

Uloga polimorfizama gena CYP2J2 u kliničkoj medicini

Jurič, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:139400>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Magdalena Jurič

**Uloga polimorfizama gena *CYP2J2*
u kliničkoj medicini**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr. sc. Livije Šimičević.

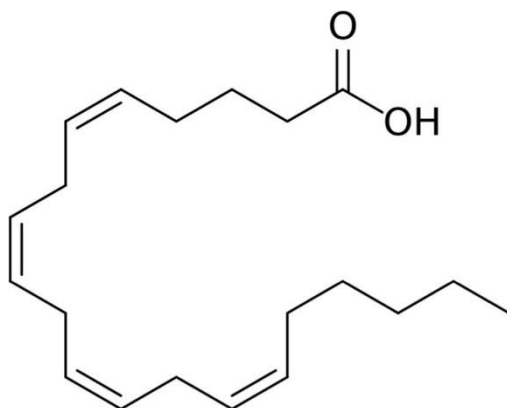
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Arahidonska kiselina	1
1.2. Metabolizam arahidonske kiseline	1
1.3. Djelovanje CYP eikozanoida na kardiovaskularni sustav	4
1.4. Uloga polimorfizama <i>CYP2J2</i> u nastanku kardiovaskularnih bolesti	7
1.5. Utjecaj epoksieikozatrienske kiseline na razvoj fibrilacije atrijske	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Ispitanici	16
3.2. Izdvajanje DNA	17
3.3. Određivanje čistoće i koncentracije izolirane DNA	19
3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (PCR)	20
3.5. Genotipizacija alela <i>CYP2J2</i> *7	23
3.6. Statistička analiza	26
4. REZULTATI	27
4.1. Opća obilježja ispitanika	27
4.2. Distribucija genotipova i alela	29
4.3. Obilježja ispitanika s obzirom na prisutnost alela <i>CYP2J2</i> *7	30
4.4. Model logističke regresije za predviđanje vjerojatnosti nastanka fibrilacije atrijske ...	32
4.5. Spolna razlika	33
5. RASPRAVA	35
5.1. Značajnost polimorfizma <i>CYP2J2</i> *7 u vjerojatnosti nastanka fibrilacije atrijske	35
5.2. Značajnost polimorfizma <i>CYP2J2</i> *7 u kliničkoj medicini	39
6. ZAKLJUČCI	42
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	43
8. LITERATURA	45
9. SAŽETAK	53
9. SUMMARY	54
10. PRILOG	55
10.1. Popis slika	55
10.1. Popis tablica	56
11. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	57

1. UVOD

1.1. Arahidonska kiselina

Arahidonska kiselina jest dugolančana višestruko nezasićena masna kiselina iz skupine omega-6 masnih kiselina te je druga najzastupljenija omega-6 masna kiselina u ljudskom tijelu (Rise i sur., 2013). Kemijska formula arahidonske kiseline glasi $C_{20}H_{32}O_2$, a po kemijskoj je strukturi karboksilna kiselina građena od 20 ugljikovih atoma i četiri dvostruke veze u *cis* položaju, te joj je po nomenklaturi ime sve-*cis*-5,8,11,14-eikozatetraenska kiselina (Hanna i Hafez, 2018). U organizmu se najvećim dijelom nalazi esterificirana u sastavu fosfolipida staničnih membrana skeletnih mišića, mozga, jetre, slezene i mrežnice, ali i u lipidnim tjelešcima stanica imunskog sustava (Weller, 2016).



Slika 1. Struktura molekule arahidonske kiseline (Hanna i Hafez, 2018).

Fiziološke funkcije arahidonske kiseline temeljene su na njoj kemijskoj strukturi. Posjedujući sve nezasićene veze u *cis* položaju tj. svi atomi vodika kod dvostrukih veza se nalaze na istoj strani, ona sama pogoduje održavanju fluidnosti, fleksibilnosti i propusnosti stanične membrane, a time utječe i na funkciju membranskih proteina prijenosnika. Također ima važnu ulogu u održavanju cjelovitosti stanica i organela kao i vaskularne propusnosti (Beck, i sur., 1998). Arahidonska kiselina povećava propusnost stanične membrane za kalcij – pri niskim koncentracijama kalcija povećava aktivnost Ca^{2+} -ATPaze, dok pri višim koncentracijama smanjuje aktivnost Ca^{2+} -ATPaze (Oliveira i sur., 2008). Također, može

djelovati na ionske kanale bilo vezivanjem na membranske proteine ili umetanjem između njih, modificirajući tako mehanička svojstva stanične membrane i modulirajući funkciju ionskog kanala. Arahidonska kiselina ima izravan učinak na nekoliko membranskih kalijevih kanala, bilo ubrzavanjem njihove inaktivacije ili induciranjem aktivacije kanala (Meves, 2008). Albumin, kao glavni protein u izvanstaničnoj tekućini, veže masne kiseline te tako povećava otpuštanje arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja i na taj način smanjuje propusnost stanične membrane stanica endotela kao i cirkulirajućih stanica (Beck i sur., 1998). Nadalje, arahidonska kiselina je zbog svoje četiri nezasićene dvostruke veze podložna oksidacijskim reakcijama kojim nastaju brojni biološki bitni metaboliti.

Zaključno, arahidonska kiselina neophodna je za rast i razvoj organizma, funkcionalnost imunosnog sustava, te rani neurološki razvoj. U ljudskoj prehrani glavni su joj izvor zasićene masti životinjskog podrijetla, a osim u mesu, najviše je ima u žumanjku jajeta, tuni i lososu. Osim direktnog unosa, može se sintetizirati iz linolne kiseline (esencijalne masne kiseline) koju sadržavaju orašasti plodovi te različite sjemenke i njihova ulja (npr. suncokret, šafranika, kukuruz, soja), ali i nastati endogenim putem iz endokanabinoida.

1.2. Metabolizam arahidonske kiseline

U fiziološkim se uvjetima slobodna arahidonska kiselina nalazi u vrlo malim koncentracijama, i u unutarstaničnom i izvanstaničnom prostoru. Oslobođanje arahidonske kiseline iz difosfolipida tj. deacilaciju kataliziraju fosfolipaza A2 (PLA2, engl. *phospholipase A2*), fosfolipaza C (PLC, engl. *phospholipase C*) i fosfolipaza D (PLD, engl. *phospholipase D*), ali jedino je PLA2 oslobađa u jednom koraku. Nakon oslobađanja iz stanične membrane ili lipidnih tjelešaca, arahidonska kiselina ima tri moguće sudbine: metabolizam (enzimski i neenzimski put), difuzija u druge stanice ili ponovno vezanje u fosfolipidnoj membrani.

Enzimski put metabolizma arahidonske kiseline uključuje enzimske porodice ciklooksigenaza, lipooksigenaza te citokroma P450, pri čemu nastaju eikozanoidi (Slika 2.). Eikozanoidi, čiji naziv potječe od grčke riječi *eikosi* koja označava broj 20, a odnosi se na broj ugljikovih atoma u nastalim lipidnim medijatorima (Hanna i Hafez, 2018). Eikozanoidi imaju pleiotropnu ulogu u upali i imunosnom odgovoru, a svoje autokrine i parakrine učinke većinom ostvaruju aktivacijom receptora povezanih s G proteinima (Kornej i sur., 2022).

A) Metabolizam arahidonske kiseline posredovan ciklooksigenazama (COX) rezultira nastankom prostanoida – prostaglandina (PG), tromboksana i prostaciklina. Prostanoidi su klasa heterogenih bioaktivnih eikozanoida s proupalnim, protuupalnim i protrombotskim ulogama (Beccacece i sur., 2023). Ciklooksigenaza katalizira metabolizam arahidonske kiseline u dva kratkoživuća intermedijerna spoja, prostaglandin G (PGG) i prostaglandin H (PGH). Prostaglandin H se dalje metabolizira u PG, prostaciklin (prostaglandin I₂, PGI₂) i tromboksan A₂ (TXA₂, engl. *thromboxane A2*) djelovanjem specifičnih enzima: prostaglandin izomeraze za različite prostaglandine, prostaciklin sintaze za PGI₂ i tromboksan sintaze za TXA₂.

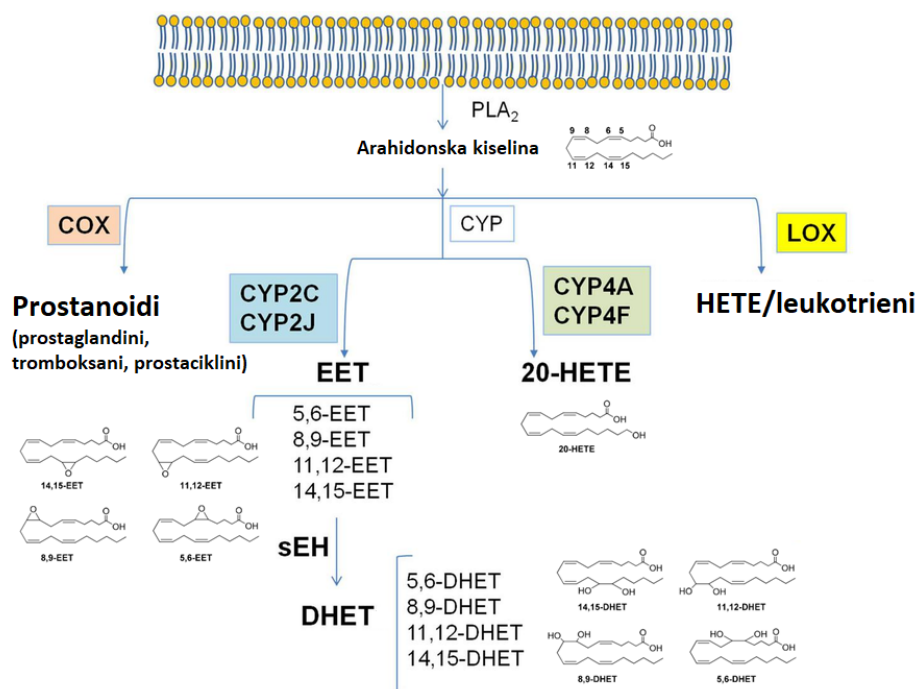
Postoje dvije vrste COX: COX-1 je konstitutivno izražena u većini stanica i primarni je izvor prostanoida sa zaštitnim funkcijama, dok je COX-2 konstitutivno izražena u mozgu i bubregu, a u ostalim se stanicama inducira djelovanjem proupalnih čimbenika i faktora rasta zbog čega se stvaranje prostanoida povezuje s nastankom upale (Khanapure i sur., 2007; Patrono, 2016). Osim u promoviranju upale, značajan je i njihov učinak na hemostazu budući da prostaglandini uzrokuju vazokonstrikciju, a tromboksani potiču agregaciju trombocita (Beccacece i sur., 2023). Ovi su učinci farmakološki iskorišteni kod nesteroidnih protuupalnih lijekova koji djeluju kao reverzibilni COX inhibitori te kod acetil salicilne kiseline koja enzime

inhibira ireverzibilno (Grosser i sur., 2011). Disfunkcionalna sinteza i aktivnost prostanoida uključeni u razvoj mnogih kardiovaskularnih bolesti, kao što su ateroskleroza, hipertenzija, bolest koronarnih arterija, tromboza i infarkt miokarda. Mnoge studije pokazale su da su u patogenezu kardiovaskularnih bolesti (KVB) uključene genske varijante koje mijenjaju ekspresiju i katalitičku aktivnost prostanoidnih sintaza i receptora. Međutim, ponekad postoje proturječni podaci, koji vjerojatno ukazuju na drugačiji utjecaj zemljopisnih predaka na varijante gena (Beccacece i sur., 2023).

Lipoksigenaze kataliziraju oksigenaciju arahidonske kiseline, a svaka lipoksigenaza tvori zasebnu hidroperoksi-eikozatetraensku kiselinu (HPETE). Nastale HPETE dalje se metaboliziraju u lipoksigenaznom putu koji dovodi do stvaranja hidroperoksida – leukotriena, regioizomerne *cis/trans* konjugirane hidroksieikoza-tetraenske kiseline (HETE), lipoksina i hepoksilina. Leukotrieni su eikozanoidi koji djeluju kao medijatori upale, bronhokonstriktori i imunomodulatori, dok lipoksini imaju različite biološke funkcije, uključujući regulaciju upalnih procesa, imunoloških reakcija, vaskularnog tonusa i agregacije trombocita (Capdevila i Falck, 2001).

B) Citokrom P450 (CYP), mikrosomalni enzimski kompleks koji sudjeluje u metabolizmu lijekova, katalizira hidroksilaciju (monooksigenaciju) arahidonske kiseline u epoksieikozatriensku kiselinu (EET). Stoga treći metabolički put uključuje metabolizam mikrosomalnim CYP enzimima pri čemu nastaju hidroksidni i epoksidni derivati (Slika 2.). Unatoč tome što su CYP enzimi poznati po metabolizmu lijekova i ksenobiotika, ovaj rad usredotočit će se na njihovu ključnu ulogu u regulaciji kardiovaskularne funkcije djelovanjem na endogene supstrate. CYP epoksigenaze arahidonsku kiselinu pretvaraju u EET, a CYP hidroksilaze dominantno stvaraju 20-hidroksieikozatetraenoičnu kiselinu (20-HETE) (Imig, 2016). Nastale EET: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET i 14,15-EET, regioselektivni su produkti koji se razlikuju po položaju dvostruke veze na kojoj se odvila epoksidacija. Sve EET su biološki aktivne te djeluju na različite enzime, transportere i receptore u stanicama. Djeluju na ionske natrijeve, kalijeve i kalcijeve kanale, potiču vaskularnu relaksaciju, imaju protuupalni učinak na endotel te kardioprotektivni učinak tijekom ishemijskih događaja (Spector i sur., 2004; Hayran i sur., 2020). Epoksieikozatrienske kiseline dalje se metaboliziraju pomoću enzima topljive epoksid hidrolaze (sEH, engl. *solubile epoxid hidrolase*) u odgovarajući 1,2-diol hidroksieikozatetraenske kiseline (DHET). 1,2-diol hidroksieikozatetraenske kiseline se smatraju biološki manje aktivnima, ali također imaju važnu ulogu u regulaciji homeostaze arahidonske kiseline (Imig, 2016).

Odabir metaboličkog puta arahidonske kiseline ovisi o vrsti stanice u kojoj se odvija metabolizam te prisutnim patološkim stanjima i odgovarajućim hormonima, citokinima, neurotransmiterima i sl. (Jane Mitchell i sur., 2018; Sonnweber i sur., 2018; Zhou i sur., 2021). Sva tri metabolička puta arahidonske kiseline međusobno su povezana i utječu na biološke procese u tijelu. Imaju različite fiziološke uloge u kontroli apoptoze, stanične proliferacije, metabolizma i vaskularne funkcije, ali i patofiziološke uloge zbog kojih se povezuju s nastankom mnogih kroničnih bolesti, osobito kardiovaskularnih (Zhou i sur., 2021).



Slika 2. Pregled metabolizma arahidonske kiseline počevši od njenog oslobađanja iz stanične membrane djelovanjem fosfolipaze A2 (PLA₂). Jednom kada je u slobodnom obliku, može se metabolizirati u eikozanoide kroz tri glavna puta: put ciklooksigenaze (COX), put lipoksigenaze (LOX) i put citokroma P450 (CYP). U CYP putu djelovanjem CYP epoksigenaza nastaju epoksieikozatrienske kiseline (EET), a djelovanjem CYP ω -hidroksilaza nastaje 20-hidroksi eikozatetraenoična kiselina (20-HETE). Sve EET se dalje metaboliziraju topljivom epoksid hidrolazom (sEH) tvoreći manje aktivne dihidroksieikozatrienske kiseline (DHET) (preuzeto i prilagođeno prema Tacconelli i Patrignani, 2014 te Aliwarga i sur., 2018).

