9):1042-6.
9. Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, et al. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: recommendations from a consensus conference organized by the German Atrial Fibrillation Competence NETwork and the European Heart Rhythm Association. Europace. 2007;9(11):1006-23.
10. Hylek EM, Go AS, Chang Y, Jensvold NG, Henault LE, Selby JV, et al. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. N Engl J Med. 2003;349(11):1019-26.
11. Knecht S, Oelschlager C, Duning T, Lohmann H, Albers J, Stehling C, et al. Atrial fibrillation in stroke-free patients is associated with memory impairment and hippocampal atrophy. Eur Heart J. 2008;29(17):2125-32.
12. Friberg L, Hammar N, Rosenqvist M. Stroke in paroxysmal atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort of Atrial Fibrillation. Eur Heart J. 2010;31(8):967-75.
13. Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. Am J Med. 2006;119(5):448 e1-19.
14. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. Physiol Rev. 2011;91(1):265-325.
15. Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, et al. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. Circulation. 1996;94(7):1600-6.
16. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. Circulation. 1997;96(4):1180-4.
17. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. N Engl J Med. 1998;339(10):659-66.
18. Nieuwlaat R, Capucci A, Camm AJ, Olsson SB, Andresen D, Davies DW, et al. Atrial fibrillation management: a prospective survey in ESC member countries: the Euro Heart Survey on Atrial Fibrillation. Eur Heart J. 2005;26(22):2422-34.
19. Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, et al. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. Europace. 2009;11(4):423-34.

20. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation. 2006;113(14):1807-16.
21. Goette A, Bukowska A, Dobrev D, Pfeiffenberger J, Morawietz H, Strugala D, et al. Acute atrial tachyarrhythmia induces angiotensin II type 1 receptor-mediated oxidative stress and microvascular flow abnormalities in the ventricles. Eur Heart J. 2009;30(11):1411-20.
22. Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR, Jr., Ilstrup DM, et al. The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. N Engl J Med. 1987;317(11):669-74.
23. Brand FN, Abbott RD, Kannel WB, Wolf PA. Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30-year follow-up in the Framingham Study. JAMA. 1985;254(24):3449-53.
24. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, et al. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. JAMA. 2004;291(23):2851-5.
25. Kirchhof P, Bax J, Blomstrom-Lundquist C, Calkins H, Camm AJ, Cappato R, et al. Early and comprehensive management of atrial fibrillation: executive summary of the proceedings from the 2nd AFNET-EHRA consensus conference 'research perspectives in AF'. Eur Heart J. 2009;30(24):2969-77c.
26. Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, Heublein DM, Darbar D, Herron KJ, et al. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. N Engl J Med. 2008;359(2):158-65.
27. Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hebert TE, Nattel S. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. Cardiovasc Res. 2005;67(3):520-8.
28. Ravn LS, Benn M, Nordestgaard BG, Sethi AA, Agerholm-Larsen B, Jensen GB, et al. Angiotensinogen and ACE gene polymorphisms and risk of atrial fibrillation in the general population. Pharmacogenet Genomics. 2008;18(6):525-33.
29. Henningsen KM, Olesen MS, Pedersen M, Nielsen L, Haunso S, Bruunsgaard H, et al. Single nucleotide polymorphisms in inflammatory genes and the risk of early onset of lone atrial fibrillation. Inflamm Res. 2010;59(11):965-9.
30. Juang JM, Chern YR, Tsai CT, Chiang FT, Lin JL, Hwang JJ, et al. The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. Int J Cardiol. 2007;116(1):107-12.
31. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell. 1995;80(5):805-11.
32. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. Nat Rev Cardiol. 2009;6(5):337-48.
33. Napolitano C, Rivolta I, Priori SG. Cardiac sodium channel diseases. Clin Chem Lab Med. 2003;41(4):439-44.
34. Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. JAMA. 2005;293(4):447-54.
35. Ellinor PT, Nam EG, Shea MA, Milan DJ, Ruskin JN, MacRae CA. Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2008;5(1):99-105.
36. Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, et al. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. Circulation. 2008;117(15):1927-35.
37. Makiyama T, Akao M, Shizuta S, Doi T, Nishiyama K, Oka Y, et al. A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2008;52(16):1326-34.

38. Li Q, Huang H, Liu G, Lam K, Rutberg J, Green MS, et al. Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. Biochem Biophys Res Commun. 2009;380(1):132-7.
39. Chen LY, Ballew JD, Herron KJ, Rodeheffer RJ, Olson TM. A common polymorphism in SCN5A is associated with lone atrial fibrillation. Clin Pharmacol Ther. 2007;81(1):35-41.
40. Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, Jiramongkolchai K, Chopra S, Donahue BS, et al. Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009;2(3):268-75.
41. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet. 1996;12(1):17-23.
42. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. Science. 2003;299(5604):251-4.
43. Das S, Makino S, Melman YF, Shea MA, Goyal SB, Rosenzweig A, et al. Mutation in the S3 segment of KCNQ1 results in familial lone atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2009;6(8):1146-53.
44. Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, Olesen SP, Schmitt N. KCNQ1 mutation Q147R is associated with atrial fibrillation and prolonged QT interval. Heart Rhythm. 2007;4(12):1532-41.
45. Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, et al. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. Am J Hum Genet. 2004;75(5):899-905.
46. Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332(4):1012-9.
47. Ravn LS, Aizawa Y, Pollevick GD, Hofman-Bang J, Cordeiro JM, Dixen U, et al. Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2008;5(3):427-35.
48. Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, et al. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. Hum Mol Genet. 2006;15(14):2185-91.
49. Yang Y, Li J, Lin X, Hong K, Wang L, Liu J, et al. Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. J Hum Genet. 2009;54(5):277-83.
50. Yang T, Yang P, Roden DM, Darbar D. Novel KCNA5 mutation implicates tyrosine kinase signaling in human atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2010;7(9):1246-52.
51. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. N Engl J Med. 2006;354(25):2677-88.
52. Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BP, Doevendans PA, et al. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. Circ Res. 2004;95(4):e29-33.
53. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, et al. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. N Engl J Med. 1997;336(13):905-11.
54. Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae CA. Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. Circulation. 2003;107(23):2880-3.
55. Darbar D, Hardy A, Haines JL, Roden DM. Prolonged signal-averaged P-wave duration as an intermediate phenotype for familial atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2008;51(11):1083-9.
56. Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadottir A, Gretarsdottir S, Holm H, Sigurdsson A, et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. Nature. 2007;448(7151):353-7.
57. Lubitz SA, Sinner MF, Lunetta KL, Makino S, Pfeufer A, Rahman R, et al. Independent susceptibility markers for atrial fibrillation on chromosome 4q25. Circulation. 2010;122(10):976-84.
58. Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, et al. A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. Nat Genet. 2009;41(8):876-8.
59. Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. Nat Genet. 2010;42(3):240-4.