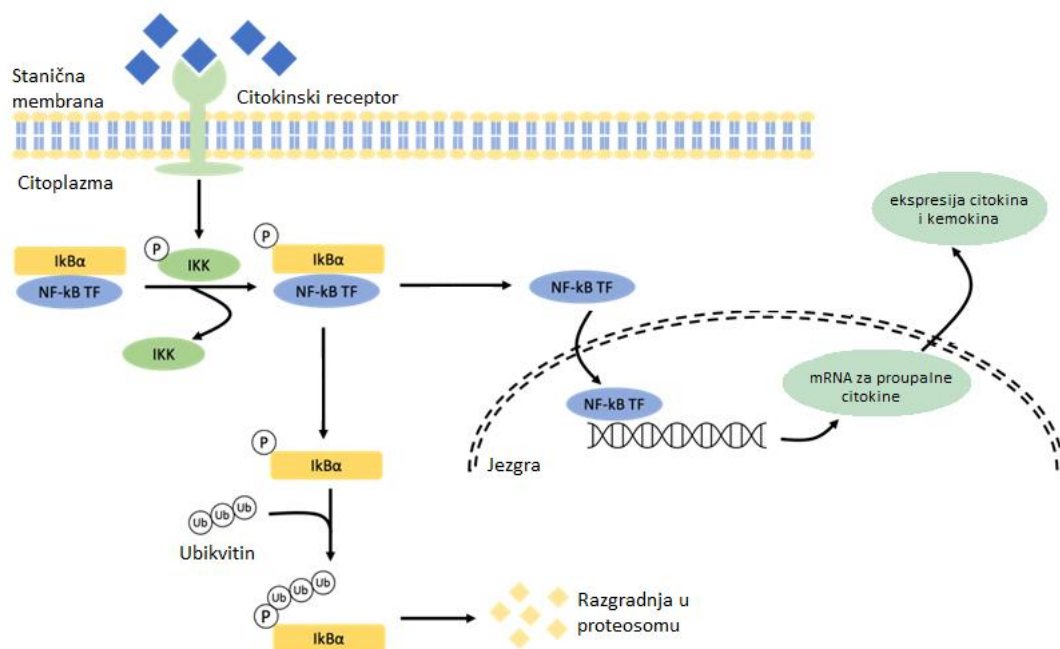
1.3. Djelovanje CYP eikozanoida na kardiovaskularni sustav

CYP epoksigenaze arahidonsku kiselinu pretvaraju u EET, a CYP hidroksilaze dominantno stvaraju 20-hidroksieikozatetraenoičnu kiselinu (20-HETE) (Imig, 2016). Smatra se kako EET, za razliku od ostalih eikozanoida, imaju kardiovaskularnu zaštitnu i protuupalnu ulogu (Beccacece i sur., 2023). One prvenstveno djeluju na kardiovaskularni sustav gdje ostvaruju autokrine i parakrine učinke. Ukratko, EET djeluju vazodilacijski, protuupalno i profibrinolitički te promiču angiogenezu (Lee i sur., 2007; Liu i sur., 2007). Vazodilacijski učinak postižu djelovanjem na glatke mišićne stanice krvnih žila. Također mogu izravno djelovati na hiperpolarizaciju stanice ili neizravno modulirati njen odgovor na druge vazoaktivne medijatore. Izravno djelovanje temelji se na aktivaciji kalcijem aktiviranih kalijevih kanala na glatkim mišićnim stanicama čime dolazi do izlaska kalija iz stanice, hiperpolarizacije i posljedične relaksacije (Campbell i Fleming, 2010). Indirektno djelovanje temelji se na interakcijama s endotelinom-1 i dušikovim oksidom (Imig, 2016). S druge strane, produkti CYP hidroksilaza djeluju vazokonstriksijski. 20-hidroksieikozatetraenoična kiselina inhibira kalijeve kanale i aktivira L-tip kalcijevih kanala što dovodi do povećanja unutarstaničnog kalcija u glatkim mišićima krvnih žila i posljedično uzrokuje vazokonstrikciju.

Epoksieikozatrienske kiseline i 20-HETE mogu utjecati i na upalne reakcije glatkih mišića krvnih žila i endotelnih stanica pri čemu EET djeluju kao protuupalni, a 20-HETE kao upalni medijatori. 20-hidroksieikozatetraenoična kiselina potiče sintezu adhezijskih molekula i proupalnih citokina poput faktora nekroze tumora α (TNF- α , engl. *tumor necrosis factor alpha*), interleukina 1 β (IL-1 β) i 6 (IL-6), a njeno djelovanje temelji se na aktivaciji nuklearnog faktora kapa B (NF κ B) i stvaranju reaktivnih kisikovih spojeva (Imig, 2016). Nuklearni faktor kapa B nalazi se u citoplazmi u kompleksu s obitelji inhibicijskih proteina zvanih inhibitori kapa B (I κ B). Nakon aktivacije NF κ B signalnog puta, kinaze inhibitora kapa B (I κ K) fosforiliraju I κ B što dovodi do njihove razgradnje proteasomom i oslobađanja NF κ B koji se translocira u jezgru i aktivira transkripciju proupalnih gena. Put NF κ B uključen je u mnoge aspekte upale, uključujući regrutiranje i aktivaciju imunskih stanica, proizvodnju upalnih citokina i kemokina te regulaciju preživljavanja i proliferacije stanica (Višnjić, 2010).

Pokazalo se da EET imaju protuupalne učinke i mogu inhibirati aktivaciju puta NF κ B. Mehanizam nije u potpunosti spoznan, ali se vjeruje da uključuje inhibiciju kompleksa I κ K sprječavanjem fosforilacije njegovih podjedinica, koje su neophodne za njegovu aktivaciju. Dodatno, EET mogu aktivirati transkripcijski faktor u jezgri, peroksisomskim proliferatorom

aktivirani receptor gama (PPAR γ , engl. *peroxisome proliferator – activated receptor gamma*), koji također može inhibirati put NF κ B (Imig, 2012). Taj receptor ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze i lipida, ali i u kontroli upale. Signalni put PPAR γ aktiviraju različiti ligandi, uključujući endogene lipide kao što su prostaglandini i sintetski ligandi kao što su tiazolidindioni koji se koriste u liječenju šećerne bolesti tipa 2. Kada se aktivira, PPAR γ tvori heterodimer s receptorom za retinoičnu kiselinu koji se nadalje veže na specifične elemente odgovora u promotorskoj regiji ciljnih gena. Na taj se način na transkripcijskoj razni kontrolira količina proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina (Višnjic, 2010). Upravo zbog mogućnosti aktiviranja PPAR γ , EET, a posljedično i enzim CYP2J2, epoksidaza arahidonske kiseline, kao i istoimeni gen *CYP2J2*, istraživani su u bolestima srca i u šećernoj bolesti (Aliwarga i sur., 2018). Node i sur. (1999) otkili su kako EET mogu modulirati upalni odgovor, izazvan proupalnim citokinima, inhibicijom ekspresije vaskularnih endotelnih adhezijskih molekula i smanjenjem broja kotrljajućih/adherentnih mononuklearnih leukocita.



Slika 3. Aktivacija signalnog puta NF κ B uključuje fosforilaciju inhibitora kapa B (I κ B) djelovanjem kinaza inhibitora kapa B (I κ K). Fosforilacija omogućava konformacijsku promjenu kompleksa i oslobađanje NF κ B te njegovu translokaciju u jezgru gdje potiče sintezu proupalnih citokina i kemokina. Fosforilirani inhibitor kapa B dalje se ubikvitinira i razgrađuje u proteosomu (preuzeto i prilagođeno prema <https://sites.tufts.edu/>).

Neočekivano, EET i 20-HETE imaju slične biološke učinke na remodeliranje krvnih žila, što je bitno za progresiju različitih KVB. Pokazano je da oba medijatora potiču angiogenezu i proliferaciju endotelnih stanica potičući sintezu faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) (Imig, 2016).

Promjene u endokrinim, parakrinim i autokrinim čimbenicima uključene su u patofiziologiju KVB. Stoga, s obzirom na sve gore navedeno, jasno je da eikozanoidi nastali CYP metabolizmom imaju bitnu ulogu u njihovom nastanku. Posljedično, taj metabolički put predstavlja noviju terapijsku metu u liječenju KVB. Brojne su studije pokazale da povećanje koncentracije EET ili primjena njihovih analoga te inhibicija sEH ima zaštitne učinke kod raznih KVB, uključujući hipertenziju, infarkt miokarda i zatajenje srca (Lai i Chen, 2021). Agonisti i antagonisti 20-HETE procijenjeni su u ishemijskoj reperfuzijskoj ozljedi. Osim već gore opisanog učinka na endotel, EET reguliraju i metabolizam lipoproteinskih čestica. Pokazano je da inhibicija sEH, koja rezultira povišenom koncentracijom EET, smanjuje koncentraciju ukupnog kolesterola i lipoproteina niske gustoće, a povisuje koncentraciju lipoproteina visoke gustoće (Shen i sur., 2014).

1.4. Uloga polimorfizama *CYP2J2* u nastanku kardiovaskularnih bolesti

Mikrosomalni enzim *CYP2J2* jedan je od glavnih epoksigenaza arahidonske kiseline, primarno eksprimiran u srcu i endotelu koronarnih arterija, te manje u jetri, bubrezima, skeletnim mišićima, plućima, mozgu, gušterači i gastrointestinalnom traktu (Berlin i sur., 2011). *CYP* označava superporodicu membranski vezanih enzima koji kataliziraju reakcije monooksigenacije – oksidiraju molekulu supstrata koristeći molekularni kisik; jedan atom kisika dodaje se supstratu, a drugi se reducira do molekule vode. Kao izvor elektrona koriste NADPH iz citokrom P 450 reduktaze. Na temelju homologije u njihovim genskim sekvencama, dijele se na obitelji *CYP* gena (> 40 % homologije) i podobitelji (> 59 % homologije). *CYP2J2* jedini je član *CYP2J* podobitelji u ljudi (Rendić, 2016).

Gen *CYP2J2* smješten je na prvom kromosomu; sadrži devet egzona i osam introna (Xu i sur., 2013). Genska ekspresija *CYP2J2* regulirana je vezanjem transkripcijskih faktora aktivator proteina-1 (AP-1) i specifičnog proteina 1 (Sp1) na specifične DNA sekvence u promotorskoj regiji gena (Murray, 2016). Transkripcijski faktor AP-1 podrazumijeva skupinu transkripcijskih faktora građenih kao dimer Fos i Jun proteina. Fos i Jun obuhvaćaju obitelj unutarstaničnih proteina koji se sintetiziraju kao odgovor na različite izvanstanične signale, kao što su faktori rasta, citokini i stres (Višnjić, 2010). Faktori AP-1 vežu se na element AP-1 na DNA (*TGA(C/G)TCA*) te reguliraju transkripciju brojnih gena uključenih u staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu i odgovora na podražaje (Isern i sur., 2011). Transkripcijski faktor Sp1 predstavlja protein koji se veže na element Sp1 na DNA (*GC(G/T)GG(G/A)CG*) (Nagaoka, 2001). Pretpostavljena su četiri vezna mjesta za Sp1 koja se nalaze na položajima nukleotida 71, 76, 90 i 110 uzvodno od translacijskog mjesta zbog čega se pri označavanju mjesta vezanja ispred položaja vezanja piše minus (Berlin i sur., 2011). U procesu ekspresije gena *CYP2J2*, elementi AP-1 se vežu na promotor gena i potiču njegovu ekspresiju. Vezanje proteina Sp1 ne potiče izravno ekspresiju gena već element Sp1 ima ulogu pojačivača koji pojačava aktivnost AP-1 i tako indirektno povećava ekspresiju gena. Stoga, elementi AP-1 i Sp1 zajedno imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena *CYP2J2* (Zhang i sur., 2017).

Tablica 1. Popis polimorfizama *CYP2J2* i njihova povezanost s aktivnosti enzima *CYP2J2 in vitro* (preuzeto i prilagođeno s www.pharmvar.org i prema Berlin i sur., 2011).

Polimorfizam	Promjena c.DNA	Enzimska aktivnost
<i>CYP2J2</i> *1	divlji tip	Normalna aktivnost
<i>CYP2J2</i> *2	c.427A>G	Smanjeni metabolizam AA i LA
<i>CYP2J2</i> *3	c.472C>T	Smanjeni metabolizam AA i LA
<i>CYP2J2</i> *4	c.575T>A	Smanjeni metabolizam AA
<i>CYP2J2</i> *5	c.1024G>A	Normalna aktivnost
<i>CYP2J2</i> *6	c.1210A>T	Smanjeni metabolizam AA i LA
<i>CYP2J2</i> *7	c.-76G>T	Smanjena transkripcija zbog gubitka veznog mjesta za Sp1
<i>CYP2J2</i> *8	c.934G>A	Nedostatak aktivnosti
<i>CYP2J2</i> *9	c.1052C>T	Normalna aktivnost
<i>CYP2J2</i> *10	c.344C>T	Smanjena funkcija

AA – arahidonska kiselina; LA – linolna kiselina

Zamjene pojedinih nukleotida u genu uzrokuju nastanak varijanti gena. Ukoliko je učestalost te varijante u populaciji > 1 %, tada se ona naziva polimorfizam (www.struna.ijhh.hr). Do sada je identificirano veći broj varijanti gena *CYP2J2*, a u Tablici 1. navedeni su oni za koje je poznat utjecaj na enzimsku aktivnost. Svi polimorfizmi posljedica su zamjene jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) koji mijenjanju gensku sekvencu, a mogu imati utjecaj i na pripadajući protein.

Sukladno Drušvu za varijacije ljudskog genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), genske varijante pišu se kao: “prefiks” “pozicija_zamjene” “referentni_nukleotid” ”>” ”novi_nukleotid”, gdje prefiks može biti g., m., c. ili n. ovisno radi li se o sekvenci genomske, mitohondrijske, kodirajuće ili nekodirajuće DNA. Proteinske varijante pišu se kao: “prefiks” “aminokiselina” “pozicija” “nova_aminokiselina”, pri čemu se kao prefiks koristi 'p' kao oznaka za protein (www.varnomen.hgvd.org)

Klinički do sada najznačajniji polimorfizam je *CYP2J2* *7 (rs890293) uzrokovan zamjenom gvanina timinom u promotorskoj regiji za Sp1 na poziciji -76 (c.-76G>T), jedino za

ovaj polimorfizam postoje dokazi povezanosti s bolesti. Budući se radi o SNP-u u nekodirajućoj regiji gena, ova varijanta ne uzrokuje promjenu u proteinu, ali mijenja sekvencu veznog mjesta za Sp1 te posljedično smanjuje aktivnost gena za 48 % (Xu i sur., 2013, Spiecker i sur., 2004). Učestalost ovog polimorfizma je različita u različitim etničkim skupinama. Najveća učestalost zabilježena je u afričkoj populaciji (14,21 %), najmanja u amiškoj (1,43 %) dok je učestalost u europskoj populaciji (bez Finaca) 7,01 % (<https://gnomad.broadinstitute.org>).

S obzirom na ulogu enzima CYP2J2, značajnost polimorfizma *CYP2J2* *7 proučavana je uglavnom kod KVB, s proturječnim rezultatima među različitim etničkim skupinama. Istraživanja su sumarno prikazana u Tablici 2. Suprotstavljena opažanja između različitih etničkih skupina donekle su očekivana zbog različitih fizioloških, okolišnih i patoloških stanja ispitanika (Aliwarga i sur., 2018). Marciante i sur. (2008) dokazali su povezanost između pojedinih polimorfizama *CYP2J2* i infarka miokarda kod bijelaca, ali zanimljivo, ne i s *CYP2J2* *7 polimorfizmom.

Tablica 2. Povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 s rizikom nastanka različitih bolesti (nadopunjeno prema Berlin i sur., 2011 te Aliwarga i sur., 2018).

Bolest	Država ili populacija na kojoj se provodilo istraživanje	Broj ispitanika: slučajevi/kontrole	Otkrivena povezanost s <i>CYP2J2</i> *7	Istraživanje
Bolest koronarnih arterija	Njemačka	289/255	Da	(Spiecker i sur., 2004)
	Njemačka	2.547/696	Ne	(Hoffmann i sur., 2007)
Koronarna bolest srca	Afroamerikanci	200//260	Da	(Lee i sur., 2007)
	Bijelci	692/493	Ne	(Lee i sur., 2007)
Infarkt miokada	Njemačka	1.350/1.197	Ne	(Hoffmann i sur., 2007)
	Kinezi Han	200/200	Da	(Liu i sur., 2007)
	Njemačka	1.000	Ne	(Börgel i sur., 2008)
	Južna Indija	287/600	Da	(Arun Kumar i sur., 2015)
Akutni koronarni sindrom i moždana ishemija	Njemačka	289/255	Ne	(Spiecker i sur., 2004)
Moždani udar	Kina	200/350	Ne	(Zhang i sur., 2008)
	Švedska	5.740	Ne	(Fava i sur., 2012)
Hipertenzija	Afroamerikanci	108/107	Ne	(Dreisbach i sur., 2005)
	Afroamerikanci	76/73	Ne	(King i sur., 2005)
	Bijelci	123/116	Da, smanjen rizik	(King i sur., 2005)
	Rusija	295/281	Da	(Polonikov i sur., 2008)
	Saudijska Arabija	116/250	Da	(Alghasham i sur., 2012)
	Južna Indija		Ne	(Arun Kumar i sur., 2015)
Astma	Rusija	215/214	Da	(Polonikov i sur., 2007)
Renotoksičnost izazvana inhibitorima kalcineurina	Bijelci	163	Ne	(Smith i sur., 2008)
Psorijaza	Turska	94/100	Da	(Hayran i sur., 2020)

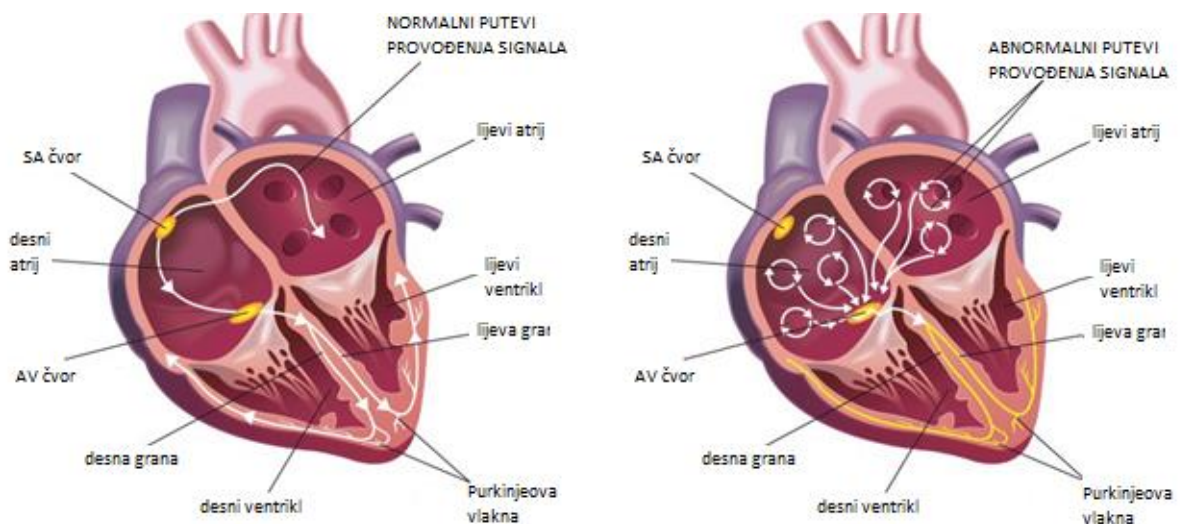
1.5. Utjecaj epoksieikozatrienske kiseline na razvoj fibrilacije atrijske

Fiziološki srčani ritam posljedica je pravilnog generiranja i provođenja akcijskog potencijala. U tome najvažniju ulogu ima tzv. neuromuskulatura srca koja se sastoji od podražajnih i vodljivih vlakana sa sposobnošću samostalnog generiranja akcijskog potencijala. Nastajanje akcijskog potencijala u neuromuskulaturi objašnjeno je povećanom propusnosti membrane za natrijeve ione zbog čega Na^+ stalno ulazi u stanicu, a kada se dosegne prag podražaja dolazi i do ulaska Ca^{2+} te kontrakcije. Repolarizacija i hiperpolarizacija postižu se izlaskom K^+ . Svaka stanica neuromuskulature stvara svoj akcijski potencijal, ali različitim frekvencijama. Zbog svojstva refrakternosti očuva se samo onaj potencijal koji se stvara najvećom frekvencijom, a on fiziološki nastaje u sinus-atrijskom (SA) čvoru zbog čega se naziva i srčani elektrogeni predvodnik. Na nastali akcijski potencijal, radna muskulatura srca koju čine atrijski i ventrikulski mišić, odgovara kontrakcijom. Bilo koji poremećaj u stvaranju ili provođenju akcijskog potencijala u srcu može uzrokovati poremećaj srčanog ritma odnosno aritmiju (Guyton i Hall, 2011; Mirat, 2003).

Fibrilacija atrijske najčešći je tip aritmije u ljudi. Karakterizira ju preplavljenost atrio-ventrikulskog provodnog sustava mnoštvom akcijskih potencijala koji se generiraju u atrijskim te gubitak funkcije SA čvora kao elektrogenog predvodnika. To rezultira neusklađenim prijenosom signala i izostankom kontrakcije; atrijske gube svoju funkciju pumpe te se smanjuje srčani udarni volumen. Ovakvo stanje posebno pogoduje nastanku tromba, a trombotički događaji jedna su od najčešćih komplikacija i uzroka smrtnosti kod pacijenata koji boluju od atrijske fibrilacije (Dubenik, 2003).

Undulacija atrijske nastaje kruženjem impulsa u atrijsku, a sastoji se od izrazito pravilnih oscilacija koje nastaju zbog usporenog provođenja signala u atrio-ventrikulskom (AV) čvoru (Dubenik, 2003). Glavna razlika između ove dvije vrste aritmija je u tome što se fibrilacija atrijske karakterizira kaotičnim, nekoordiniranim trzajevima mišića atrijske koji se kontrahiraju u nepravilnim intervalima, dok se undulacija atrijske odnosi na nepravilne, ali koordinirane valove kontrakcije atrijske. Uzroci i hemodinamičke posljedice undulacije atrijske iste su kao i fibrilacije, zbog čega se te dvije vrste aritmija i po *Međunarodnoj klasifikaciji bolesti* svrstavaju pod jednaku klasu – I48 (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2012; www.msdprirucnici.placebo.hr).

Budući da je za generiranje i provođenje električnog impulsa bitna regulacija koncentracijskog gradijenta pojedinih elektrolita, ključnu ulogu u održavanju srčanog ritma imaju ionski kanali. Posljedično, svi čimbenici s djelovanjem na ionske kanale i ravnotežu elektrolita imaju mogućnost modifikacije srčanog ritma i djelovanja na aritmije. Nedavna istraživanja pokazuju djelovanje EET na aktivnost natrijevih, ATP-osjetljivih kalijevih i L-tip kalcijevih kanala u miocitima što ih čini važnim čimbenicima u razumijevanju mehanizama srčanih aritmija (Westphal i sur., 2013). Njihova djelovanja većinom posreduje inhibicija natrijevih kanala i aktivacija kalijevih kanala što rezultira usporenim kontrakcijama srca i bradikardijom. Takvi učinci u potpunosti su suprotni mehanizmima fibrilacije atrija.



Slika 4. Razlika u fiziološkom provođenju električnog impulsa i onog kod fibrilacije atrija. (Preuzeto i prilagođeno prema www.stopafib.org).

SA čvor – sinus-atrijski čvor; AV čvor – atrio-ventrikulski čvor

Osim ključne uloge elektrolita u regulaciji srčanog ritma, u posljednje vrijeme sve se više pozornosti posvećuje i fibrozi. Kao i svaki drugi organ, i srce je podložno nastanku fibroze – složenom procesu koji uključuje povećanu aktivnost fibroblasta i proizvodnju proteina izvanstaničnog matriksa. Jednom aktivirani profibrotičkim podražajima, miofibroblasti mogu činiti i do 75 % stanica srčanog mišića. Postoje snažni dokazi koji podupiru uključenost fibroze u patofiziologiju fibrilacije atrija. Istraživanja su pokazala da srčana fibroza mijenja elektrofiziološka svojstva srčanog tkiva, uključujući produženje trajanja akcijskog potencijala i smanjenje kontraktilnosti srčanog mišića što može potaknuti razvoj aritmija. Uznapredovala fibroza atrija povezana je s češćim paroksizmima atrijske fibrilacije, transformacijom aritmije

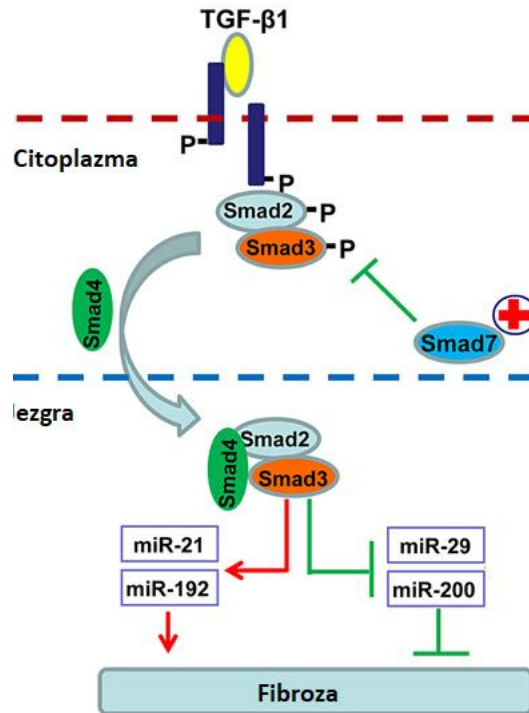
u trajni tip i smanjenom učinkovitošću antireumatskih lijekova (Xintarakou i sur., 2020). Nadalje, novi dokazi ukazuju da je fibrilacija atrijske povezana i s povećanom razinom proupalnih citokina i upalom općenito. Zbog toga smanjenje upale i reverzija strukturalnog preoblikovanja sve više postaju fokus novih terapijskih strategija za prevenciju atrijske fibrilacije.

Zbog već ranije opisanih kardioprotektivnih učinaka, enzim CYP2J2 i EET proučavani su u sklopu patofiziologije fibrilacije atrijske. Westphal i sur. (2013) prvi su izvijestili da su transgeni miševi s prekomjernom ekspresijom gena *CYP2J2* u kardiomiocitima poboljšali biosintezu EET, smanjujući razvitak aritmija i atrijske fibrilacije tijekom maladaptivne srčane hipertrofije. Dodatno, liječenje inhibitorom sEH čime je produženo djelovanje, a time i koncentracija EET, značajno je smanjilo upalu, oksidativni stres te strukturalno i električno remodeliranje atrijske. Zabilježeno je i da su EET smanjile aktivnost miofibroblasti, uzrokovale njihovu transdiferencijaciju i u konačnici smanjile srčanu fibrozu.

Ovakva djelovanja EET objašnjavaju se djelovanjem na signalni put aktivacije NF κ B i PPAR γ čime djeluju protuupalno te modulacijom signalnog puta posredovanim transformirajućim faktorom rasta β (TGF- β , engl. *transforming growth factor β*) koji djeluje kao najbitniji regulator fibroze. Svoje djelovanje ostvaruje vezanjem na receptor TGF- β koji zatim aktivira unutarstanične proteine Smad (engl. *Suppressor of Mothers against Decapentaplegic*). Oni djeluju kao transkripcijski faktori te se nakon aktivacije translociraju u jezgru i reguliraju ekspresiju gena. Smad put ima i profibrotičke i antifibrotičke učinke, ovisno o specifičnom uključenom proteinu Smad i vanjskim podražajima. Kao što je prikazano na Slici 5., Smad2/3 potiče fibrozu pojačavanjem ekspresije komponenti izvanstaničnog matriksa, dok Smad7 inhibira put Smad2/3 i ima antifibrotički učinak. U stanjima prekomjerne fibroze često je smanjena ekspresija Smad7, što dovodi do povećane aktivacije puta TGF- β / Smad2/3 (Višnjić, 2010; Xintarakou i sur., 2020).

Bitnu ulogu u kontroli ovog signalnog puta imaju i mikro RNA molekule (miRNA) koje na posttranskripcijskoj razini potiču degradaciju ili potiskuju translaciju mRNA molekula vezanjem na njihovu 3' neprevedenu regiju. Smatra se da najvažniju ulogu u doprinosu fibrozi imaju miR-21, miR-29 i miR-200. miR-21 potiče fibrozu smanjujući ekspresiju Smad7, čime se poboljšava put TGF- β / Smad2/3. Nasuprot tome, miR-29 i miR-200 imaju antifibrotičke učinke (Meng i sur., 2015; Zhang i sur., 2022).

Spomenutim istraživanjima Westphal i sur. (2013) pokazano je kako EET uzrokuju smanjenu fosforilaciju i aktivnost Smad2/3, obnavljaju ekspresiju Smad7, smanjuju inhibicijsko djelovanje miR-21, što je ukupno uzrokovalo transdiferencijaciju miofibroblasta i smanjenje atrijske fibroze. Dio antifibrotskih učinaka EET posredovan je i aktivacijom PPAR γ .



Slika 5. Signalni put TGF- β uključuje aktivaciju tirozin kinaznog receptora. Unutarstanični signalni putevi uključuju fosforilaciju Smad2/Smad3, njihovu translokaciju u jezgru, povezivanje sa Smad4 te transkripciju proteina izvanstaničnog matriksa. Obrada transkripata mi-21 ili miR-192 pogoduje translaciji, dok obrada miR-29 ili miR-200 koči daljnju translaciju i djeluje antifibrotski. Dodatno, aktivacija Smad7 inhibira fosforilaciju Smad2/Smad3 i koči korak transkripcije (preuzeto i prilagođeno prema Meng i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Fibrilacija atriya najčešći je tip aritmije u ljudi te predstavlja značajan teret za javno zdravlje, s obzirom na njezinu čestu pojavu te povezanost s povećanim rizikom od moždanog udara i srčanog zatajenja. Do sada, nekoliko je istraživanja (prikazanih u Tablici 2.) istražilo povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 s povećanim rizikom razvoja KVB – bolesti koronarnih arterija, hipertenzije, infarkta miokarda i moždanog udara, no rezultati između različitih etničkih skupina bili su proturječni.

Budući su istraživanja na životinjskim modelima pokazala kako miševi s prekomjernom ekspresijom gena *CYP2J2* imaju manju sklonost razvoja aritmija i atrijske fibrilacije pod uvjetima prekomjernog opterećenja srca (Westphal i sur., 2013) te je patofiziologija aritmija povezana s promjenama u aktivnosti ionskih kanala, fibrozom i upalom, čiji su glavni modulatori u kardiovaskularnom sustavu upravo EET, ovaj rad ima za cilj ispitati imaju li ispitanici s polimorfizmom *CYP2J2* *7 veći rizik razvoja fibrilacije atriya u hrvatskoj populaciji.

Postavljena hipoteza glasi: postoji povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 i fibrilacije atriya.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključen je 281 ispitanik iz kohorte uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-UIP-2020-02-8189, voditeljica projekta: doc. dr. sc. Tamara Božina) naziva Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova (PGx-CardioDrug). Istraživanje je odobreno od strane etičkih povjerenstava Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju i prethodno su upoznati s njegovim ciljevima. Zbog pokazane razlike u učestalosti polimorfizma u različitim etničkim skupinama, bitno je naglasiti kako su svi sudionici istraživanja Hrvati.

Prisutnost fibrilacije atrijske ili tromboze, demografski podaci o ispitanicima (dob i spol) te podaci o generalnim čimbenicima rizika za razvoj KVB (prisutnost dislipidemije, hipertenzije i šećerne bolesti) prikupljeni su iz medicinske dokumentacije ispitanika.

Nasumični uzorak ispitanika dobiven iz kohorte postignut je genotipiziranjem *CYP2J2* *7 onih ispitanika koji su na terapiji rivaroksabanom zbog fibrilacije atrijske ili duboke venske tromboze (dalje u tekstu samo „tromboza“). Budući da je fibrilacija atrijske, uz opsežne kirurške zahvate, najznačajniji rizični čimbenik za razvoj tromboze (Ciarambino i sur., 2023), ispitanici koji su imali obje bolesti isključeni su iz istraživanja.

Ispitanici su svrstani u skupinu s fibrilacijom atrijske ukoliko trenutno imaju dijagnosticiranu fibrilaciju ili undulaciju atrijske – dijagnoza I48 prema *Međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema* (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2012) ili su u prošlosti zbog tog razloga bili podvrgnuti kriozolaciji plućnih vena.

Dislipidemijom smatrano je svako odstupanje u lipidogramu uključujući dijagnoze E78.0 – E78.9 prema *Međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema* (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2012).

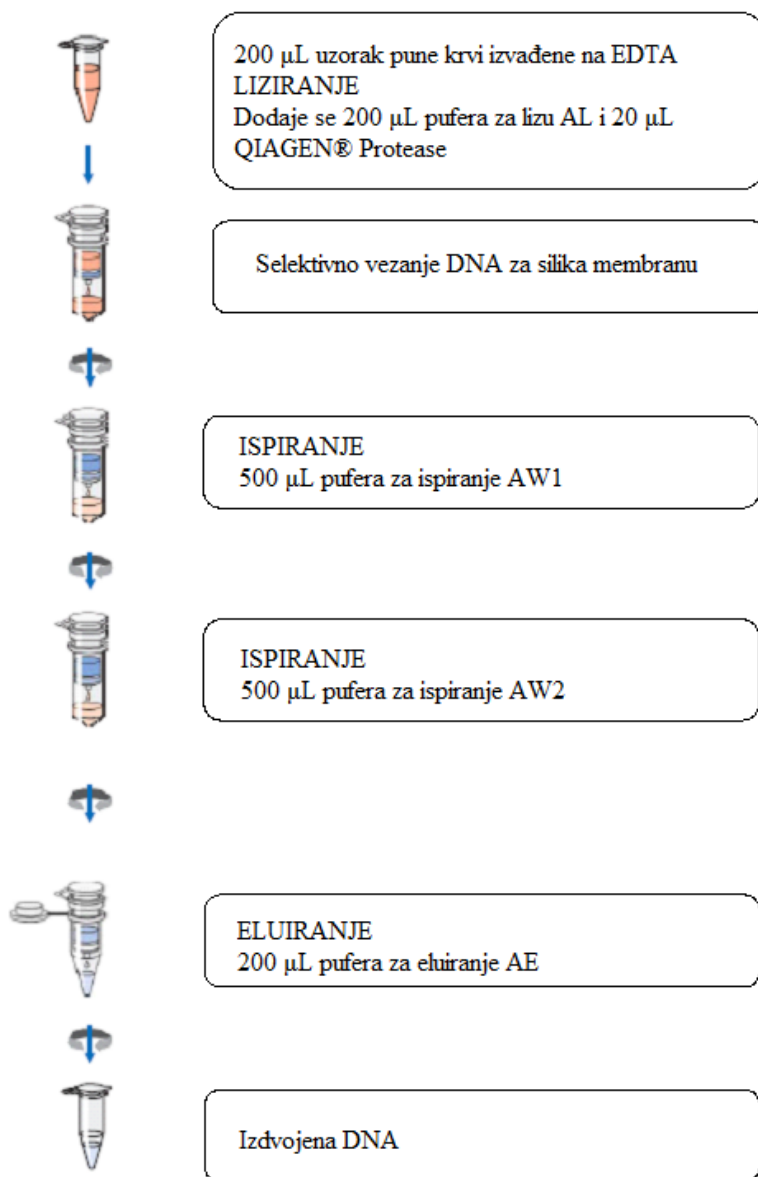
Šećerne bolesti tipa 1 i 2 te intolerancija glukoze (tzv. predijabetes) zajedno su promatrani kao šećerna bolest.