60. Zhang X, Chen S, Yoo S, Chakrabarti S, Zhang T, Ke T, et al. Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. Cell. 2008;135(6):1017-27.
61. Wolf L. Familial auricular fibrillation. N Engl J Med. 1943;229:396–7.
62. Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, Jahangir A, Gersh BJ, Shen WK, et al. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. J Am Coll Cardiol. 2003;41(12):2185-92.
63. Lemmens R, Hermans S, Nuyens D, Thijs V. Genetics of atrial fibrillation and possible implications for ischemic stroke. Stroke Res Treat. 2011;2011:208694.
64. Ellinor PT, Moore RK, Patton KK, Ruskin JN, Pollak MR, Macrae CA. Mutations in the long QT gene, KCNQ1, are an uncommon cause of atrial fibrillation. Heart. 2004;90(12):1487-8.
65. Ellinor PT, Petrov-Kondratov VI, Zakharova E, Nam EG, MacRae CA. Potassium channel gene mutations rarely cause atrial fibrillation. BMC Med Genet. 2006;7:70.
66. Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. Circulation. 1999;99(11):1508-15.
67. Thibodeau IL, Xu J, Li Q, Liu G, Lam K, Veinot JP, et al. Paradigm of genetic mosaicism and lone atrial fibrillation: physiological characterization of a connexin 43-deletion mutant identified from atrial tissue. Circulation. 2010;122(3):236-44.
68. Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, et al. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest. 2002;109(3):357-62.
69. Ellinor PT, Yoerger DM, Ruskin JN, MacRae CA. Familial aggregation in lone atrial fibrillation. Hum Genet. 2005;118(2):179-84.
70. Christophersen IE, Ravn LS, Budtz-Joergensen E, Skytthe A, Haunsoe S, Svendsen JH, et al. Familial aggregation of atrial fibrillation: a study in Danish twins. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009;2(4):378-83.
71. Zeng Z, Tan C, Teng S, Chen J, Su S, Zhou X, et al. The single nucleotide polymorphisms of I(Ks) potassium channel genes and their association with atrial fibrillation in a Chinese population. Cardiology. 2007;108(2):97-103.
72. Fatini C, Sticchi E, Genuardi M, Sofi F, Gensini F, Gori AM, et al. Analysis of minK and eNOS genes as candidate loci for predisposition to non-valvular atrial fibrillation. Eur Heart J. 2006;27(14):1712-8.
73. Lai LP, Su MJ, Yeh HM, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, et al. Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. Am Heart J. 2002;144(3):485-90.
74. Prystupa A, Dzida G, Myslinski W, Malaj G, Lorenc T. MinK gene polymorphism in the pathogenesis of lone atrial fibrillation. Kardiol Pol. 2006;64(11):1205-11; discussion 12-3.
75. Ravn LS, Hofman-Bang J, Dixen U, Larsen SO, Jensen G, Haunso S, et al. Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. Am J Cardiol. 2005;96(3):405-7.
76. Kato K, Oguri M, Hibino T, Yajima K, Matsuo H, Segawa T, et al. Genetic factors for lone atrial fibrillation. Int J Mol Med. 2007;19(6):933-9.
77. Tsai CT, Lai LP, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Ritchie MD, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. Circulation. 2004;109(13):1640-6.
78. Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di Castelnuovo A, Nasso G, Burzotta F, et al. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? Circulation. 2003;108 Suppl 1:II195-9.
79. Poli D, Antonucci E, Cecchi E, Betti I, Valdre L, Mugnaini C, et al. Thrombophilic mutations in high-risk atrial fibrillation patients: high prevalence of prothrombin gene G20210A polymorphism and lack of correlation with thromboembolism. Thromb Haemost. 2003;90(6):1158-62.

80. Nyberg MT, Stoevring B, Behr ER, Ravn LS, McKenna WJ, Christiansen M. The variation of the sarcolipin gene (SLN) in atrial fibrillation, long QT syndrome and sudden arrhythmic death syndrome. Clin Chim Acta. 2007;375(1-2):87-91.
81. Schreieck J, Dostal S, von Beckerath N, Wacker A, Flory M, Weyerbrock S, et al. C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene and atrial fibrillation: association of the TT genotype with a reduced risk for atrial fibrillation. Am Heart J. 2004;148(3):545-50.
82. Asselbergs FW, Moore JH, van den Berg MP, Rimm EB, de Boer RA, Dullaart RP, et al. A role for CETP TaqIB polymorphism in determining susceptibility to atrial fibrillation: a nested case control study. BMC Med Genet. 2006;7:39.
83. Bedi M, McNamara D, London B, Schwartzman D. Genetic susceptibility to atrial fibrillation in patients with congestive heart failure. Heart Rhythm. 2006;3(7):808-12.
84. Sinner MF, Pfeufer A, Akyol M, Beckmann BM, Hinterseer M, Wacker A, et al. The non-synonymous coding IKr-channel variant KCNH2-K897T is associated with atrial fibrillation: results from a systematic candidate gene-based analysis of KCNH2 (HERG). Eur Heart J. 2008;29(7):907-14.
85. Xiao P, Ling Z, Woo K, Du H, Su L, Liu Z, et al. Renin-angiotensin system-related gene polymorphisms are associated with risk of atrial fibrillation. Am Heart J. 2010;160(3):496-505.
86. Liu T, Korantzopoulos P, Xu G, Shehata M, Li D, Wang X, et al. Association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and atrial fibrillation: a meta-analysis. Europace. 2011;13(3):346-54.
87. Sinner MF, Lubitz SA, Pfeufer A, Makino S, Beckmann BM, Lunetta KL, et al. Lack of replication in polymorphisms reported to be associated with atrial fibrillation. Heart Rhythm. 2011;8(3):403-9.
88. Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, de Gier-de Vries C, Harvey RP, Moorman AF, et al. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. Circ Res. 2007;101(9):902-9.
89. Kaab S, Darbar D, van Noord C, Dupuis J, Pfeufer A, Newton-Cheh C, et al. Large scale replication and meta-analysis of variants on chromosome 4q25 associated with atrial fibrillation. Eur Heart J. 2009;30(7):813-9.
90. Yang PC, Kurokawa J, Furukawa T, Clancy CE. Acute effects of sex steroid hormones on susceptibility to cardiac arrhythmias: a simulation study. PLoS Comput Biol. 2010;6(1):e1000658.
91. Abi-Gerges N, Philp K, Pollard C, Wakefield I, Hammond TG, Valentin JP. Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes. Fundam Clin Pharmacol. 2004;18(2):139-51.
92. Pham TV, Rosen MR. Sex, hormones, and repolarization. Cardiovasc Res. 2002;53(3):740-51.
93. James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. Prog Biophys Mol Biol. 2007;94(3):265-319.
94. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. Can J Cardiol. 1992;8(7):690-5.
95. Stramba-Badiale M, Spagnolo D, Bosi G, Schwartz PJ. Are gender differences in QTc present at birth? MISNES Investigators. Multicenter Italian Study on Neonatal Electrocardiography and Sudden Infant Death Syndrome. Am J Cardiol. 1995;75(17):1277-8.
96. Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, et al. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. Circulation. 1998;97(22):2237-44.
97. Otsuki M, Gao H, Dahlman-Wright K, Ohlsson C, Eguchi N, Urade Y, et al. Specific regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart by estrogen receptor beta. Mol Endocrinol. 2003;17(9):1844-55.
98. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(8):4686-91.
99. Behl C, Holsboer F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. Trends Pharmacol Sci. 1999;20(11):441-4.