3.2. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA iz pune krvi provedo se uporabom komercijalnog kompleta reagenasa *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka) koji ima oznaku CE-IVD, u skladu s EU Direktivom 98/79/EC. Izdvojena DNA ovim kompletom reagenasa je veličine do 50 kb, a prevladavaju fragmenti od 20-30 kb.

Komplet reagenasa sastoji se od kolona za odvajanje DNA (*QIAamp® Mini Spin Columns*), epruveta za prikupljanje DNA (*Collection Tubes*, 2 mL), pufera za lizu (AL i ATL), koncentriranih pufera za ispiranje (AW1 i AW2), pufera za eluiranje (AE) te proteaze (*QIAGEN® Protease*) i otapala za proteazu. Otopina proteaze priprema se iz *QIAGEN® Protease* liofilizata dodatkom 1,2 mL otapala. Puferi AW1 i AW2 resuspendiraju se u prikladnom volumenu 96 % etanola.

Za oslobađanje DNA iz leukocita te odvajanje od proteina, u mikroepruvetu volumena 1,5 mL pipetira se 200 µL pufera za lizu AL, 20 µL *QIAGEN® Protease* te 200 µL pune krvi ispitanika. Smjesa se promiješa pomoću vrtložne miješalice do homogenizacije te inkubira na 56 °C tijekom 10 minuta. Dodaje se 200 µL 96 % etanola, ponovno se promiješa na vrtložnoj miješalici i kratko centrifugira. Smjesa se zatim pipetira na *QIAamp® Mini Spin* kolonu smještenu u epruvetu za prikupljanje DNA volumena 2 mL te centrifugira pri 8 000 okretaja u minuti tijekom 1 minute. Bitno je provjeriti nakon centrifugiranja je li kolona “prazna“, odnosno je li cijeli lizat prošao kroz nju u mikroepruvete za prikupljanje filtrata. Pufer za lizu AL sadrži kaotropne soli (gvanidijev klorid), a pri takvim uvjetima visoke ionske jakosti i $\text{pH} < 7$, DNA se selektivno veže za silika membranu, dok se proteini i ostala onečišćenja ispiru. Eluat se nakon centrifugiranja odbacuje, a kolona se premješta u novu epruvetu od 2 mL. Na kolonu se zatim dodaje 500 µL pufera za ispiranje AW1 te ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Eluat se ponovno odbacuje, a kolona se premješta u novu epruvetu za sakupljanje. Na kolonu se dodaje 500 µL pufera za ispiranje AW2 te centrifugira pri 14 000 okretaja u minuti tijekom 3 minute. Ovi koraci ispiranja DNA puferima za ispiranje AW1 i AW2 omogućuju odvajanje DNA od zaostalih proteina i drugih nečistoća. Prema preporuci proizvođača, kolona se premješta u novu mikroepruvetu od 2 mL te još jednom centrifugira 1 minutu pri 14 000 okretaja u minuti kako bi se uklonio sav potencijalno zaostali pufer za ispiranje AW2.



Slika 6. Izdvajanje DNA uporabom komercijalnog kompleta reagenasa *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka) (preuzeto i prilagođeno prema *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 2016., Qiagen, Hilden, Njemačka).

Kolona se zatim premješta u novu mikroeprevetu od 1,5 mL nakon čega se dodaje 200 µL pufera za eluiranje AE. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom 1 minute, kolona se centrifugira na 8 000 okretaja u minuti tijekom 1 minute. Dobiveni eluat sadrži izdvojenu DNA koja se pohranjuje na 2 – 8 °C do analize. Duljina izolirane DNA iznosi do 50 000 parova baza (www.qiagen.com). Shema izdvajanja je prikazana na Slici 6.

3.3. Određivanje čistoće i koncentracije izolirane DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 260 i 280 nm. Metoda je brza i jednostavna jer nisu potrebni dodatni reagensi, a za mjerenje je korišten spektrofotometar NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Za kalibriranje uređaja je kao slijepa proba primijenjen TE pufer čime se uklonio odziv instrumenta na sastavnice matriksa. Neposredno prije mjerenja, uzorak je potrebno promiješati do homogenizacije DNA te se takav homogeniziran uzorak pipetira (1 µL) na uređaj.

A) Koncentracija DNA izračunava se na temelju optičke gustoće (OD, engl. *optical density*) otopine pri valnoj duljini od 260 nm prema sljedećoj formuli:

$$\text{koncentracija DNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

OD₂₆₀ – optička gustoća uzorka na 260 nm; 50 µg/mL – koncentracija dvolančane DNA koja odgovara OD₂₆₀ od 1 (Barbas i sur., 2007).

B) Čistoća izolirane DNA procjenjuje se na temelju omjera apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) budući da apsorbancija na 260 nm odgovara apsorpcijskom maksimumu DNA, a na 280 nm nalazi se apsorpcijski maksimum aromatskih aminokiselina i proteina. Omjer apsorbancija A₂₆₀/A₂₈₀ od 1,7 – 1,9 ukazuje na visoku čistoću DNA bez prisutnosti proteina. Nizak omjer (< 1,7) ukazuje na kontaminaciju uzorka DNA s proteinima.

3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (PCR)

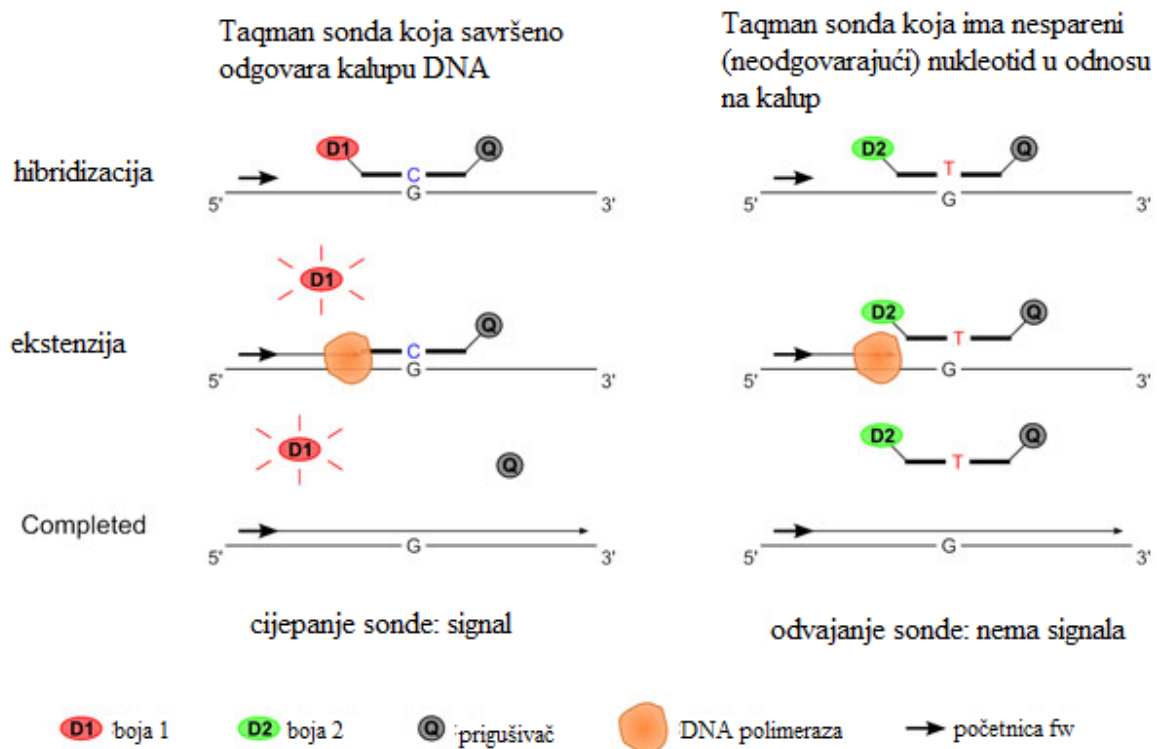
Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) naziv je metode koja se koristi za izuzetno brzo i precizno umnožavanje specifičnih dijelova DNA iz male količine početnog uzorka DNA. Svaki se ciklus PCR sastoji od 3 koraka – denaturacije, sljepljivanja početnica i elongacije, koji se provode u različitim uvjetima temperature i vremena. Denaturacija predstavlja korak razdvajanja dvolančane DNA u pojedinačne lance djelovanjem visoke temperature, a obično se provodi 20 s na 94 °C. Jednom kada su lanci DNA razdvojeni, na njih se mogu vezati komplementarne oligonukleotidne sekvence koje se nazivaju početnice. Početnice se odabiru ovisno o sekvenci DNA koja se želi umnožiti, trebaju biti komplementarne krajnjim regijama DNA koje omeđuju ciljnu sekvencu. Ukupno se koriste dvije različite početnice – jedna komplementarna vodećem, a druga komplementarna tromom lancu DNA. Sljepljivanje početnica obično se odvija na temperaturi od 55 °C tijekom 20 s. Korak elongacije odnosno sinteze komplementarnog lanca DNA ugradnjom određenih deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) od 5' prema 3' kraju kataliziran je Taq polimerazom. Specifičnost ove polimeraze jest što je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* zbog čega je stabilna pri visokim temperaturama koje su neophodne za PCR. Preporučena optimalna duljina sekvence za umnažanje iznosi 150 – 200 parova baza kako tijekom reakcije ne bi došlo do umetanja pogrešnih nukleotida što je izuzetno bitno. Uobičajeno se elongacija provodi tijekom 30 s na temperaturi od 72 °C, budući je to optimalna temperatura za aktivnost Taq polimeraze. Broj novosintetiziranih lanaca može se iskazati kao 2^n , pri čemu je n broj ciklusa PCR-a.

Ovakva izvedba PCR-a omogućuje isključivo umnažanje početnog kalupa DNA te je za bilo kakve dodatne informacije o toj sekvenci DNA potrebno pristupiti dodatnim analizama. Zbog toga su osmišljene različite modifikacije PCR-a u kojima se istovremeno može umnažati ciljna sekvenca DNA, ali i dobiti određena informacija o njoj.

Jedna od najpoznatijih modifikacija PCR-a jest kvantitativni PCR (qPCR, engl. *quantitative PCR*) ili PCR u stvarnom vremenu, koji omogućuje kontinuiranu analizu produkata za vrijeme njihove amplifikacije. Jedna od poznatijih izvedbi qPCR-a je Taqman® metoda. Ona u svojoj izvedbi dodatno zahtjeva Taqman® sonde koje su kratki jednolančani oligonukleotidi komplementarni slijedu nukleotida unutar sekvence DNA koja se želi umnožiti i za nju se vežu istovremeno s početnicama. Ove sonde na jednom kraju imaju vezanu fluorescentnu boju koju

registrira detektor, a na drugom prigušivač. Prigušivač ima svojstvo apsorpcije valne dulje emitirane fluorescencije ukoliko se nalazi na udaljenosti od nekoliko nanometara (10-100 Å). To znači sljedeće, ukoliko su fluorescentna boja i prigušivač međusobno blizu – odnosno vezani na istu sondu, doći će do potpune apsorpcije fluorescencije i ona se neće bilježiti. Ta se pojava naziva fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET, engl. *fluorescence energy resonance transfer*). Prigušivač nakon toga emitira zračenje, ali na drugoj valnoj dulji koja se ne detektira. Osobina nekih polimeraza jest, osim što imaju 3'→5' endonukleaznu aktivnost kojom ugrađuju dNTP-ove u rastući lanac, također imaju i 5'→3' egzonukleaznu aktivnost koja im omogućuje kidanje dNTP-ova koji se nalaze ispred njih. Upravo tu aktivnost posjeduje i Taq polimeraza, a omogućuje joj kidanje TaqMan® sonde koja se nalazi vezana na DNA sekvenci ispred nje. Tada dolazi do razdvajanja fluorescentne boje i prigušivača te se detektira fluorescencija.

Specifičnost ove enzimske aktivnosti i ove metode jest kako će do cijepanja sonde doći samo ukoliko je ona savršeno komplementarna kalupu DNA. Ukoliko nije, tada nailaskom Taq polimeraze neće doći do njenog cijepanja već jednostavno do odvajanja kompletne sonde s kalupa (Slika 7.). To svojstvo koristi se pri pronalaženju točkastih mutacija u ciljanoj sekvenci. Upravo zbog toga što se test temelji na cijepanju sonde djelovanjem 5'→3' egzonukleazne aktivnosti polimeraze, ova metoda ponekad se naziva i 5'- nukleazni test.



Slika 7. U TaqMan® metodi koriste se dvije sonde koje se razlikuju po vezanoj fluorescentnoj boji i slijedu nukleotida. Ovisno o tome koja sonda je komplementarna DNA lancu koji se umnaža, doći će do očitavanja samo jedne fluorescentne boje (homozigoti divljeg ili mutiranog tipa) ili obje fluorescentne boje (heterozigoti) (preuzeto i prilagođeno prema www.applied-maths.com).

3.5. Genotipizacija alela *CYP2J2* *7

U ovom radu qPCR-om temeljenom na TaqMan® principu genotipiziran je alel *CYP2J2* *7 (rs890293). U odsutnosti alela *7, rezultat se izražava kao *1, što predstavlja divlji tip (engl. *wild type*, *wt*). Ova analiza ne isključuje postojanje drugih varijantnih alela.

Primijenjen je *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping (TaqMan® DME) Assay CYP2J2* *7 (ID C_30760106_10; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji sadrži specifične početnice za umnažanje dijela gena *CYP2J2* i dvije TaqMan® MGB sonde za detekciju alela *1 i *7. Sekvenca koja se umnaža i označava sondama VIC/FAM je TCCAGATTTGACCATTAGATGCCCA[A/T]TCAAGCTGATATTTCTGACTTTGG. Obje TaqMan® MGB sonde na 3'-kraju imaju prigušivač, a na 5'-kraju fluorescentnu boju – boja VIC® nalazi se na sondi komplementarnoj alelu divljeg tipa, a boja FAM® na sondi komplementarnoj alelu *CYP2J2* *7. Dizajn sonde MGB (engl. *minor groove binder*) povećava temperaturu mekšanja i omogućuje sintezu kraćih sonde uz zadržavanje točne alelne diskriminacije.

Prisutnost određenog fluorescentnog signala VIC® i/ili FAM® ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela kao što je prikazano na Slici 8. Sonda čiji slijed nije komplementaran slijedu baza u genu neće se razgraditi, što rezultira odsustvom tog signala. Oba prisutna alela ukazuju na heterozigotni genotip.

Drugi upotrijebljavani reagens je *TaqMan® Genotyping Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji sadrži sve komponentne potrebne za bilo koji PCR – ultra čistu AmpliTaq Gold® DNA polimerazu, dNTP-ove, ROX™ Passive Reference i pufer. Oba reagensa pohranjuju se na temperaturi 2 – 8 °C, a prije upotrebe se moraju promiješati.

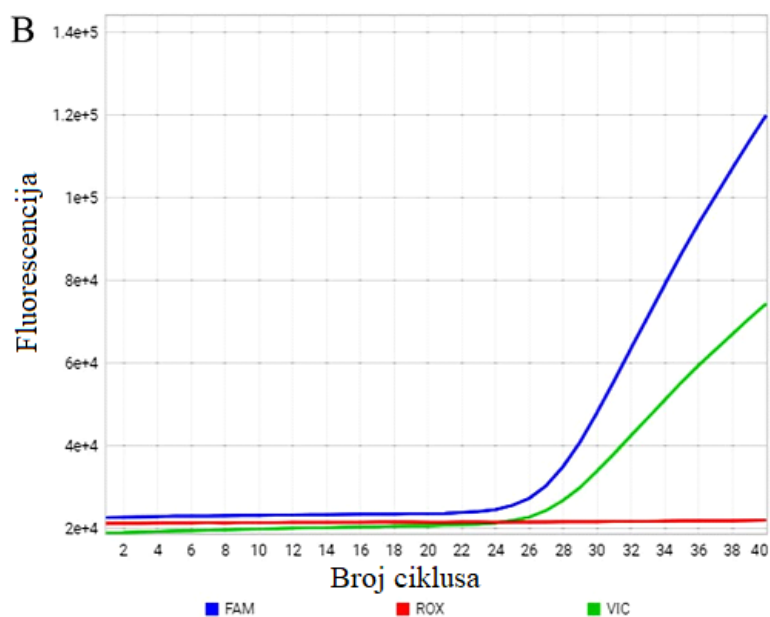
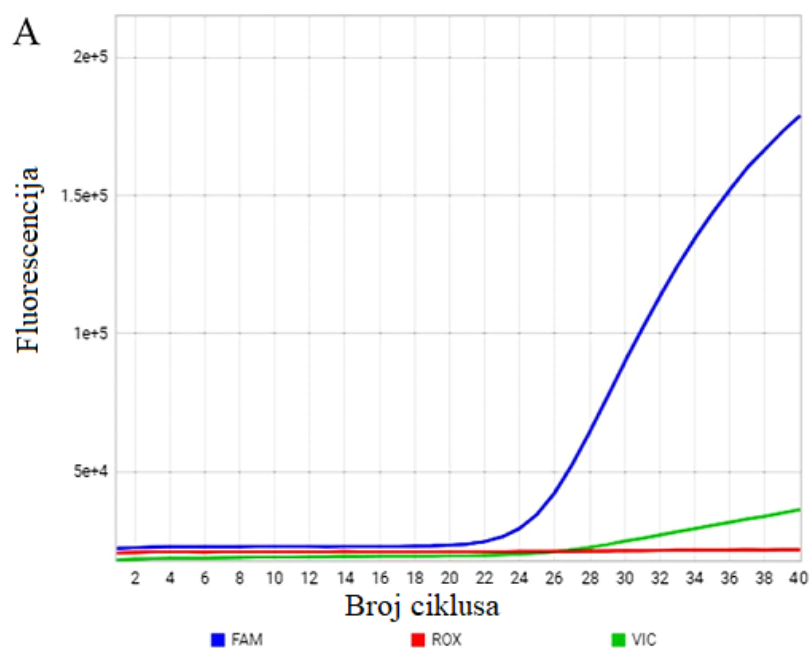
U jažice mikrotitarske pločice s 96 mjesta pipetira se 11,25 µL uzorka DNA, prethodno razrijeđenog s destiliranom vodom za PCR kako bi količina DNA bila između 1 i 10 ng, 12,5 µL *TaqMan® Genotyping Master Mix* te 1,25 µL *TaqMan® DME Assay CYP2J2* te konačni volumen PCR smjese iznosi 25 µL. Mikrotitarska pločica zatvara se pokrovnom optičkom folijom te centrifugira 3 – 5 s pri 3 000 okretaja u minuti.

Na svakoj se pločici osigurava negativna kontrola u kojoj se umjesto uzorka DNA dodaje jednak volumen destilirane, sterilne vode za PCR te pozitivne kontrole za genotipove *1/*1, *7/*7 i *1/*7.

Za izvođenje PCR-a korišten je uređaj 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), a uvjeti PCR-a prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti PCR-a za genotipiziranje alela *CYP2J2* *7.

	Pre-PCR	Inicijacija	Denaturacija	Sljepljivanje početnica i elongacija	Post-PCR
Temperatura/ trajanje	50 °C/ 2 min	95 °C/ 10 min	95 °C/ 15 s	60 °C/ 90 s	60 °C/ 60 s
			50 ciklusa		



Slika 8. Prikaz rezultata TaqMan® PCR-a. Na slici A, vidljiv je porast samo jedne fluorescentne boje (FAM®) kojom se otkriva alel *CYP2J2* *7 što upućuje da je ispitivana osoba homozigot za ispitivani polimorfizam. Na slici B vidljiv je porast obje fluorescentne boje (i FAM® i VIC®) što upućuje na osobu koja je heterozigotni nositelj alela *7. Ukoliko bi došlo do porasta fluorescencije samo VIC® boje, osoba bi bila homozigot divljeg tipa (*1/*1).

3.6. Statistička analiza

Dob ispitanika iskazana je kao medijan (interkvartilni raspon), a pravilnost razdiobe ispitana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlika u dobi između skupina ispitana je Mann-Whitneyjevim U-testom. Kategoričke varijable prikazane su kao apsolutna i relativna frekvencija (u obliku postotka). Za određivanje razlika u kategoričkim varijablama korišten je χ^2 test ili Fisherov egzaktni test (zbog male učestalosti polimorfizma u populaciji). Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitano je korištenjem GeneCalc (www.gene-calc.pl). Razina statističke značajnosti u svim je analizama određena na 5 %.

Zbog samo jednog ispitanika s $*7/*7$ genotipom, genotipovi $*1/*7$ i $*7/*7$ promatrani su zajedno u odnosu na $*1/*1$ genotip – tzv. dominantni genski model. Dominantni model u ovom slučaju pretpostavlja da je za promjenu u riziku dovoljna prisutnost samo jednog alela *CYP2J2* $*7$ odnosno da heterozigoti ($*1/*7$ genotip) i rijetki homozigoti ($*7/*7$ genotip) imaju jednak učinak na vjerojatnost razvoja fibrilacije atrijske. Ovaj model često se koristi zbog povećanja statističke snage, a posebno je primjeren za *case-control* studije u kojima postoje samo dva fenotipa (Liu i sur., 2021).

Stepwise predikcijom modela logističke regresije utvrđene su nezavisne varijable koje su se pokazale najznačajnije za vjerojatnost razvoja fibrilacije atrijske. Rezultati su prikazani u obliku omjera izgleda (OR, engl. *odds ratio*) i 95 %-tnoga intervala pouzdanosti (95% CI, engl. *confidence interval*) te su iskazani regresijski koeficijenti (β) i standardne pogreške.

Za statističku obradu podataka primijenjen je RStudio v2023.06.0+421 (www.rstudio.com).

4. REZULTATI

4.1. Opća obilježja ispitanika

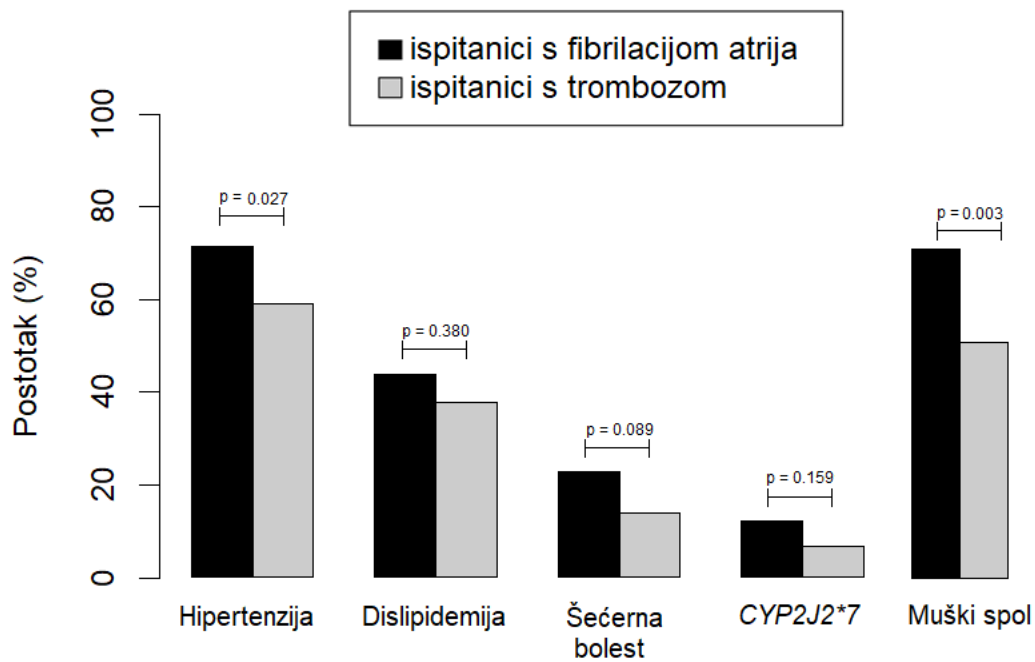
U istraživanju je ukupno sudjelovao 281 ispitanik, od čega su 112 bile žene, a 169 muškarci. Fibrilaciju atrijsku ukupno je imalo 179 ispitanika, a trombozu 102.

Demografski podaci o ispitanicima (dob i spol) te prisutnost uobičajenih čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti prikazani su apsolutnim frekvencijama u Tablici 4. te grafički (odgovarajućim postotkom) na Slici 9. Varijable su iskazane za cijelu skupinu te za svaku podskupinu ispitanika zasebno. Podaci o dobi testirani su na normalnost Shapiro-Wilkovim testom ($p < 0,01$) te je razlika u dobi ispitanika Mann-Whitneyjevim U-testom. Vidljivo je kako su ispitanici s fibrilacijom atrijskom starije životne dobi. χ^2 testom pokazana je razlika u spolnoj zastupljenosti i prisutnosti hipertenzije. Svi statistički značajni rezultati su naznačeni debljim tiskom („*bold*“) u tablicama.

Tablica 4. Klinička obilježja ispitanika i usporedba skupina s fibrilacijom atrijskom i trombozom.

	Svi ispitanici (N = 281)	Ispitanici s fibrilacijom atrijskom (N = 179)	Ispitanici s trombozom (N = 102)	p- vrijednost
Dob (IQR)	67 (59 – 75)	68 (60 – 75)	64 (49 – 73)	0,018[†]
Muški/ženski spol	169/112	120/59	49/53	0,003*
Hipertenzija	200	136	64	0,027*
Dislipidemija	124	83	41	0,380*
Šećerna bolest	58	43	15	0,089*

IQR – interkvartilni raspon; N – broj ispitanika; [†] Mann-Whitneyjev U-test; * χ^2 test



Slika 9. Grafički prikaz razlike u skupinama ispitanika s fibrilacijom atrijske i trombozom u hipertenziji, dislipidemiji, šećernoj bolesti, prisutnosti barem jednog alela *CYP2J2* *7 (*1/*7 ili *7/*7 genotip) te spolu.

4.2. Distribucija genotipova i alela

U Tablici 5. prikazana je učestalost pojedinih genotipova te učestalost alela manje učestalosti (*minor*) istraživanog polimorfizama u ukupnoj populaciji i svakoj podskupini zasebno. Učestalost *minor* alela *7 (T) je 6,70 % u skupini ispitanika s fibrilacijom atrijske, odnosno 3,43 % u skupini ispitanika s trombozom. Fisherovim egzaktnim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji alela odnosno distribuciji genotipova među skupinama.

Tablica 5. Frekvencija alela i distribucija genotipova među ispitanicima s fibrilacijom atrijske i trombozom.

	Svi ispitanici (N = 281)	Ispitanici s fibrilacijom atrijske (N = 179)	Ispitanici s trombozom (N = 102)	p-vrijednost
*7/*7	1 (0,4 %)	1 (0,6 %)	0	/
*1/*7	29 (10,3 %)	22 (12,3 %)	7 (6,9 %)	0,220 [‡]
*1/*1	251 (89,3 %)	156 (87,2 %)	95 (93,1 %)	0,159 [‡]
*7/*7 + *1/*7	30 (10,7 %)	23 (12,8 %)	7 (6,9 %)	
*7	31 (5,5 %)	24 (6,7 %)	7 (3,4 %)	0,125 [‡]
*1	531 (94,5 %)	334 (93,3 %)	197 (96,6 %)	

N – broj ispitanika; [‡] – Fisherov egzaktni test

Proveden je egzaktni test Hardy-Weinbergove ravnoteže te istraživani polimorfizam nije odstupao od ravnoteže niti u cijelom uzroku ($p = 0,986$), niti u skupinama s fibrilacijom atrijske ($p = 0,973$) i trombozom ($p = 0,938$) zasebno.

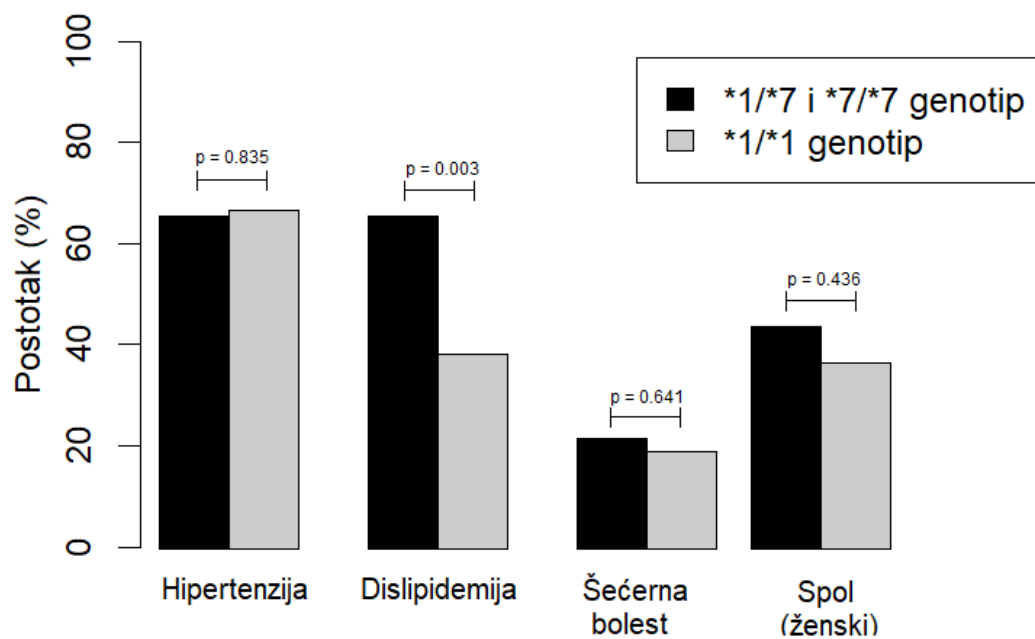
4.3. Obilježja ispitanika s obzirom na prisutnost alela *CYP2J2* *7

Ispitana je razlika u demografskim podacima ispitanika (dob i spol) te prisutnosti rizičnih komorbiditeta za razvoj kardiovaskularnih bolesti s obzirom na genotip te su rezultati prikazani apsolutnim frekvencijama u Tablici 6. i grafički u obliku odgovarajućeg postotka na Slici 10. Osim kod dislipidemije ($p < 0,01$), nije uočena statistički značajna razlika u ostalim varijablama. Budući da podaci za dob u skupini ispitanika s genotipom *1/*1 ne slijede normalnu razdiobu (Shapiro-Wilkov test, $p < 0,01$), razlika je ispitana Mann-Whitneyjevim U-testom.

Tablica 6. Usporedba kliničkih obilježja ispitanika s obzirom na genotip.

	Ispitanici s *1/*7 ili *7/*7 genotipom (N = 30)	Ispitanici s *1/*1 genotipom (N = 251)	p-vrijednost
Dob (IQR)	65,5 (55,25 – 75,5)	67 (59 – 75)	0,309 [†]
Muški/ženski spol	16/14	153/98	0,436 [‡]
Hipertenzija	21	179	0,835 [‡]
Dislipidemija	21	103	0,003[‡]
Šećerna bolest	7	51	0,641 [‡]

IQR – interkvartilni raspon; N – broj ispitanika; [‡] – Fisherov egzakti test; [†] – Mann-Whitneyjev U-test



Slika 10. Grafički prikaz razlike u skupinama ispitanika s **1/*1* genotipom i **1/*7* ili **7/*7* genotipom u hipertenziji, dislipidemiji, šećernoj bolesti i spolu. Statistički značajna razlika vidljiva je samo u zastupljenosti dislipidemije.

4.4. Model logističke regresije za predviđanje vjerojatnosti nastanka fibrilacije atrijske

Selekcija nezavisnih varijabli za model logističke regresije određena je korištenjem *Stepwise* procedure te su se za predikciju razvoja fibrilacije atrijske najboljima pokazali dob, spol i prisutnost polimorfizma *CYP2J2* *7.

Tablica 7. Model logističke regresije pokazao je dob, spol i prisutnost polimorfizma *CYP2J2* *7 kao nezavisne rizične faktore za razvoj fibrilacije atrijske.