100. Furukawa T, Kurokawa J. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. Pharmacol Ther. 2007;115(1):106-15.
101. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. Science. 2005;308(5728):1583-7.
102. Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. Circulation. 2005;112(12):1701-10.
103. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, Oren RV, et al. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. Circulation. 2007;116(25):2913-22.
104. Asada K, Kurokawa J, Furukawa T. Redox- and calmodulin-dependent S-nitrosylation of the KCNQ1 channel. J Biol Chem. 2009;284(9):6014-20.
105. Gowda RM, Khan IA, Punukollu G, Vasavada BC, Sacchi TJ, Wilbur SL. Female preponderance in ibutilide-induced torsade de pointes. Int J Cardiol. 2004;95(2-3):219-22.
106. Gowd BM, Thompson PD. Effect of female sex on cardiac arrhythmias. Cardiol Rev. 2012;20(6):297-303.
107. Perez MV, Wang PJ, Larson JC, Virnig BA, Cochrane B, Curb JD, et al. Effects of postmenopausal hormone therapy on incident atrial fibrillation: the Women's Health Initiative randomized controlled trials. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012;5(6):1108-16.
108. Eby G. Testosterone as an atrial fibrillation treatment and stroke preventative in aging men: case histories and hypothesis. Med Hypotheses. 2010;75(2):269-70.
109. Lai J, Zhou D, Xia S, Shang Y, Want L, Zheng L, et al. Reduced testosterone levels in males with lone atrial fibrillation. Clin Cardiol. 2009;32(1):43-6.
110. Liu T, Shehata M, Li G, Wang X. Androgens and atrial fibrillation: friends or foes? Int J Cardiol. 2010;145(2):365-7.
111. Tsuneda T, Yamashita T, Kato T, Sekiguchi A, Sagara K, Sawada H, et al. Deficiency of testosterone associates with the substrate of atrial fibrillation in the rat model. J Cardiovasc Electrophysiol. 2009;20(9):1055-60.
112. Lau DH, Stiles MK, John B, Shashidhar, Young GD, Sanders P. Atrial fibrillation and anabolic steroid abuse. Int J Cardiol. 2007;117(2):e86-7.
113. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. Mol Cell Endocrinol. 2001;179(1-2):105-9.
114. Hiipakka RA, Liao S. Molecular mechanism of androgen action. Trends Endocrinol Metab. 1998;9(8):317-24.
115. McPhaul MJ, Young M. Complexities of androgen action. J Am Acad Dermatol. 2001;45(3 Suppl):S87-94.
116. Breiner M, Romalo G, Schweikert HU. Inhibition of androgen receptor binding by natural and synthetic steroids in cultured human genital skin fibroblasts. Klin Wochenschr. 1986;64(16):732-7.
117. Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL, et al. In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchiectomized male rabbits. Cardiovasc Res. 2003;57(1):28-36.
118. Malkin CJ, Morris PD, Pugh PJ, English KM, Channer KS. Effect of testosterone therapy on QT dispersion in men with heart failure. Am J Cardiol. 2003;92(10):1241-3.
119. Pham TV, Sosunov EA, Gainullin RZ, Danilo P, Jr., Rosen MR. Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I(K)-blocking drugs. Circulation. 2001;103(17):2207-12.
120. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, Greenhut SF. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. Steroids. 2002;67(3-4):151-8.
121. Allan CA, McLachlan RI. Age-related changes in testosterone and the role of replacement therapy in older men. Clin Endocrinol (Oxf). 2004;60(6):653-70.

122. Pham TV, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Danilo P, Jr., Rosen MR. Testosterone diminishes the proarrhythmic effects of dofetilide in normal female rabbits. Circulation. 2002;106(16):2132-6.
123. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. Pharmacol Rev. 2006;58(4):782-97.
124. Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, et al. Regulation of androgen action. Vitam Horm. 1999;55:309-52.
125. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev. 2002;23(2):175-200.
126. Montgomery JS, Price DK, Figg WD. The androgen receptor gene and its influence on the development and progression of prostate cancer. J Pathol. 2001;195(2):138-46.
127. Rahman M, Miyamoto H, Chang C. Androgen receptor coregulators in prostate cancer: mechanisms and clinical implications. Clin Cancer Res. 2004;10(7):2208-19.
128. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. Endocr Rev. 1987;8(1):1-28.
129. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. Mol Endocrinol. 2002;16(10):2181-7.
130. Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, et al. Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. J Biol Chem. 2005;280(9):7786-92.
131. He B, Kemppainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. J Biol Chem. 1999;274(52):37219-25.
132. He B, Kemppainen JA, Wilson EM. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. J Biol Chem. 2000;275(30):22986-94.
133. Loy CJ, Sim KS, Yong EL. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(8):4562-7.
134. Veldscholte J, Berrevoets CA, Zegers ND, van der Kwast TH, Grootegoed JA, Mulder E. Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. Biochemistry. 1992;31(32):7422-30.
135. Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. Mol Endocrinol. 2000;14(10):1618-26.
136. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(6):813-27.
137. Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veyssiere G, et al. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. J Biol Chem. 2004;279(15):14579-86.
138. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. Front Neuroendocrinol. 2008;29(2):169-81.
139. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. Maturitas. 2009;63(2):142-8.
140. Detera-Wadleigh SD, Fanning TG. Phylogeny of the steroid receptor superfamily. Mol Phylogenet Evol. 1994;3(3):192-205.
141. Gu X. Early metazoan divergence was about 830 million years ago. J Mol Evol. 1998;47(3):369-71.
142. Gurel I, Livshits G. Phylogeny of vertebrate nuclear receptors--analysis of variance components in protein sequences. Coll Antropol. 2003;27(2):599-610.
143. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. Science. 1988;240(4850):324-6.

144. Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, et al. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1988;153(1):241-8.
145. Jiang M, Huhtaniemi I. Polymorphisms in androgen and estrogen receptor genes: effects on male aging. Exp Gerontol. 2004;39(11-12):1603-11.
146. Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. Mol Endocrinol. 1991;5(10):1396-404.
147. Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. J Biol Chem. 1991;266(1):510-8.
148. Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. J Mol Endocrinol. 1998;21(3):235-57.
149. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Res. 1994;22(15):3181-6.
150. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. Prostate. 2004;58(1):23-32.
151. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. J Clin Oncol. 2002;20(13):3001-15.
152. Mononen N, Ikonen T, Autio V, Rokman A, Matikainen MP, Tammela TL, et al. Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. Hum Genet. 2002;111(2):166-71.
153. Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, et al. Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. J Endocrinol. 1999;162(1):137-42.
154. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics. 1992;12(2):241-53.
155. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, von Eckardstein S, von Eckardstein A, et al. The CAG repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial vasoreactivity. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(10):4867-73.
156. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(11):3777-82.
157. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, Junker R, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males. Clin Endocrinol (Oxf). 2001;55(5):649-57.
158. Yaffe K, Edwards ER, Lui LY, Zmuda JM, Ferrell RE, Cauley JA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with cognitive function in older men. Biol Psychiatry. 2003;54(9):943-6.
159. Harkonen K, Huhtaniemi I, Makinen J, Hubler D, Irjala K, Koskenvuo M, et al. The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. Int J Androl. 2003;26(3):187-94.
160. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, et al. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. Hum Genet. 2002;110(2):122-9.
161. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J, et al. Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2003;141(2):91-6.
162. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. Cancer Res. 1982;42(8 Suppl):3342s-4s.
163. Mechoulam R, Brueggemeier RW, Denlinger DL. Estrogens in Insects. Experientia. 1984;40(9):942-4.
164. Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology : a cellular and molecular approach. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.

165. Figtree GA, Noonan JE, Bhindi R, Collins P. Estrogen receptor polymorphisms: significance to human physiology, disease and therapy. Recent Pat DNA Gene Seq. 2009;3(3):164-71.
166. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. Cardiovasc Res. 2002;53(3):709-19.
167. Murdoch FE, Gorski J. The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. Mol Cell Endocrinol. 1991;78(3):C103-8.
168. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. Cardiovasc Res. 1999;43(3):666-74.
169. Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. J Gen Physiol. 1997;110(2):135-40.
170. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. Hypertension. 2000;35(1):19-24.
171. Brosnihan KB, Weddle D, Anthony MS, Heise C, Li P, Ferrario CM. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. Journal of Hypertension. 1997;15(7):719-26.
172. Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen-Dependent Angiotensinogen and Renin Messenger-Rna Expression in Hypertensive Rats. Hypertension. 1992;19(5):456-63.
173. Gordon MS, Chin WW, Shupnik MA. Regulation of Angiotensinogen Gene-Expression by Estrogen. Journal of Hypertension. 1992;10(4):361-6.
174. Wheeler MA, Pontari M, Dokita S, Nishimoto T, Cho YH, Hong KW, et al. Age-dependent changes in particulate and soluble guanylyl cyclase activities in urinary tract smooth muscle. Mol Cell Biochem. 1997;169(1-2):115-24.
175. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular-Biology of the Renin-Angiotensin System. Circulation. 1993;87(6):1816-28.
176. Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. J Neurosci. 1996;16(2):595-604.
177. Pietras RJ, Szego CM. Specific Binding-Sites for Estrogen at Outer Surfaces of Isolated Endometrial Cells. Nature. 1977;265(5589):69-72.
178. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane Estrogen-Receptors Identified by Multiple Antibody Labeling and Impeded-Ligand Binding. Faseb J. 1995;9(5):404-10.
179. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HHQ, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. Genomics. 1998;47(2):310-3.
180. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science. 2005;307(5715):1625-30.
181. Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. Trends Endocrin Met. 2005;16(8):362-7.
182. Manavathi B, Kumar R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: Two sides of the coin. J Cell Physiol. 2006;207(3):594-604.
183. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. Molecular and Cellular Endocrinology. 2007;265:138-42.
184. Martensson UEA, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, et al. Deletion of the G Protein-Coupled Receptor 30 Impairs Glucose Tolerance, Reduces Bone Growth, Increases Blood Pressure, and Eliminates Estradiol-Stimulated Insulin Release in Female Mice. Endocrinology. 2009;150(2):687-98.
185. Ford J, Hajibeigi A, Long M, Hahner L, Gore C, Hsieh JT, et al. GPR30 Deficiency Causes Increased Bone Mass, Mineralization, and Growth Plate Proliferative Activity in Male Mice. Journal of Bone and Mineral Research. 2011;26(2):298-307.

186. Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 17-Beta-Estradiol Inhibits Ca2+ Influex and Ca2+ Release Induced by Thromboxane a(2) in Porcine Coronary-Artery. Circulation. 1995;91(10):2619-26.
187. Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AKM. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. J Physiol-London. 1997;499(2):497-511.
188. Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta - Role of nuclear estrogen receptor and Ca2+ uptake. Circulation Research. 1997;81(2):242-8.
189. Sitzler G, Lenz O, Kilter H, LaRosee K, Bohm M. Investigation of the negative inotropic effects of 17 beta-oestradiol in human isolated myocardial tissues. Brit J Pharmacol. 1996;119(1):43-8.
190. Jiang C, Poolewilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, Macleod KT. Effect of 17-Beta-Estradiol on Contraction, Ca-2+ Current and Intracellular Free Ca-2+ in Guinea-Pig Isolated Cardiac Myocytes. Brit J Pharmacol. 1992;106(3):739-45.
191. Eckstein N, Nadler E, Barnea O, Shavit G, Ayalon D. Acute Effects of 17-Beta-Estradiol on the Rat-Heart. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1994;171(3):844-8.
192. Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, et al. Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human I-Kr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. J Physiol-London. 2008;586(12):2961-73.
193. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the Estrogen-Receptor through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein-Kinase. Science. 1995;270(5241):1491-4.
194. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. Embo J. 2000;19(23):6341-50.
195. Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, Omalley BW. Dopaminergic and Ligand-Independent Activation of Steroid-Hormone Receptors. Science. 1991;254(5038):1636-9.
196. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(24):18447-53.
197. Ignartrowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, Mclachlan JA. Peptide Growth-Factors Elicit Estrogen Receptor-Dependent Transcriptional Activation of an Estrogen-Responsive Element. Molecular Endocrinology. 1993;7(8):992-8.
198. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. New Engl J Med. 1999;340(23):1801-11.
199. Simoncini T, Hafezl-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature. 2000;407(6803):538-41.
200. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology. 1997;138(3):863-70.
201. Kuiper GGJM, Enmark E, PeltoHuikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. P Natl Acad Sci USA. 1996;93(12):5925-30.
202. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. J Clin Endocr Metab. 1997;82(10):3509-12.
203. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. Biochem Bioph Res Co. 1998;243(1):122-6.
204. Thompson EB, Kumar R. DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. Biochem Bioph Res Co. 2003;306(1):1-4.

205. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. Embo J. 2000;19(17):4688-700.
206. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol. 1999;163(3):379-83.
207. Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Mol Endocrinol. 1995;9(7):814-25.
208. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett. 1996;392(1):49-53.
209. Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. Science. 1994;266(5190):1524-7.
210. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000;74(5):287-96.
211. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev. 1999;20(3):358-417.
212. Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(10):5474-9.
213. Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. J Clin Invest. 1999;104(7):895-901.
214. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N Engl J Med. 1994;331(16):1056-61.
215. Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, et al. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. Circulation. 1997;96(10):3774-7.
216. Chakravarti A. Population genetics--making sense out of sequence. Nat Genet. 1999;21(1 Suppl):56-60.
217. Collins A, Lonjou C, Morton NE. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(26):15173-7.
218. Heimdal K, Andersen TI, Skrede M, Fossa SD, Berg K, Borresen AL. Association studies of estrogen receptor polymorphisms in a Norwegian testicular cancer population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995;4(2):123-6.
219. Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17(11):3006-12.
220. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. Hum Genet. 1994;94(6):665-70.
221. Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1989;14(1):57-64.
222. Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, et al. Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. BJOG. 2009;116(8):1053-61.
223. Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J, Griffiths LR. The estrogen receptor 1 G594A polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. Neurogenetics. 2004;5(2):129-33.
224. Lorentzon M, Lorentzon R, Backstrom T, Nordstrom P. Estrogen receptor gene polymorphism, but not estradiol levels, is related to bone density in healthy adolescent boys: a cross-sectional and longitudinal study. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(12):4597-601.

225. Kikuchi T, Hashimoto N, Kawasaki T, Uchiyama M. Association of serum low-density lipoprotein metabolism with oestrogen receptor gene polymorphisms in healthy children. Acta Paediatr. 2000;89(1):42-5.
226. Kunnas TA, Laippala P, Penttila A, Lehtimaki T, Karhunen PJ. Association of polymorphism of human alpha oestrogen receptor gene with coronary artery disease in men: a necropsy study. BMJ. 2000;321(7256):273-4.
227. Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M, et al. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(5):817-23.
228. Lehtimaki T, Kunnas TA, Mattila KM, Perola M, Penttila A, Koivula T, et al. Coronary artery wall atherosclerosis in relation to the estrogen receptor 1 gene polymorphism: an autopsy study. J Mol Med (Berl). 2002;80(3):176-80.
229. Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA, et al. Allelic variants of aromatase and the androgen and estrogen receptors: toward a multigenic model of prostate cancer risk. Clin Cancer Res. 2001;7(10):3092-6.
230. Cancel-Tassin G, Latil A, Rousseau F, Mangin P, Bottius E, Escary JL, et al. Association study of polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and prostate cancer risk. Eur Urol. 2003;44(4):487-90.
231. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. J Bone Miner Res. 2000;15(11):2222-30.
232. Figtree GA, Kindmark A, Lind L, Grundberg E, Speller B, Robinson BG, et al. Novel estrogen receptor alpha promoter polymorphism increases ventricular hypertrophic response to hypertension. J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;103(2):110-8.
233. Figtree GA, Guzik T, Robinson BG, Channon KM, Watkins H. Functional estrogen receptor alpha promoter polymorphism is associated with improved endothelial-dependent vasolidation. Int J Cardiol. 2010;143(2):207-8.
234. Figtree GA, Grieve SM, Speller B, Geiger MJ, Robinson BG, Channon KM, et al. A commonly occurring polymorphism upstream of the estrogen receptor alpha alters transcription and is associated with increased HDL. Atherosclerosis. 2008;199(2):354-61.
235. Abbasi S. AOS19 OESTROGEN RECEPTOR-alpha GENE POLYMORPHISM (T392C) IN IRANIAN WOMEN WITH BREAST CANCER. Eur J Cancer. 2012;48:S10-S.
236. Ongphiphadhanakul B, Chanprasertyothin S, Payattikul P, Saetung S, Piaseu N, Chailurkit L, et al. Association of a G2014A transition in exon 8 of the estrogen receptor-alpha gene with postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int. 2001;12(12):1015-9.
237. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. Nature. 2009;457(7226):219-23.
238. Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. Endokrynol Pol. 2010;61(1):126-34.
239. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology. 2005;146(6):2544-50.
240. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev. 1994;15(3):342-55.
241. Mendelson CR, Wright EE, Evans CT, Porter JC, Simpson ER. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. Arch Biochem Biophys. 1985;243(2):480-91.
242. Kellis JT, Jr., Vickery LE. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. J Biol Chem. 1987;262(9):4413-20.
243. Osawa Y, Yoshida N, Fronckowiak M, Kitawaki J. Immunoaffinity purification of aromatase cytochrome P-450 from human placental microsomes, metabolic switching from aromatization to 1

beta and 2 beta-monohydroxylation, and recognition of aromatase isozymes. Steroids. 1987;50(1-3):11-28.
244. Hall PF, Chen S, Nakajin S, Shinoda M, Shively JE. Purification and characterization of aromatase from human placenta. Steroids. 1987;50(1-3):37-50.
245. Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. Reproduction. 2001;121(5):685-95.
246. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev. 2004;25(6):947-70.
247. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, et al. Aromatase--a brief overview. Annu Rev Physiol. 2002;64:93-127.
248. Snyder GD, Krishna UM, Falck JR, Spector AA. Evidence for a membrane site of action for 14,15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283(5):H1936-42.
249. Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. Mol Endocrinol. 1991;5(12):2005-13.
250. Mahendroo MS, Means GD, Mendelson CR, Simpson ER. Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. J Biol Chem. 1991;266(17):11276-81.
251. Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Silandre D, Delalande C. The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. Reprod Biol. 2004;4(1):23-34.
252. Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Cornil CA, Ball GF. Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003;86(3-5):367-79.
253. Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. J Biol Chem. 2002;277(23):20591-7.
254. Harada N. A unique aromatase (P-450AROM) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1992;189(2):1001-7.
255. Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H, Takagi Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. Circ Res. 1999;84(11):1285-91.
256. Oz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE. Expression of aromatase in the human growth plate. J Mol Endocrinol. 2001;27(2):249-53.
257. Nawata H, Tanaka S, Takayanagi R, Sakai Y, Yanase T, Ikuyama S, et al. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995;53(1-6):165-74.
258. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003;86(3-5):225-30.
259. Braunstein GD. Aromatase and gynecomastia. Endocr Relat Cancer. 1999;6(2):315-24.
260. Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1991;72(3):560-6.
261. Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K, Suhara K, Nishida E, et al. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. J Biol Chem. 1992;267(7):4781-5.
262. Ito Y, Fisher CR, Conte FA, Grumbach MM, Simpson ER. Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(24):11673-7.
263. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR, Simpson ER. A syndrome of female pseudohermaphrodism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(6):1287-92.
264. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80(12):3689-98.

265. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. N Engl J Med. 1997;337(2):91-5.
266. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(6):1739-45.
267. Deladoey J, Fluck C, Bex M, Yoshimura N, Harada N, Mullis PE. Aromatase deficiency caused by a novel P450arom gene mutation: impact of absent estrogen production on serum gonadotropin concentration in a boy. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(11):4050-4.
268. Belgorosky A, Pepe C, Marino R, Guercio G, Saraco N, Vaiani E, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterocygote for two new point mutations of the CYP19 gene. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5127-31.
269. Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, et al. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(1):61-70.
270. Mittre Herve MH, Kottler ML, Pura M. Human gene mutations. Gene symbol: CYP19. Disease: Aromatase deficiency. Hum Genet. 2004;114(2):224.
271. Lin L, Ercan O, Raza J, Burren CP, Creighton SM, Auchus RJ, et al. Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(3):982-90.
272. Maffei L, Rochira V, Zirilli L, Antunez P, Aranda C, Fabre B, et al. A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome. Clin Endocrinol (Oxf). 2007;67(2):218-24.
273. Lanfranco F, Zirilli L, Baldi M, Pignatti E, Corneli G, Ghigo E, et al. A novel mutation in the human aromatase gene: insights on the relationship among serum estradiol, longitudinal growth and bone mineral density in an adult man under estrogen replacement treatment. Bone. 2008;43(3):628-35.
274. Jones ME, Boon WC, Proietto J, Simpson ER. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. Trends Endocrinol Metab. 2006;17(2):55-64.
275. Rochira V, Zirilli L, Genazzani AD, Balestrieri A, Aranda C, Fabre B, et al. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. Eur J Endocrinol. 2006;155(4):513-22.
276. Rochira V, Madeo B, Zirilli L, Caffagni G, Maffei L, Carani C. Oestradiol replacement treatment and glucose homeostasis in two men with congenital aromatase deficiency: evidence for a role of oestradiol and sex steroids imbalance on insulin sensitivity in men. Diabet Med. 2007;24(12):1491-5.
277. Berkovitz GD, Guerami A, Brown TR, MacDonald PC, Migeon CJ. Familial gynecomastia with increased extraglandular aromatization of plasma carbon19-steroids. J Clin Invest. 1985;75(6):1763-9.
278. Leiberman E, Zachmann M. Familial adrenal feminization probably due to increased steroid aromatization. Horm Res. 1992;37(3):96-102.
279. Stratakis CA, Vottero A, Brodie A, Kirschner LS, DeAtkine D, Lu Q, et al. The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P450 aromatase gene transcription. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(4):1348-57.
280. Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, et al. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. N Engl J Med. 2003;348(19):1855-65.
281. Martin RM, Lin CJ, Nishi MY, Billerbeck AE, Latronico AC, Russell DW, et al. Familial hyperestrogenism in both sexes: clinical, hormonal, and molecular studies of two siblings. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(7):3027-34.

282. Binder G, Iliev DI, Dufke A, Wabitsch M, Schweizer R, Ranke MB, et al. Dominant transmission of prepubertal gynecomastia due to serum estrone excess: hormonal, biochemical, and genetic analysis in a large kindred. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(1):484-92.
283. Demura M, Martin RM, Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, et al. Regional rearrangements in chromosome 15q21 cause formation of cryptic promoters for the CYP19 (aromatase) gene. Hum Mol Genet. 2007;16(21):2529-41.
284. Bulun SE, Simpson ER. Regulation of aromatase expression in human tissues. Breast Cancer Res Treat. 1994;30(1):19-29.
285. Bell JR, Mellor KM, Wollermann AC, Ip WT, Reichelt ME, Meachem SJ, et al. Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection. Endocrinology. 2011;152(12):4937-47.
286. Peter I, Shearman AM, Zucker DR, Schmid CH, Demissie S, Cupples LA, et al. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. J Hypertens. 2005;23(12):2193-200.
287. Ellis JA, Wong ZY, Stebbing M, Harrap SB. Sex, genes and blood pressure. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001;28(12):1053-5.
288. Lind JM, Chiu C, Ingles J, Yeates L, Humphries SE, Heather AK, et al. Sex hormone receptor gene variation associated with phenotype in male hypertrophic cardiomyopathy patients. J Mol Cell Cardiol. 2008;45(2):217-22.
289. Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, Mathis JM, Powell FE, Mendelson CR, et al. Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. J Biol Chem. 1989;264(32):19385-91.
290. Harada N, Yamada K, Saito K, Kibe N, Dohmae S, Takagi Y. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. Biochem Biophys Res Commun. 1990;166(1):365-72.
291. Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR, Hinshelwood MM, Bulun SE, Zhao Y. Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. Faseb J. 1997;11(1):29-36.
292. Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(10):4600-2.
293. Shozu M, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER. Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expression by a novel promoter, I.6. Endocrinology. 1998;139(4):1610-7.
294. Honda S, Harada N, Takagi Y. Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. Biochem Biophys Res Commun. 1994;198(3):1153-60.
295. Sebastian S, Takayama K, Shozu M, Bulun SE. Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. Mol Endocrinol. 2002;16(10):2243-54.
296. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L, et al. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. Cancer Res. 2005;65(23):11071-82.
297. Gennari L, Masi L, Merlotti D, Picariello L, Falchetti A, Tanini A, et al. A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(6):2803-10.
298. Dick IM, Devine A, Prince RL. Association of an aromatase TTTA repeat polymorphism with circulating estrogen, bone structure, and biochemistry in older women. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(5):E989-95.
299. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De Vivo I, Colditz GA, Willett WC, et al. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. Int J Cancer. 2000;87(2):204-10.
300. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, Tee L, Luben RN, Folkerd E, et al. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. J Natl Cancer Inst. 2004;96(12):936-45.
301. Kristensen VN, Harada N, Yoshimura N, Haraldsen E, Lonning PE, Erikstein B, et al. Genetic variants of CYP19 (aromatase) and breast cancer risk. Oncogene. 2000;19(10):1329-33.