	β	Standardna devijacija	p-vrijednost	OR (95% CI)
Odsječak	-2,911	0,679		
Prisutnost polimorfizma (genotip *1/*7 ili *7/*7)	0,942	0,468	0,045	2,563 (1,072 – 6,885)
Dob	0,042	0,011	< 0,001	1,043 (1,022 – 1,066)
Muški spol	1,097	0,278	< 0,001	2,962 (1,750 – 5,066)

CI – interval pouzdanosti; OR – omjer vjerojatnosti

4.5. Spolna razlika

S obzirom na spol kao rizičan čimbenik razvoja fibrilacije atrijske, ali i prisutne značajne razlike u omjeru muških i ženskih ispitanika u cijeloj studiji te skupini ispitanika s fibrilacijom atrijske, napravljena je analiza kliničkih obilježja i genotipova ispitanika prikazana u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz kliničkih karakteristika i frekvencije genotipa **1/*7+*7/*7* po skupinama ovisno o spolu.

	Muškarci (N = 169)			Žene (N = 112)		
	S fibrilacijom atrijske (N = 120)	S trombozom (N = 49)	p-vrijednost	S fibrilacijom atrijske (N = 53)	S trombozom (N = 49)	p-vrijednost
Dob (IQR)	65 (57,75 – 74)	64 (44 – 73)	0,130 [†]	72 (66,50 – 76,50)	66 (58 – 75)	0,023[†]
Hipertenzija	90 (75 %)	29 (59,2 %)	0,063*	46 (86,8 %)	35 (71,4 %)	0,2320*
Dislipidemija	61 (50,8 %)	17 (34,7 %)	0,082*	22 (41,5 %)	24 (49,0 %)	0,505*
Šećerna bolest	33 (27,5 %)	9 (18,4 %)	0,294*	10 (18,9 %)	6 (12,2 %)	0,562*
<i>*1/*7 ili *7/*7</i> genotip	12 (10,0 %)	4 (8,2 %)	~ 1 [‡]	11 (20,8 %)	3 (6,1 %)	0,047[‡]

IQR – interkvartilni raspon; N – broj ispitanika; [‡] – Fisherov egzakti test; [†] – Mann-Whitneyjev U-test; * – χ^2 test

Budući da se prisutnost polimorfizma u skupinama razlikovala samo kod žena ($p = 0,047$), dok je kod muškaraca distribucija između skupina bila jednaka ($p \sim 1$), model logističke regresije ispitan je samo za žene te su rezultati prikazani u Tablici 9.

Značajnima su se pokazali samo dob i prisutnost barem jednog *7 alela. Žene s prisutnim *CYP2J2* *7 alelom imale su 4 puta veću vjerojatnost razvoja fibrilacije atriya nego one s *1/*1 genotipom.

Tablica 9. Model logističke regresije za ženski spol pokazao je dob i prisutnost polimorfizma *CYP2J2* *7 kao nezavisne rizične faktore za razvoj fibrilacije atriya.

	β	Standardna devijacija	p-vrijednost	OR (95% CI)
Odsječak	-4,483	0,679		
Prisutnost polimorfizma (genotip *1/*7 ili *7/*7)	1,389	0,021	0,047	4,010 (1.1266 – 19.0414)
Dob	0,06	0,699	0,002	1,067 (1.0273 – 1.1142)

CI – interval pouzdanosti; OR – omjer vjerojatnosti

5. RASPRAVA

5.1. Značajnost polimorfizma *CYP2J2* *7 u vjerojatnosti nastanka fibrilacije atrijske

Cilj ovog rada bio je istražiti potencijalnu povezanost polimorfizma gena *CYP2J2* i fibrilacije atrijske u Hrvata. Genotipiziran je 281 ispitanik te razvrstan u skupinu s fibrilacijom atrijske ili trombozom. Iako je identificirano više od 10 varijanti gena *CYP2J2* koje uzrokuju smanjenu ekspresiju ili smanjenu aktivnost enzima, čime posljedično utječu i na koncentraciju njegovih metabolita, genotipiziranje je provedeno samo za alel *CYP2J2* *7. Ustanovljeno je kako taj polimorfizam u promotoru gena ima veću učestalost u populaciji zbog čega i veću vjerojatnost doprinosi riziku nastanka KVB. Učestalost polimorfizama u kodirajućem dijelu gena iznosi < 1 % (Lee i sur., 2007), dok se učestalost alela *CYP2J2* *7 u različitim etničkim skupinama kreće između 1,1 - 17 %. U populaciji Nijemaca i Španjolaca, koji su vjerojatno najbliže ovoj ispitivanoj populaciji, učestalost iznosi 6,5 % i 6,7 %, redomice (Gervasini i sur., 2006; Hoffman i sur., 2007). S obzirom na relativno mali broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje, ostale varijante nije niti imalo smisla određivati.

Prema pretraženim literaturnim izvorima objavljenim do pisanja ovoga rada, učestalost *CYP2J2* *7 polimorfizma nije određivana u Hrvatskoj te ovaj rad prvi daje predodžbu o njenoj očekivanoj frekvenciji. Učestalost varijantnog alela *7 u cijeloj ispitivanoj populaciji iznosi 5,51 % (95 % CI: 3,51 – 7,51) što odgovara naslućivanju. Međutim, ovaj podatak treba uzeti s oprezom budući studija nema reprezentativan uzorak cijele hrvatske populacije. Dodatno, svi ispitanici imaju neku kardiovaskularnu bolest zbog koje su na terapiji rivaroksabanom. Prema Tablici 2., vidljivo je kako rezultati istraživanja učestalosti polimorfizma *CYP2J2* u pojedinim podskupinama ispitanika s nekom KVB pokazuju proturječne rezultate.

U ovom je radu ispitana razlika u učestalosti polimorfizma *CYP2J2* *7 između ispitanika s fibrilacijom atrijske i ispitanika s trombozom. Ispitanici s trombozom uzeti su iz nekoliko razloga. Prvo, odabirom ispitanika na terapiji rivaroksabanom, koji su ispitanici uzimali zbog jednog od gornja dva stanja, omogućilo se uzimanje nasumičnog uzorka ispitanika. Drugo, tromboza ima jednake čimbenike rizika kao i ostale KVB, uključujući i fibrilaciju atrijske, a koje podrazumijevaju prisutnost dislipidemije (povišene razine ukupnog

kolesterola, lipoproteina niske gustoće, triglicerida ili snižene razine lipoproteina visoke gustoće), šećerne bolesti, hipertenzije, pušenja i dr. (Ageno i sur., 2008; Benjamin i sur., 1994). Na taj se način povezanost *CYP2J2* *7 s fibrilacijom atrijske pretile procjenjuje neovisno o ostalim čimbenicima rizika za razvoj KVB. Treće, gen *CYP2J2* nije eksprimiran u venama (s iznimkom u varikoznim venama) te zbog toga nikako ne može biti uključen u etiologiju tromboze (Askari i sur., 2013). Stoga su dobiveni podaci specifičniji za povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 sa srčanim bolestima, odnosno u ovom slučaju, fibrilacijom atrijske pretile uz jednake ostale čimbenike rizika za razvoj KVB.

Istraživanje nije dizajnirano kao *case-control*, odnosno skupine nisu ujednačene po dobi i spolu niti su ti parametri bili isključni kriteriji. Obilježja regrutiranih ispitanika stoga reflektiraju obilježja cijele populacije pacijenata s KVB na terapiji rivaroksabanom. Drugim riječima, moguće je procjenjivati povezanost dobi i spola s pojedinom bolesti budući da njihova razdioba nije posljedica kriterija uključivanja, nego nasumičnog odabira reprezentativnog uzorka.

Medijan dobi ispitanika iznosi 67 godina (IQR: 59 – 75) što je u skladu s činjenicom kako je starija dob rizični čimbenik za razvoj KVB. Utjecaj spola razlikuje se za trombozu i fibrilaciju atrijske pretile. Istraživanja su tako pokazala da muškarci i žene imaju jednaku vjerojatnost razvoja tromboze (www.venousforum.org), dok je vjerojatnost razvoja fibrilacije atrijske pretile veća za muškarce (OR: 1,5) (Benjamin i sur., 1994). To je u skladu i s obilježjima ispitanika (prikazanima u Tablici 4.) ove studije u kojima je omjer muškaraca i žena u skupini s fibrilacijom atrijske pretile iznosio 2:1, a u skupini s trombozom 1:1.

Kako je već napomenuto, rizični čimbenici za razvoj fibrilacije atrijske pretile i tromboze jednaki su kao i za ostale KVB. Stoga ne iznenađuje nalaz nedostatka razlike u prisutnosti komorbiditeta dislipidemije i šećerne bolesti između skupina. Iako je χ^2 testom utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti hipertenzije, ona se nije pokazala značajnom u multivarijantnoj logističkoj regresijskoj analizi (v. Tablica 7.). Svakako treba imati na umu da ova studija nije obuhvatila sve rizične čimbenike kao što su npr. pušački status i pretilost.

Analizirano samo Fisherovim egzaktnim testom, nije pronađena značajna razlika u distribuciji pojedinih alela niti genotipova (Tablica 5.). Međutim, radi se o multifaktorskim bolestima zbog čega je bitno identificirati nezavisne varijable povezane s bolestima, primjerice modelom logističke regresije. Kao što je prikazano u Tablici 4., nezavisnim čimbenicima

pokazali su se dob (OR: 1,043; 95 % CI: 1,022 – 1,066), muški spol (OR: 2,962; 95 % CI: 1,750 – 5,066) te prisutnost barem jednog alela *CYP2J2* *7 (OR: 2,563; 95 % CI: 1,072 – 6,885). Dakle, nakon korekcije za dob i spol, uspoređujući skupine s jednakim čimbenicima rizika za razvoj KVB, jedino se prisutnost alela *CYP2J2* *7 pokazala statistički značajnim čimbenikom povezanim s fibrilacijom atrijske.

Iako podaci ne omogućuju uvid u kauzalnost prisutnosti *CYP2J2* *7 alela i razvoja fibrilacije atrijske, ovakvi rezultati zasigurno su dosljedni s elaboriranom zaštitnom ulogom EET u srcu. Pojedinci s *CYP2J2* *7 alelom tako imaju manju bazalnu transkripcijsku aktivnost gena, a pokazano je kako ona dovodi do smanjene koncentracije EET i njihovog zaštitnog djelovanja. Uzimajući u obzir multifaktorijsku prirodu fibrilacije atrijske, malo je vjerojatno da polimorfizam jednog gena može imati ključan doprinos razvoju bolesti, ali mogao bi doprinijeti disbalansu drugih proupalnih i fibrotičkih faktora. Prema pretraženim literaturnim izvorima do pisanja ovog rada, ovo je ujedno i prva studija koja istražuje potencijalnu povezanost fibrilacije atrijske i polimorfizma *CYP2J2* *7.

U studijama koje istražuju gensku povezanost s kompleksnim bolestima često se primjećuje učinak spola. Yamada i sur. (2003) proveli su istraživanje koje je obuhvatilo 112 polimorfizama u 71 genu kandidatu za predikciju rizika od razvoja infarkta miokarda. Kod muškaraca je 19 polimorfizama pokazalo statistički značajnu povezanost, dok je kod žena to bilo 18 polimorfizama. Međutim, samo su 3 polimorfizma bila jednako značajna kod oba spola.

Pinnsonneault i sur. (2003), proučavajući dostupnu literaturu o bolesti koronarnih arterija, depresiji i shizofreniji, zaključuju da farmakogenomske studije moraju uzeti u obzir jasne razlike između muškaraca i žena, budući da se genetski čimbenici rizika i determinante odgovora na terapiju vjerojatno značajno razlikuju.

Analizom studija prikazanih u Tablici 2, uočeno je kako je procjena povezanosti alela *CYP2J2* *7 s bolestima provedena zasebno za svaki spol samo u studijama Polonikov i sur. (2008) te Smith i sur. (2008), te su obje studije pokazale razlike između spolova. Studija Polonikov i sur. (2008) zaključuje kako postoji povezanost između polimorfizma *CYP2J2* *7 i hipertenzije u oba spola, pri čemu su žene nositeljice alela *CYP2J2* *7 imale nešto veći rizik. Kod muškaraca je omjer vjerojatnosti iznosio 3,78 (95 % CI: 0,90 – 15,90), dok je kod žena iznosio 5,16 (95 % CI: 1,35 – 19,63). Valja napomenuti da interval pouzdanosti za omjer

vjerojatnosti kod muškaraca uključuje 1, pa je upitno koliko je statistički značajna povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 s hipertenzijom kod muškaraca u ovoj studiji.

Smith i sur. (2008) istraživali su povezanost genotipova *CYP2C8* i *CYP2J2* s kroničnom bolešću bubrega uzrokovanom inhibitorima kalcineurina. Iako prisutnost alela *CYP2J2* *7 nije pokazala značajnu povezanost, utvrđena je povezanost s alelom *CYP2C8* *4. Omjer vjerojatnosti rizika od nastanka bolesti za sve ispitanike iznosio je 2,38 (95 % CI: 1,19 – 4,78), za muškarce 2,82 (95 % CI: 1,15 – 6,93), dok za žene nije bilo značajne razlike.

Učinak spola ispitan je i u ovom istraživanju. U podskupini muškaraca, nije pronađena statistički značajna razlika između ispitivanih parametara, a modelom logističke regresije najznačajnijima su se pokazali dislipidemija (OR: 1,906; 95 % CI: 0,957 – 3,896) i dob (OR: 1,029; 95 % CI: 1,044 – 1,0555). Dapače, alel *CYP2J2* *7 gotovo je identično raspodijeljen između dvije uspoređivane skupine ($p \sim 1$). U skupini žena, Mann-Whitneyjev U-test i Fisherov egzaktni test pokazali su statistički značajnu razliku u dobi i frekvenciji *1/*7+*7/*7 genotipa među uspoređivanim skupinama. Iako je učestalost fibrilacije atrijske manja u žena (51,96 %) nego u muškaraca (71,0 %), žene s barem jednim alelom *CYP2J2* *7 imale su 4 puta veću vjerojatnost nastanka fibrilacije atrijske (OR: 4,010; 95 % CI: 1,127 – 19,041).

5.2. Značajnost polimorfizma *CYP2J2* *7 u kliničkoj medicini

I gen *CYP2J2* i istoimeni enzim smatraju se vrlo bitnim zbog svoje uloge u održavanju kardiovaskularne homeostaze te je sam gen intenzivno proučavan u kontekstu KVB. Ipak, većina istraživanja (v. Tablica 2.) provodila se u razdoblju 2004. – 2008. godine uz iznimke istraživanja u indijskoj i švedskoj populaciji. U tom je razdoblju i nepobitno dokazano kako se gen *CYP2J2* i enzim dominantno izražava u srcu i pokazuje kardioprotektivne učinke na apoptozu kardiomiocita, ishemiju reperfuzijske ozljede, hipertrofije i zatajenja srca, a njegovi metaboliti imaju važnu ulogu u zaštiti bubrežne funkcija, ublažavanju plućne arterijske hipertenzije i plućne ishemije/reperfuzijske ozljede, slabljenju inzulinske rezistencije i regulaciji metabolizma lipida i glukoze.

Međutim, uloga *CYP2J2* puno je šira od djelovanja isključivo na kardiovaskularni sustav. Tako se u novije vrijeme fokus istraživanja stavio na protuupalno djelovanje EET, a s tim na umu provedeno je i recentno istraživanje Hayran i sur. (2020) na temu psorijaze. Budući da se *CYP2J2* eksprimira i u koži, a psorijaza podrazumijeva kroničnu upalnu bolest kože, nametnulo se pitanje povezanosti polimorfizma gena *CYP2J2* i u ovom stanju. I zaista, istraživanje je pokazalo veću učestalost genotipova *1/*7 i *7/*7 u bolesnika s psorijazom.

Iako istraživanja o vezi između polimorfizama *CYP2J2* i rizika od različitih bolesti usporavaju, sve više se raspliće njegova fiziološka uloga. Povećana ekspresija *CYP2J2* uočena je i u tumorskom tkivu, a pokazana je povezanost s tumorskim fenotipom (Chen i Wang, 2015). Gen *CYP2J2* pokazuje snažnu i selektivnu ekspresiju u tumorskom tkivu kod 101 od 130 pacijenata i u osam tumorskih staničnih linija. Ispitani su učinci takve prekomjerne ekspresije *CYP2J2* i dodavanja EET u stanične linije karcinoma *in vitro*. U četiri različite tumorske stanične linije primijećena je značajna indukcija Transwellove migracije, invazija stanica, adhezija na fibronektin, stvaranje kolonija te angiogeneza. Također se pokazalo da su stanice postale otpornije na apoptozu induciranu TNF- α . Dodatna istraživanja ukazala su na to da *CYP2J2* potiče tumorske metastaze neovisno o utjecaju na rast tumora te je potaknuo rast tumora ksenografta u modelima leukemije (Chen i Wang, 2015).