302. Baxter SW, Choong DY, Eccles DM, Campbell IG. Polymorphic variation in CYP19 and the risk of breast cancer. Carcinogenesis. 2001;22(2):347-9.
303. Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, Haile RW, Stanczyk FZ, Kolonel LN, et al. Aromatase and breast cancer susceptibility. Endocr Relat Cancer. 1999;6(2):165-73.
304. Pineda B, Garcia-Perez MA, Cano A, Lluch A, Eroles P. Associations between aromatase CYP19 rs10046 polymorphism and breast cancer risk: from a case-control to a meta-analysis of 20,098 subjects. PLoS One. 2013;8(1):e53902.
305. Masi L, Becherini L, Gennari L, Amedei A, Colli E, Falchetti A, et al. Polymorphism of the aromatase gene in postmenopausal Italian women: distribution and correlation with bone mass and fracture risk. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(5):2263-9.
306. Berstein LM, Imyanitov EN, Kovalevskij AJ, Maximov SJ, Vasilyev DA, Buslov KG, et al. CYP17 and CYP19 genetic polymorphisms in endometrial cancer: association with intratumoral aromatase activity. Cancer Lett. 2004;207(2):191-6.
307. Paynter RA, Hankinson SE, Colditz GA, Kraft P, Hunter DJ, De Vivo I. CYP19 (aromatase) haplotypes and endometrial cancer risk. Int J Cancer. 2005;116(2):267-74.
308. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, et al. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. Hum Reprod. 2002;17(4):897-902.
309. Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. Fertil Steril. 2003;79 Suppl 1:702-9.
310. Suzuki K, Nakazato H, Matsui H, Koike H, Okugi H, Ohtake N, et al. Association of the genetic polymorphism of the CYP19 intron 4[TTTA]n repeat with familial prostate cancer risk in a Japanese population. Anticancer Res. 2003;23(6D):4941-6.
311. Tsuchiya N, Wang L, Suzuki H, Segawa T, Fukuda H, Narita S, et al. Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer. J Clin Oncol. 2006;24(13):1982-9.
312. Czajka-Oraniec I, Zgliczynski W, Kurylowicz A, Mikula M, Ostrowski J. Association between gynecomastia and aromatase (CYP19) polymorphisms. Eur J Endocrinol. 2008;158(5):721-7.
313. Peter I, Kelley-Hedgepeth A, Fox CS, Cupples LA, Huggins GS, Housman DE, et al. Variation in estrogen-related genes associated with cardiovascular phenotypes and circulating estradiol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate levels. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(7):2779-85.
314. Sangrajrang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Laird NM, Khuhaprema T, et al. Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women. Int J Cancer. 2009;125(4):837-43.
315. Reding KW, Chen C, Lowe K, Doody DR, Carlson CS, Chen CT, et al. Estrogen-related genes and their contribution to racial differences in breast cancer risk. Cancer Cause Control. 2012;23(5):671-81.
316. Rosa FE, Canevari RD, Ambrosio EP, Cirilo PDR, Pontes A, Rainho CA, et al. Polymorphisms of CYP17A1, CYP19, and androgen in Brazilian women with uterine leiomyomas. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2008;46(6):814-23.
317. Chen C, Sakoda LC, Doherty JA, Loomis MM, Fish S, Ray RM, et al. Genetic Variation an CYP19A1 and Risk of Breast Cancer and Fibrocystic Breast Conditions among Women in Shanghai, China. Cancer Epidem Biomar. 2008;17(12):3457-66.
318. Shimodaira M, Nakayama T, Sato N, Saito K, Morita A, Sato I, et al. Association study of aromatase gene (CYP19A1) in essential hypertension. Int J Med Sci. 2008;5(1):29-35.
319. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. BMC Med Genet. 2007;8 Suppl 1:S14.
320. Beesley J, Jordan SJ, Spurdle AB, Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in hormone metabolism and DNA repair genes and epithelial

ovarian cancer: results from two Australian studies and an additional validation set. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16(12):2557-65.
321. Ziv-Gal A, Gallicchio L, Miller SR, Zacur HA, Flaws JA. A genetic polymorphism in the CYP19A1 gene and the risk of hypertension among midlife women. Maturitas. 2012;71(1):70-5.
322. Yang TL, Xiong DH, Guo Y, Recker RR, Deng HW. Association analyses of CYP19 gene polymorphisms with height variation in a large sample of Caucasian nuclear families. Human Genetics. 2006;120(1):119-25.
323. Peter I, Kelley-Hedgepeth A, Huggins GS, Housman DE, Mendelsohn ME, Vita JA, et al. Association between arterial stiffness and variations in oestrogen-related genes. J Hum Hypertens. 2009;23(10):636-44.
324. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation - executive summary - A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation) Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. European Heart Journal. 2006;27(16):1979-2030.
325. Kunnas TA, Holmberg-Marttila D, Karhunen PJ. Analysis of estrogen receptor dinucleotide polymorphism by capillary gel electrophoresis with a population genetic study in 180 Finns. Hum Hered. 1999;49(3):142-5.
326. Biolchi V, Silva Neto B, Koff W, Brum IS. Androgen receptor CAG polymorphism and the risk of benign prostatic hyperplasia in a Brazilian population. Int Braz J Urol. 2012;38(3):373-9.
327. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. Endocr Rev. 2006;27(6):575-605.
328. Ng MK. New perspectives on Mars and Venus: unravelling the role of androgens in gender differences in cardiovascular biology and disease. Heart Lung Circ. 2007;16(3):185-92.
329. Yarnoz MJ, Curtis AB. More reasons why men and women are not the same (gender differences in electrophysiology and arrhythmias). Am J Cardiol. 2008;101(9):1291-6.
330. Levin ER. Minireview: Extranuclear Steroid Receptors: Roles in Modulation of Cell Functions. Mol Endocrinol. 2011;25(3):377-84.
331. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacol Rev. 2006;58(4):773-81.
332. Murphy E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. Circ Res. 2011;109(6):687-96.
333. Yang PC, Clancy CE. In silico Prediction of Sex-Based Differences in Human Susceptibility to Cardiac Ventricular Tachyarrhythmias. Front Physiol. 2012;3:360.
334. Kato M, Kawaguchi T, Ishikawa S, Umeda T, Nakamichi R, Shapero MH, et al. Population-genetic nature of copy number variations in the human genome. Hum Mol Genet. 2010;19(5):761-73.
335. Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. Human Molecular Genetics. 2000;9(13):2043-50.
336. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. Mol Endocrinol. 2001;15(12):2057-63.
337. Cohn CS, Sullivan JA, Kiefer T, Hill SM. Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer. Mol Cell Endocrinol. 1999;158(1-2):25-36.
338. Pugh PJ, English KM, Jones TH, Channer KS. Testosterone: a natural tonic for the failing heart? QJM. 2000;93(10):689-94.
339. Smalcelj A, Sertic J, Golubic K, Jurcic L, Banfic L, Brida M. Interactions of MinK and e-NOS Gene Polymorphisms Appear to Be Inconsistent Predictors of Atrial Fibrillation Propensity, but Long