Sukladno nalazima, primjena *antisense CYP2J2* transfekcije ili dodavanje inhibitora epoksigenaze inhibirala je proliferaciju, migraciju, invaziju i adheziju stanica, te ubrzala apoptozu. Korištenjem transgenih miševa s visokim razinama endotelijalnih CYP2

epoksigenaza pokazano je da su ti enzimi i njihovi metaboliti ključni za rast primarnog tumora i metastaza u različitim mišjim modelima karcinoma (Panigrahy i sur., 2012).

Ovi svi rezultati jasno ukazuju na značajnu, ali još nedovoljno istraženu ulogu CYP2J2 u patogenezi različitih vrsta karcinoma, što može imati važne terapijske implikacije. Na primjer, Lei i sur. (2020) sugeriraju korištenje inhibitora CYP2J2 kako bi se pojačalo antitumorsko djelovanje agonista kanabinoidnog receptora 2 u gliomu, a Allison i sur. (2017) dokazali su da prekomjerna ekspresija CYP2J2 uklanja inhibicijski učinak paklitaksela na rast tumora.

Nadalje, važno je istaknuti da CYP2J2 nije bitan samo u metabolizmu endobiotika, već su kao njegovi supstrati identificirani i brojni lijekovi, što ga čini zanimljivim kandidatom za proučavanje u farmakogenomici. Primjeri lijekova koje CYP2J2 metabolizira uključuju antihistaminike (astemizol, ebastin, terfenadin), antitumorske lijekove (doksorubicin, tamoksifen, dasatinib, nilotinib, sorafenib), imunosupresive (ciklosporin A), antiaritmike (bufurarol, amiodaron), antipsihotike (tioridazin, mesoridazin), nesteroidne protuupalne lijekove (nabumeton, diklofenak), antihelmintike (albendazol, fenbendazol), te antiretrovirusne lijekove (ritonavir) (Berlin i sur., 2011; Lee i sur., 2010, Wu i sur., 2013).

Iako je CYP2J2 uključen u metabolizam svih navedenih lijekova, prije nekoliko godina se smatralo da je za njihov klirens većinom odgovoran CYP3A4. Slično djelovanje na zajedničke supstrate djelomično je objašnjeno homologijom aktivnih mjesta ova dva enzima (Lee i sur., 2010). Međutim, istraživanje Zhao i sur. (2022) otkrilo je da CYP2J2 ima dominantnu ulogu u metabolizmu rivaroksabana, direktnog oralnog antikoagulansa, čime je postignuta prekretnica u razumijevanju njegove uloge.

U farmakogenomici, cilj je identificirati polimorfne gene, poznate kao farmakogene, koji su uključeni u metabolizam lijekova. Genetička varijabilnost u metabolizmu lijekova može rezultirati različitim razinama klirensa, vremena poluživota i maksimalne koncentracije lijeka u plazmi. Stoga je cilj prilagoditi dozu lijeka genotipu pacijenta.

Nakagawa i sur. (2021) istraživali su utjecaj polimorfizma *CYP2J2* *7 na koncentraciju rivaroksabana u plazmi, ali nisu otkrili značajnu razliku u najnižim koncentracijama. Međutim, studija nije uključivala homozigotne nositelje polimorfizma *CYP2J2* *7, pa se smatra kako je potrebno istražiti i utjecaj drugih polimorfizama.

Šimičević i sur. (2023) proveli su istraživanje višestrukih čimbenika rizika za krvarenje povezano s rivaroksabanom, uključujući dob, funkciju bubrega, popratne bolesti, popratno liječenje i farmakogenetske podatke. Analizirani su polimorfizmi *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP2J2* i *CYP3A4/5* gena. Od analiziranih 16 pacijenata koji su razvili nuspojavu, njih četvero imalo je *CYP2J2* *1/*7 genotip, a njih šestero imalo je varijantu *CYP2J2* rs11572325. Za dodatne zaključke o povezanosti polimorfizama gena *CYP2J2* i sigurnosti primjene rivaroksabana, svakako je potrebno provesti opsežnija istraživanja na većem broju ispitanika. Upravo takvo istraživanje provest će se i ukvuru istraživanja na kojem je izrađen i ovaj diplomski rad.

Osim genskih polimorfizama, aktivnost enzima *CYP2J2* može biti pod utjecajem i različitih induktora i inhibitora. Ovo je posebno važno kod pacijenata koji uzimaju više lijekova, jer interakcije između lijekova mogu promijeniti farmakokinetiku lijeka i povećati rizik od nuspojava ili smanjiti učinkovitost lijeka. Iako se smatra da se aktivnost *CYP2J2* ne može inducirati ksenobioticima, neki ksenobiotici mogu inhibirati njegovu aktivnost. Na primjer, ketokonazol, lansoprazol, loratadin, mikonazol, danazol, nikardipin i verapamil mogu smanjiti aktivnost *CYP2J2* i do 90 % (Arun i sur., 2015).

Ograničenja studije

Nije ispitana učestalost polimorfizma *CYP2J2* *7 u zdravoj populaciji, bez prisustva KVB. Usporedba učestalosti opisanog polimorfizma *CYP2J2* *7 u zdravih ispitanika i ispitanika s fibrilacijom atrijske dodatno bi pridonijela rasvjetljavanju uloge enzima *CYP2J2* u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, poglavito fibrilacije atrijske.

6. ZAKLJUČCI

- Učestalost alela *CYP2J2* *7 u ovom istraživanju iznosi 5,51 % (95 % CI: 3,51 – 7,51) te je prvi podatak o učestalosti ovog polimorfizma u Hrvata. Ipak, ovaj podatak treba uzeti s oprezom budući da je dobiven na populaciji ispitanika s kardiovaskularnim bolestima te još nije utvrđeno postoji li povećana frekvencija polimorfizma u ovoj skupini.
- Ispitivane skupine ispitanika s atrijskom fibrilacijom i trombozom, zbog istih čimbenika rizika, nisu pokazale statističku značajnu razliku u učestalosti dislipidemije, hipertenzije i šećerne bolesti. Ispitanici su se razlikovali s obzirom na dob i spol. Omjer muškaraca i žena u skupinama s fibrilacijom atrijske i trombozom iznose 2:1 i 1:1, redom. Podaci su u skladu s činjenicom da se fibrilacija atrijske češće razvija u muškaraca, dok ne postoji razlika po spolu kod rizika razvoja tromboze. Medijani dobi ispitanika iznosi 62 i 67 godina, redom, te su u skladu s činjenicom da je starija životna dob još jedan rizični čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti.
- Iako se frekvencije alela i genotipova nisu razlikovale među skupinama, *stepwise* procedurom odabira nezavisnih čimbenika povezanih s fibrilacijom atrijske, utvrđeno je da je prisutnost barem jednog polimorfnog alela (genotip *1/*7 ili *7/*7) povezana s omjerom vjerojatnosti za razvoj fibrilacije atrijske 2,563 (95 % CI: 1,072 – 6,885). Drugi značajni faktori bili su dob (OR: 1,043; 95 % CI: 1,022 – 1,066) i spol (OR: 2,962; 95 % CI: 1,750 – 5,066).
- Analizom podataka po svakom spolu zasebno, utvrđeno je da kod muškaraca nema razlike u dobi te prisutnosti dislipidemije, hipertenzije, šećerne bolesti i barem jednog alela *7. Kod žena je pokazana statistički značajna razlika u dobi te, bitnije, učestalosti genotipova *1/*7 ili *7/*7 ($p = 0,047$). OR za razvoj fibrilacije atrijske kod žena s tim genotipom iznosi 4,010 (95 % CI: 1,127 – 19,041).

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AP-1	aktivator protein 1
ATP	adenozin trifosfat
AV čvor	atrio-ventrikulski čvor
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i>)
CYP	citokrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i>)
DHET	1,2-diol hidroksieikozatetraenska kiselina
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
E78	dijagnoza poremećaja metabolizma lipoproteina prema <i>Međunarodnoj klasifikaciji bolesti</i>
EET	epoksieikozatrienoične kiseline
FAM®	plava fluorescentna boja
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
HETE	hidroksieikozatetraenske kiseline
HPETE	hidroperoksi-eikozatetraenska kiselina
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i>)
IκB	inhibitor kapa B
IκK	kinaza inhibitora kapa B
IL	interleukin
I48	dijagnoza fibrilacije i undulacije atrija po <i>Međunarodnoj klasifikaciji bolesti</i>
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina
KVB	kardiovaskularne bolesti
NADPH	reducirani oblik nikotin adenin dikuleotid fosfata
NFκB	nuklearni faktor kapa B
OD	optička gustoća (engl. <i>optical density</i>)
OR	omjer vjerojatnosti (engl. <i>odds ratio</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PGG	prostaglandin G
PGH	prostaglandin H

PGI ₂	prostaglandin I ₂
PLA ₂	fosfolipaza A ₂
PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
PPAR γ	receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma (engl. <i>peroxisome proliferator – activated receptor gamma</i>)
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom
ROX®	crvena fluorescentna boja
SA čvor	sinus-atrijski čvor
sEH	topljiva epoksid hidroksilaza (engl. <i>soluble epoxid hydrolase</i>)
Smad	engl. <i>Suppressor of Mothers against Decapentaplegic</i>
Sp1	specifični protein 1
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TGF- β	transformirajući faktor rasta (engl. <i>transforming growth factor betha</i>)
TNF- α	faktor nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TXA ₂	tromboksan A ₂
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VIC®	zelena fluorescentna boja
*	χ^2 test
†	Mann-Whitneyjev U-test
‡	Fisherov test

8. LITERATURA

About the heart, 2021., www.stopafib.org, pristupljeno 20. 5. 2023.

Agno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation*. 2008, 117, 93-102.

Alghasham A, Ali A, Ismail H, Dowaidar M, Settin AA. CYP2J2 -50 G/T and ADRB2 G46A Gene Polymorphisms in Saudi Subjects with Hypertension. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012, 16, 1027-1031.

Aliwarga T, Evangelista EA, Sotoodehnia N, Lemaitre RN, Totah RA. Regulation of CYP2J2 and EET levels in cardiac disease and diabetes. *Int J Mol Sci*. 2018, 19, 1916.

Arun Kumar AS, Kumar SS, Umamaheswaran G, Kesavan R, Balachandar J, Adithan C. Association of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2J2 gene polymorphisms with myocardial infarction in South Indian population. *Pharmacological Reports*. 2015, 67, 97-101.

Askari A, Thomson SJ, Edin ML, Zeldin DC, Bishop-Bailey D. Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013, 107, 56-63.

Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Quantitation of DNA and RNA. *CSH Protoc*. 2007, 2007, pdb.ip47.

Beccacece L, Abondio P, Bini C, Pelotti S, Luiselli D. The Link between Prostanoids and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023, 24, 4193.

Beck R, Bertolino S, Abbot SE, Aaronson PI, Smirnov SV. Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Circ Res*, 1998, 83(9), 923-931.

Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA*. 1994, 271, 840-844.

Berlin DS, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary. *Pharmacogenet Genomics*. 2011, 21, 308-311.

Börgel J, Bulut D, Hanefeld C i suradnici. The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile. *BMC Cardiovasc Disord.* 2008, 8, 41.

Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Arch.* 2010, 459, 881-895.

Capdevila JH, Falck JR. The CYP P450 Arachidonic Acid Monooxygenases: From Cell Signaling to Blood Pressure Regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 285, 571-576.

Chen C, Wang DW. Cytochrome P450-CYP2 Family-Epoxygenase Role in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol.* 2015, 74, 193-221.

Dubenik M. EKG i srčane aritmije. U: Klinička patofiziologija za studente Farmaceutko-biokemijskog fakulteta. Kujundžić M i sur., urednici, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003.

Dreisbach A, Japa S, Sigel A i suradnici. The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms in African Americans With Hypertension. *Am J Hypertens.* 2005, 18, 1276-1281.

DNA and protein recommendations: substitution variants, <https://www.varnomen.hgvd.org>., pristupljeno 20. 5. 2023.

Fava C, Ricci M, Melander O, Minuz P. Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012, 98, 75-85.

Fibrilacija atrijska, 2014., www.msd-prirucnici.placebo.hr, pristupljeno 14. 5. 2023.

Gervasini G, Vizcaino S, Carrillo JA, Caballero MJ, Benitez J. The effect of CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 and the MDR1 polymorphisms and gender on the urinary excretion of the metabolites of the H₁-receptor antihistamine ebastine: a pilot study. *Br J Clin Pharmacol.* 2006, 62, 177-186.

Genome Aggregation Database (gnomAD) v3.1.2., CYP2CJ*7, <https://gnomad.broadinstitute.org>, pristupljeno 10. 6. 2023.

Grosser T, Smyth EM, FitzGerald GA. Anti-inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Agents; Pharmacotherapy of Gout. U: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Brunton LL, Chabner B, Knollman B, urednici, New York, McGraw-Hill, 2011, str 959-1005.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Elsevier Sounders, 2011, str 116-121, 147-156.

Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res.* 2018, 11, 23-32.

Hardy-Weinberg equilibrium. <https://gene-calc.pl>, pristupljeno 10. 6. 2023.

Hayran Y, Allı N, Uysal Pİ, Çandar T. Association of CYP2J2 polymorphism with susceptibility to psoriasis in Turkish population: a case–control study. *An Bras Dermatol.* 2020, 95, 25-31.

Hoffmann MM, Bugert P, Seelhorst U i suradnici. The –50G& gt, T Polymorphism in the Promoter of the CYP2J2 Gene in Coronary Heart Disease: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin Chem.* 2007, 53, 539-540.

Inflammation's Role in Obesity. <https://sites.tufts.edu>, pristupljeno 10. 5. 2023.

Imig JD. Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology. *Physiol Rev.* 2012, 92, 101-130.s

Imig JD. Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function. *Adv Pharmacol.* 2016, 77, 105-141.

Isern E, Gustems M, Messerle M, Borst E, Ghazal P, Angulo A. The Activator Protein 1 Binding Motifs within the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer Are Functionally Redundant and Act in a Cooperative Manner with the NF-κB Sites during Acute Infection. *J Virol.* 2011, 85, 1732-1746.

Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem.* 2007;7, 311-340.

- King LM, Gainer J V., David GL i suradnici. Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics*. 2005, 15, 7-13.
- Kornej J, Qadan MA, Alotaibi M i suradnici. The association between eicosanoids and incident atrial fibrillation in the Framingham Heart Study. *Sci Rep*. 2022, 12, 20218.
- Lai J, Chen C. The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Front Physiol*. 2021, 12, 642470.
- Lee CA, Neul D, Clouser-Roche A, et al. Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2. *Drug Metab Dispos*. 2010, 38, 347-356.
- Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics*. 2007, 17, 349-358.
- Lei X, Chen X, Quan Y, Tao Y, Li J. Targeting CYP2J2 to Enhance the Anti-Glioma Efficacy of Cannabinoid Receptor 2 Stimulation by Inhibiting the Pro-Angiogenesis Function of M2 Microglia. *Front Oncol*. 2020,10, 574277.
- Liu, H. M., Zheng, J. P., Yang, D., Liu, Z. F., Li, Z., Hu, Z. Z., i Li, Z. N. Recessive/dominant model: Alternative choice in case-control-based genome-wide association studies. *PloS one*. 2021, 16, e0254947.
- Liu PY, Li YH, Chao TH i suradnici. Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 *7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2007, 195, 199-206.
- Marciante KD, Totah RA, Heckbert SR i suradnici. Common variation in cytochrome P450 epoxygenase genes and the risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Pharmacogenet Genomics*. 2008, 18, 535-543.
- Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY. TGF- β 1/Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol*. 2015, 6, 82.
- Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(1), 4-16.

Mirat J. Nastanak i širenje srčanog podražaja. U: Klinička patofiziologija za studente Farmaceutko-biokemijskog fakulteta. Kujundžić M i sur., urednici, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003.

Mitchell JA, Kirkby NS. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2019, 176, 1038-1050.

Murray M. CYP2J2 – regulation, function and polymorphism. *Drug Metab Rev.* 2016, 48, 351-368.

Nagaoka M. Selected base sequence outside the target binding site of zinc finger protein Sp1. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 4920-4929.

Nakagawa J, Kinjo T, Iizuka M, Ueno K, Tomita H, Niioka T. Impact of gene polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and transporters on trough concentrations of rivaroxaban in patients with atrial fibrillation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2021, 128, 297-304.

Node K, Huo Y, Ruan X i suradnici. Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science.* 1999, 285, 1276-1279.

Oliveira VH, Nascimento KS, Freire MM, Moreira OC, Scofano HM, Barrabin H, Mignaco JA. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase by arachidonic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat,* 2008, 87, 47-53.

Panigraphy D, Greene ER, Pozzi A, Wang DW, Zeldin DC. EET signalling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011, 30, 525-540

Patrono C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br J Clin Pharmacol.* 2016, 82, 957-964.

Pinsonneault J, Sadée W. Pharmacogenomics of multigenic diseases: Sex-specific differences in disease and treatment outcome. *AAPS PharmSci.* 2003, 5, 49–61.

Polimorfizam, 2011., <https://www.struna.ijhh.hr>, pristupljeno 7. 5. 2023.

Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA i suradnici. A Common Polymorphism G-50T in Cytochrome P450 2J2 Gene Is Associated with Increased Risk of Essential Hypertension in a Russian Population. *Dis Markers.* 2008, 24, 119-126.

Polonikov A V., Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya I V., Kozhuhov MA, Panfilov VI. Promoter polymorphism G-50T of a human CYP2J2 epoxygenase gene is associated with common susceptibility to asthma. *Chest*. 2007, 132, 120-126.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, SAD, 2020, www.rstudio.com

Risé P., Tragni E., Ghezzi S., Agostoni C., Marangoni F., Poli A., Catapano A.L., Siani A., Iacoviello L., Galli C. Different patterns characterize Omega 6 and Omega 3 long chain polyunsaturated fatty acid levels in blood from Italian infants, children, adults and elderly. Prostagland. Leukot. *Essent Fat Acids*, 2013, 89, 215–220.

Risk factors for venous thrombosis., 2021., www.venousforum.org, pristupljeno 14. 6. 2023.

QIAamp DNA Blood Mini Kits., 2012., www.qiagen.com, pristupljeno 2. 5. 2023.

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2016., Qiagen, Hilden, Njemačka.

Shen L, Peng H, Zhao S, Xu D. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t- AUCB, modulates cholesterol balance and oxidized low density lipoprotein metabolism in adipocytes in vitro. *Biol Chem*. 2014, 395, 443-451.

Šimičević L, Slišković AM, Kirhmajer MV i suradnici. Risk Factors for Rivaroxaban-Related Bleeding Events—Possible Role of Pharmacogenetics: Case Series. *Pharmacy*. 2023, 11, 29.

Smith HE, Jones JP, Kalhorn TF i suradnici. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2008, 18, 943-953.

Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2018, 19, 3285.

Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): Metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res*. 2004, 43, 55-90.

Spiecker M, Darius H, Hankeln T i suradnici. Risk of Coronary Artery Disease Associated With Polymorphism of the Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2. *Circulation*. 2004, 110, 2132-2136.

Taconelli S, Patrignani P. Inside epoxyeicosatrienoic acids and cardiovascular disease. *Front Pharmacol.* 2014, 5, 239.

TaqMan SNP Genotyping, 2023., www.applied-maths.com, pristupljeno 2. 5. 2023.

Višnjić D. Stanično signaliziranje. U: Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010. str. 603-653.

Weller PF. Leukocyte lipid bodies - structure and function as "eicososomes". *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2016, 127, 328-340.

Westphal C, Spallek B, Konkel A i suradnici. CYP2J2 Overexpression Protects against Arrhythmia Susceptibility in Cardiac Hypertrophy. *PLoS One.* 2013, 8.

Wu Z, Lee D, Joo J, et al. CYP2J2 and CYP2C19 are the major enzymes responsible for metabolism of albendazole and fenbendazole in human liver microsomes and recombinant P450 assay systems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57, 5448-5456.

Xintarakou A, Tzeis S, Psarras S, Asvestas D, Vardas P. Atrial fibrosis as a dominant factor for the development of atrial fibrillation: facts and gaps. *EP Europace.* 2020, 22, 342-351.

Xu M, Ju W, Hao H, Wang G, Li P. Cytochrome P450 2J2: Distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metab Rev.* 2013, 45, 311-352.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med.* 2002, 347, 1916-1923.

Zhang D, Lou J, Zhang X i suradnici. Hyperhomocysteinemia results from and promotes hepatocellular carcinoma via CYP450 metabolism by CYP2J2 DNA methylation. *Oncotarget.* 2017, 8, 15377-15392.

Zhang L, Ding H, Yan J i suradnici. Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics.* 2008, 18, 45-51.

Zhang Y, Yuan B, Xu Y i suradnici. MiR-208b/miR-21 Promotes the Progression of Cardiac Fibrosis Through the Activation of the TGF- β 1/Smad-3 Signaling Pathway: An in vitro and in vivo Study. *Front Cardiovasc Med.* 2022, 9, 924629.

Zhao T, Chen Y, Wang D i suradnici. Identifying the Dominant Contribution of Human Cytochrome P450 2J2 to the Metabolism of Rivaroxaban, an Oral Anticoagulant. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2022, 36, 121-129.

Zhou Y, Khan H, Xiao J, Cheang WS. Effects of arachidonic acid metabolites on cardiovascular health and disease. *Int J Mol Sci.* 2021, 22, 12029.

9. SAŽETAK

Enzimi citokrom P450 (CYP) imaju ključnu ulogu u stvaranju epoksieikozatrienoičnih kiselina (EET), metabolita arahidonske kiseline koji ostvaruju različite zaštitne i protuupalne učinke, prvenstveno na kardiovaskularni sustav. One potiču vaskularnu relaksaciju, angiogenezu i fibrinolizu, djeluju protuupalno te moduliraju aktivnost ionskih kanala. CYP2J2 je glavni enzim odgovoran za epoksidaciju arahidonske kiseline u EET u srcu i koronarnim arterijama. Polimorfizam *CYP2J2* *7 u promotorskoj regiji gena smanjuje njegovu ekspresiju za 48 % što rezultira smanjenom koncentracijom EET, disregulacijom proupalnih i profibrotičkih čimbenika te promijenjenom aktivnosti ionskih kanala. Kako su upravo ti mehanizmi uključeni u nastanak fibrilacije atrijske, hipoteza ove studije jest kako postoji povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 i fibrilacije atrijske. Budući da CYP2J2 nije eksprimiran u venama te ne doprinosi patogenezi venske tromboze, genotipizirano je 179 ispitanika s fibrilacijom atrijske te 102 ispitanika s trombozom. Učestalost alela *CYP2J2* *7 u ispitivanoj populaciji bila je 5,51 %. Zbog istih čimbenika rizika za obje bolesti, nije bilo značajne razlike u učestalosti dislipidemije, hipertenzije i šećerne bolesti, ali su se ispitanici razlikovali s obzirom na dob i spol. Regresijsko analizom utvrđeno je kako prisutnost barem jednog varijantnog alela *7 povećava omjer vjerojatnosti za razvoj fibrilacije atrijske. Analizirajući podatke prema spolu, nije utvrđena razlika u učestalosti genotipova kod muškaraca dok je kod žena razlika bila statistički značajna ($p = 0,047$). Pripadajući omjer vjerojatnosti za razvoj fibrilacije atrijske kod žena iznosio je 4,010 (95 % CI: 1,127 – 19,041). Sveukupno, rezultati ovog istraživanja upućuju kako polimorfizam *CYP2J2* *7 može pridonijeti povećanom riziku za razvoj fibrilacije atrijske u hrvatskoj populaciji, osobito u žena.

9. SUMMARY

Cytochrome P450 (CYP) enzymes play a crucial role in the formation of epoxyeicosatrienoic acids (EETs), metabolites of arachidonic acid which have various protective and anti-inflammatory effects, particularly on the cardiovascular system. CYP2J2 is the key enzyme responsible for epoxidation of arachidonic acid into EETs in the heart and coronary arteries. The presence of the *CYP2J2* *7 polymorphism in the gene's promoter region reduces its expression by 48% which, consequently, leads to decreased EET concentrations, dysregulation of proinflammatory and profibrotic factors, and altered ion channel activity. As these mechanisms are involved in the development of atrial fibrillation, the hypothesis of this study is that there is an association between *CYP2J2* *7 polymorphism and atrial fibrillation. Since CYP2J2 is not expressed in veins and has no significant contribution to the pathogenesis of venous thrombosis, 179 subjects with atrial fibrillation and 102 subjects with thrombosis were genotyped. In the studied population the frequency of the *CYP2J2* *7 allele was 5.51%. Due to similar risk factors for both diseases, no significant differences between groups were observed in the frequency of dyslipidemia, hypertension, and diabetes. However, differences in age and gender were found. Regression analysis revealed that the occurrence of at least one variant allele *7 increased the odds ratio of atrial fibrillation. The difference in genotype frequency was not determined in men, but a statistically significant difference ($p = 0.047$) was observed in women. The corresponding odds ratio of atrial fibrillation for women was 4.010 (95 % CI: 1.127 – 19.041). Overall, the results imply that the *CYP2J2* *7 polymorphism may contribute to an increased risk of atrial fibrillation in the Croatian population, especially in women.

10. PRILOG

10.1. Popis slika

- Slika 1.** Struktura molekule arahidonske kiseline (Hanna i Hafez, 2018).
- Slika 2.** Pregled metabolizma arahidonske kiseline počevši od njenog oslobađanja iz stanične membrane djelovanjem fosfolipaze A2 (PLA2) (preuzeto i prilagođeno prema Tacconelli i Patrignani, 2014 te Aliwarga i sur., 2018).
- Slika 3.** Aktivacija signalnog puta NF κ B uključuje fosforilaciju inhibitora kapa B (I κ B) djelovanjem kinaza inhibitora kapa B (I κ K) (preuzeto i prilagođeno prema <https://sites.tufts.edu>).
- Slika 4.** Razlika u fiziološkom provođenju električnog impulsa i onog kod fibrilacije atrijsa (preuzeto i prilagođeno prema www.stopafib.org).
- Slika 5.** Signalni put TGF- β uključuje aktivaciju tirozin kinaznog receptora (preuzeto i prilagođeno prema Meng i sur., 2015).
- Slika 6.** Izdvajanje DNA uporabom komercijalnog kompleta reagenasa *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka). (Preuzeto i prilagođeno prema *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 2016., Qiagen, Hilden, Njemačka).
- Slika 7.** U TaqMan® metodi koriste se dvije sonde koje se razlikuju po vezanoj fluorescentnoj boji i slijedu nukleotida (preuzeto i prilagođeno prema www.applied-maths.com).
- Slika 8.** Prikaz rezultata TaqMan® PCR-a.
- Slika 9.** Grafički prikaz razlike u skupinama ispitanika s fibrilacijom atrijsa i trombozom u hipertenziji, dislipidemiji, šećernoj bolesti, prisutnosti barem jednog alela *CYP2J2* *7 (*1/*7 ili *7/*7 genotip) te spolu.
- Slika 10.** Grafički prikaz razlike u skupinama ispitanika s *1/*1 genotipom i *1/*7 ili *7/*7 genotipom u hipertenziji, dislipidemiji, šećernoj bolesti i spolu.

10.1. Popis tablica

Tablica 1. Popis polimorfizama *CYP2J2* i njihova povezanost s aktivnosti enzima *CYP2J2 in vitro* (preuzeto i prilagođeno s www.pharmvar.org i prema Berlin i sur., 2011).

Tablica 2. Povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 s rizikom nastanka različitih bolesti (nadopunjeno prema Berlin i sur., 2011 te Aliwarga i sur., 2018).

Tablica 3. Uvjeti PCR-a za genotipiziranje alela *CYP2J2* *7.

Tablica 4. Klinička obilježja ispitanika i usporedba skupina s fibrilacijom atrijske i trombozom.

Tablica 5. Frekvencija alela i distribucija genotipova među ispitanicima s fibrilacijom atrijske i trombozom.

Tablica 6. Usporedba kliničkih obilježja ispitanika s obzirom na genotip.

Tablica 7. Model logističke regresije pokazao je dob, spol i prisutnost polimorfizma *CYP2J2* *7 kao nezavisne rizične faktore za razvoj fibrilacije atrijske.

Tablica 8. Prikaz kliničkih karakteristika i frekvencije genotipa *1/*7+*7/*7 po skupinama ovisno o spolu.

Tablica 9. Model logističke regresije za ženski spol pokazao je dob i prisutnost polimorfizma *CYP2J2* *7 kao nezavisne rizične faktore za razvoj fibrilacije atrijske.

**11. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Specijalna područja kliničke biokemije
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ULOGA POLIMORFIZAMA GENA *CYP2J2* U KLINIČKOJ MEDICINI

Magdalena Jurić

SAŽETAK

Enzimi citokrom P450 (CYP) imaju ključnu ulogu u stvaranju epoksieikozatrienoičnih kiselina (EET), metabolita arahidonske kiseline koji ostvaruju različite zaštitne i protuupalne učinke, prvenstveno na kardiovaskularni sustav. One potiču vaskularnu relaksaciju, angiogenezu i fibrinolizu, djeluju protuupalno te moduliraju aktivnost ionskih kanala. *CYP2J2* je glavni enzim odgovoran za epoksidaciju arahidonske kiseline u EET u srcu i koronarnim arterijama. Polimorfizam *CYP2J2* *7 u promotorskoj regiji gena smanjuje njegovu ekspresiju za 48 % što rezultira smanjenom koncentracijom EET, disregulacijom proupalnih i profibrotičkih čimbenika te promijenjenom aktivnosti ionskih kanala. Kako su upravo ti mehanizmi uključeni u nastanak fibrilacije atrijske, hipoteza ove studije jest kako postoji povezanost polimorfizma *CYP2J2* *7 i fibrilacije atrijske. Budući da *CYP2J2* nije eksprimiran u venama te ne doprinosi patogenezi venske tromboze, genotipizirano je 179 ispitanika s fibrilacijom atrijske te 102 ispitanika s trombozom. Učestalost alela *CYP2J2* *7 u ispitivanoj populaciji bila je 5,51 %. Zbog istih čimbenika rizika za obje bolesti, nije bilo značajne razlike u učestalosti dislipidemije, hipertenzije i šećerne bolesti, ali su se ispitanici razlikovali s obzirom na dob i spol. Regresijsko analizom utvrđeno je kako prisutnost barem jednog varijantnog alela *7 povećava omjer vjerojatnosti za razvoj fibrilacije atrijske. Analizirajući podatke prema spolu, nije utvrđena razlika u učestalosti genotipova kod muškaraca dok je kod žena razlika bila statistički značajna ($p = 0,047$). Pripadajući omjer vjerojatnosti za razvoj fibrilacije atrijske kod žena iznosio je 4,010 (95 % CI: 1,127 – 19,041). Sveukupno, rezultati ovog istraživanja upućuju kako polimorfizam *CYP2J2* *7 može pridonijeti povećanom riziku za razvoj fibrilacije atrijske u hrvatskoj populaciji, osobito u žena.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 56 stranica, 10 grafičkih prikaza, 9 tablica i 82 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: bioaktivni lipidni medijatori, *CYP2J2*, epoksigenaza, kardiovaskularne bolesti, polimorfizmi gena, višestruko nezasićene masne kiseline

Mentori: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Livija Šimičević, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Livija Šimičević, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta*
Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Special Areas of Clinical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE ROLE OF *CYP2J2* GENE POLYMORPHISMS IN CLINICAL MEDICINE

Magdalena Jurič

SUMMARY

Cytochrome P450 (CYP) enzymes play a crucial role in the formation of epoxyeicosatrienoic acids (EETs), metabolites of arachidonic acid which have various protective and anti-inflammatory effects, particularly on the cardiovascular system. *CYP2J2* is the key enzyme responsible for epoxidation of arachidonic acid into EETs in the heart and coronary arteries. The presence of the *CYP2J2* *7 polymorphism in the gene's promoter region reduces its expression by 48% which, consequently, leads to decreased EET concentrations, dysregulation of proinflammatory and profibrotic factors, and altered ion channel activity. As these mechanisms are involved in the development of atrial fibrillation, the hypothesis of this study is that there is an association between *CYP2J2* *7 polymorphism and atrial fibrillation. Since *CYP2J2* is not expressed in veins and has no significant contribution to the pathogenesis of venous thrombosis, 179 subjects with atrial fibrillation and 102 subjects with thrombosis were genotyped. In the studied population the frequency of the *CYP2J2* *7 allele was 5.51%. Due to similar risk factors for both diseases, no significant differences between groups were observed in the frequency of dyslipidemia, hypertension, and diabetes. However, differences in age and gender were found. Regression analysis revealed that the occurrence of at least one variant allele *7 increased the odds ratio of atrial fibrillation. The difference in genotype frequency was not determined in men, but a statistically significant difference ($p = 0.047$) was observed in women. The corresponding odds ratio of atrial fibrillation for women was 4.010 (95 % CI: 1.127 – 19.041). Overall, the results imply that the *CYP2J2* *7 polymorphism may contribute to an increased risk of atrial fibrillation in the Croatian population, especially in women.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 56 pages, 10 figures, 9 tables i 82 references. Original is in Croatian language.

Key words: bioactive lipid mediators, cardiovascular diseases, *CYP2J2*, epoxygenase, gene polymorphisms, polyunsaturated fatty acids

Mentori: **Dunja Rogić, Ph.D./Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry**
Livija Šimičević, Ph.D./Senior Assistant, University of Zagreb School of Medicine

Ocjenjivači: **Dunja Rogić, Ph.D./Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry**
Livija Šimičević, Ph.D./Senior Assistant, University of Zagreb School of Medicine
Anita Somoborac Bačura, Ph.D./Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.