Alleles of ESR1 Promoter TA Repeat May Be a Promising Marker. Collegium Antropol. 2009;33(3):933-7.
340. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. Biochem Biophys Res Commun. 1995;217(1):378-83.
341. Kunnas TA, Lehtimaki T, Karhunen PJ, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, et al. Estrogen receptor genotype modulates myocardial perfusion in young men. J Mol Med-Jmm. 2004;82(12):821-5.
342. Stricker R, Eberhart R, Chevailler MC, Quinn FA, Bischof P. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. Clin Chem Lab Med. 2006;44(7):883-7.
343. Kopecky SL. Idiopathic atrial fibrillation: prevalence, course, treatment, and prognosis. J Thromb Thrombolysis. 1999;7(1):27-31.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 24.7.1982. u Čakovcu, gdje sam završio osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. 30.6.2006. diplomirao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s odličnim uspjehom. Tijekom studija bio sam dobitnik Rektorove nagrade za znanstveni rad. Krajem 2007. godine završio sam pripravnički staž na Klinici za infektivne bolesti „Fran Mihaljević“ u Zagreb, položio državni ispit te postao znanstveni novak Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na projektu “Atrijska fibrilacija: od genoma do fenotipa i kliničke slike” pod mentrostvom prof. dr. sc. Antona Šmalcelja. 2008. godine upisao sam doktorski poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2010. obavljam specijalizaciju iz interne medicine na KBC Zagreb. Autor sam i koautor nekoliko znanstvenih i stručnih radova. Oženjen sam i ponosan otac dviju kćeri.

12. PRILOZI

1. Obavijest za ispitanika
2. Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju

Obavijest za ispitanika

Poštovani/poštovana,

Pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju čiji je glavni cilj istražiti povezanost genotipa s pojavom izolirane fibrilacije atrija (jedne od srčanih aritmija).

Istraživanje se provodi u Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, a financiran je od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH.

Vaše sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vas kao ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj naiđete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživače i liječnike koji u istraživanju sudjeluju i dužni su Vam i spremni odgovoriti na svako pitanje.

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Fibrilacija atrija je najčešća kronična aritmija čija je ukupna prevalencija u općoj polulaciji veća od 1 % (tu bolest dakle ima svaki stoti čovjek). Ona kod starijih osoba dramatično povećava rizik nastanka moždanog udara, a uzrokuje i niz drugih posljedica kao što su osjećaj nepravilnog rada srca, bol i pritisak u prsima, umor, omaglice... Iako je do sada identificirano nekoliko faktora rizika za nastanak fibrilacije atrija, njeni pravi uzroci i dalje su nejasni. Očekujemo da će naš rad na ovom području pridonjeti boljem razumjevanju nastanka te aritmije u svrhu bolje prevencije i liječenja.

CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja ispitati povezanost između određenog genotipa i izolirane fibrilacije atrija. U tu se svrhu mora isključiti postojanje drugih bolesti srca, izuzev same fibrilacije te pridobiti uzorak DNA ispitanika za daljnju laboratorijsku analizu.

ULOGA VAS KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Navedeno istraživanje provodit će se kao dodatak uobičajenoj obradi koja se vrši kod svih bolesnika s fibrilacijom atrija. Uvjet za ulazak u istraživanje je elektrokardiografski dokazana epizoda fibrilacije atrija bez drugih bolesti srca. Ispitanici u kojih je valvularna, ishemijska, hipertenzivna ili kakva druga bolest srca neće biti uključeni u istraživanje. U laboratorijskim analizama biti će određeni aleli s odgovarajućim polimorfizmima estrogenskog receptora alfa. Svim bolesnicima s fibrilacijom atrija biti će učinjen transtorakalni ultrazvuči pregled srca. U ispitivanje će biti uključeno i 150 zdravih ispitanika kao kontrolna skupina. Svi će oni proći gore navedenu dijagnostičku obradu. Tijekom ispitivanja susretat ćete se s osobljem Klinike za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb.

KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

Bolesnicima i ispitanicima iz kontrolne skupine biti će učinjen transtorakalni ultrazvučni pregled srca. U slučaju detekcije strukturnih i funkcionalnih poremećaja srca, svakom će se ispitaniku preporučiti daljnja obrada i liječenje.

KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

Ne očekujemo da ćete u ovom istraživanju biti izloženi riziku. Eventualna pojava kontaktnog dermatitisa prilikom elektro i ehokardiografije tako i tromboflebitis površinskih vena ruku ili pojava omaglica prilikom vađenja krvi ne predstavljaju po život opasna stanja i prolazne su prirode ne ostavljajući posljedice po zdravlje ispitanika.

POSTOJE LI DRUGI LIJEKOVI, DRUGE DIJAGNOSTIČKE METODE ILI DRUGI OPERATIVNI PRISTUPI?

U slučaju da ne pristajete na sudjelovanje u studiji, to neće utjecati na tijek liječenja Vaše bolesti. Biti ćete liječeni standardnim metodama prema pravilima struke.

MORATE LI SUDJELOVATI U ISTRAŽIVANJU?

Vi ćete u potpunosti slobodno i samostalno odlučiti hoćete li u ovom istraživanju sudjelovati ili ne. Vaše sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imate se pravo bez ikakvih posljedica povući iz istraživanja. U tom slučaju ćete se nastaviti dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest. Ako odlučite prekinuti svoje sudjelovanje u istraživanju, lijepo Vas molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditelja projekta i njegove suradnike.

POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi Vaši osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj projekta i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U naše baze podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj projekta i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) te predstavnici Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni u ovom znanstvenom istraživanju mogu biti korisni u kliničkoj praksi, ali i u svrhu daljnjeg razvoja i unapređenja znanosti. Stoga se očekuje da se ti podaci objave u odgovarajućim znanstvenim časopisima i publikacijama. Pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anoniman i zaštićen.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje organizira Klinika za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Zagreb. Financijska sredstva za provedbu ovog istraživanja su dobivena od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, a dio podataka koji će biti korišteni u ovom istraživanju dio su standardne dijagnostičke obrade bolesnika s fibrilacijom atrija.

TKO JE ODOBRIO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditelju projekta ili njegovim suradnicima, kako slijedi:

Ime i prezime voditelja projekta i istraživanja: prof. dr. sc. Anton Šmalcelj

Adresa suradnika: Odjel prve kardiologije

Klinika za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb

Broj telefona voditelja projekta i istraživanja: 01/2367489

Ime i prezime suradnika: Karlo Golubić, dr. med.

Adresa suradnika: Odjel prve kardiologije

Klinika za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb

Broj telefona suradnika: 01/2367494

TKO ĆE JOŠ BITI OBAVIJEŠTEN O OVOM ISTRAŽIVANJU?

O Vašem sudjelovanju u ovom znanstvenom istraživanju biti će obaviješten i Vaš obiteljski liječnik.

O VAŠOJ PISANOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Preslik dokumenta (potpisne stranice) koji trebate potpisati ako pristajete sudjelovati u ovom istraživanju dobit ćete Vi i voditelj istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost Vašeg sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Oba obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju

1. Potvrđujem da sam dana _____ u _____ pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.
4. Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
5. Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika (upisati tiskanim slovima):

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum:

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje:

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum: