



Wydział Lekarski
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Katarzyna Polonis

**Ocena związku wybranych polimorfizmów
pojedynczego nukleotydu z właściwościami ścian
dużych tętnic u chorych z nadciśnieniem tętniczym**

Rozprawa doktorska wykonana
w Zakładzie Nadciśnienia Tętniczego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Praca sfinansowana w ramach projektu TEAM
Fundacji na rzecz Nauki Polskiej:

*„Zintegrowany pomiar funkcji tętniczych oraz
aktywności współczulnego układu nerwowego:
rozwój, walidacja oraz zastosowanie nowej
metody”.*

Promotor: **prof. dr hab. Krzysztof Narkiewicz**

GDAŃSK 2014

PODZIĘKOWANIA

Pragnę wyrazić szczególne wyrazy podziękowania mojemu Promotorowi i Mentorowi, prof. dr hab. Krzysztofowi Narkiewiczowi, za nieocenione wsparcie merytoryczne, zaangażowanie i inspirujące dyskusje, które wzbudziły moją ciekawość badawczą. Chciałabym również podziękować Promotorowi za zaufanie, którym mnie obdarzył i pomoc w realizowaniu kolejnych planów naukowych.

Chciałabym również serdecznie podziękować prof. dr hab. Tomaszowi Puzynowi oraz Jego Zespołowi z Pracowni Chemometrii Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego za niezwykłą życzliwość, cenne dyskusje oraz wskazówki dotyczące metodyki analiz statystycznych.

Bardzo dziękuję również koleżankom i kolegom z pracy za okazaną życzliwość i pomoc oraz stworzenie inspirowanej atmosfery wspólnej pracy. Szczególne podziękowania składam Ani Szyndler i Michałowi Hoffmannowi za opiekę merytoryczną i okazaną cierpliwość w odpowiadaniu na moje niezliczone pytania.

Serdecznie dziękuję Ani Woziwodzkiej, Emilii Dagher i Magdzie Stepnowskiej za cenne uwagi merytoryczne i korektę niniejszej pracy.

Dziękuję również moim Bliskim i Przyjaciołom za okazaną cierpliwość i wsparcie na każdym kroku.

I. SPIS TREŚCI

I.	Spis treści.....	1
II.	Streszczenie	3
III.	Wykaz skrótów	5
IV.	Wstęp	7
4.1.	Epidemiologia chorób sercowo-naczyniowych i nadciśnienia tętniczego.....	7
4.2.	Krążące biomarkery a biomarkery tkankowe	7
4.3.	Sztywność naczyń – marker ryzyka sercowo-naczyniowego	9
4.4.	Patofizjologia zjawiska sztywności naczyń	9
4.5.	Wartość predykcyjna sztywności naczyń ocenianej na podstawie prędkości fali tętna PWV.....	10
4.6.	Czynniki genetyczne a sztywność naczyń	11
4.6.1.	Geny związane z kontrolą ciśnienia krwi	12
4.6.2.	Geny związane z właściwościami macierzy zewnątrzkomórkowej naczyń	14
4.6.3.	Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS).....	17
4.7.	Koncepcja genetyczno-epidemiologicznego modelu zjawiska sztywnienia naczyń.....	17
V.	Hipoteza badawcza	20
5.1.	Zasadność prowadzonych badań.....	20
5.2.	Hipoteza badawcza.....	21
5.3.	Cel badań.....	22
VI.	Materiały i metody.....	23
6.1.	Badana grupa.....	23
6.2.	Kryteria włączenia i wyłączenia do badania	23
6.3.	Dane kliniczne.....	23
6.3.1.	Badanie podmiotowe	25
6.3.2.	Badanie przedmiotowe	26
6.3.3.	Badania dodatkowe.....	26
6.3.4.	Ocena sztywności naczyń	27
6.4.	Oznaczenia genetyczne	27
6.4.1.	Pobranie krwi i izolacja materiału genetycznego	27
6.4.2.	Genotypowanie	28
6.5.	Przygotowanie danych do analiz statystycznych	28
6.5.1.	Zmienne modelowane (zależne)	28
6.5.2.	Wyniki genotypowania	28
6.6.	Schemat analizy danych.....	30
6.7.	Analiza statystyczna.....	32
6.7.1.	Pakiety statystyczne	32
6.7.2.	Zastosowane testy statystyczne	32
6.7.3.	Uwagi ogólne	34
VII.	Wyniki	36

7.1. Charakterystyka populacji pod względem analizowanych zmiennych ilościowych i jakościowych	36
7.2. Zgodność rozkładu polimorfizmów SNP z prawem równowagi genetycznej Hardy'ego-Weinberga	38
7.3. Analiza zmiennej PWV	41
7.3.1. Budowa modelu podstawowego dla zmiennej PWV	41
7.3.2. Identyfikacja polimorfizmów SNP wyjaśniających w sposób istotny zmienność parametru PWV	48
7.3.3. Stworzenie zliczonej punktacji ryzyka genetycznego (GRS). Analiza średnich wartości parametru PWV w różnych grupach GRS	58
7.3.4. Punktacje ryzyka genetycznego jako zmienne ciągłe. Wyjaśniona zmienność PWV w modelu surowym i skorygowanym	69
6.4. Zaproponowane modele predykcyjne	71
VIII. Dyskusja	72
8.1. Równowaga Hardy'ego – Weinberga	73
8.2. Model surowy a model skorygowany	76
8.3. Model genetyczny (model dziedziczenia)	77
8.4. Analiza pojedynczych polimorfizmów SNP oraz ich układów	79
8.5. Moc statystyczna analiz	81
8.6. Fenotypy pośrednie i końcowe, polimorfizmy SNP i zliczone punktacje ryzyka genetycznego	83
IX. Ograniczenia i zalety pracy	86
X. Podsumowanie i wnioski końcowe	90
XI. Piśmiennictwo	92
XII. Spis tabel	114
XIII. Spis rysunków	116
XIV. Załączniki	117

II. STRESZCZENIE

Choroby układu krążenia są główną przyczyną inwalidztwa oraz przedwczesnej umieralności w krajach rozwiniętych. Pomimo znacznych dokonań w zakresie profilaktyki i leczenia chorób sercowo-naczyniowych, istnieje nadal potrzeba rozwijania modeli patofizjologicznych dla lepszego zrozumienia i zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego.

Rozróżnienie naturalnego starzenia narządów od wczesnych objawów choroby jest jednym z najistotniejszych zagadnień medycznych ostatnich lat. Wyrazem wczesnych powikłań naczyniowych w przebiegu nadciśnienia tętniczego jest zmiana właściwości ścian naczyń tętniczych przejawiających się utratą elastyczności i zwiększeniem ich sztywności. W ostatnich latach podkreśla się wysoką wartość predykcyjną sztywności tętnic w ocenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych, a także możliwość wczesnego wykrywania niekorzystnych rokowniczo zmian w układzie naczyniowym w różnych grupach chorych, w tym z nadciśnieniem tętniczym. Sztywność naczyń można traktować jako „tkankowy” marker ryzyka sercowo-naczyniowego, który kumuluje długoterminowy wpływ klasycznych czynników ryzyka (np. zaburzeń gospodarki węglowodanowej czy lipidowej) oraz wieku, czyli naturalnego procesu starzenia organizmu. Jednak wiek i czynniki ryzyka nie tłumaczą całkowicie obserwowanej sztywności naczyń i zmienności międzyosobniczej u chorych z nadciśnieniem tętniczym, co może sugerować podłoże genetyczne zjawiska.

Dlatego głównym celem niniejszej rozprawy było: 1) stwierdzenie związku polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) z właściwościami ścian dużych tętnic ocenianymi na podstawie pomiaru udowo-szyjnej prędkości fali tętna (PWV, ang. *pulse wave velocity*) oraz 2) zaproponowanie modeli opartych na polimorfizmach SNP, przewidujących ryzyko przedwczesnego starzenia naczyń tętniczych oraz ryzyko sercowo-naczyniowe.

W pracy analizowano łącznie 168 polimorfizmów SNP wybranych na podstawie opublikowanych wyników badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS, ang. *genome-wide association study*). Wykazały one związek z fenotypami sercowo-naczyniowymi m.in. z ciśnieniem krwi, gospodarką lipidową czy ryzykiem zawału serca. Stosując różne modele dziedziczenia, zidentyfikowano łącznie 50 polimorfizmów SNP, które wyjaśniły od 0,24% do 1,14% zmienności PWV na poziomie istotności co najmniej $p < 0,1$. Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezę, że różne fenotypy sercowo-naczyniowe mogą być manifestacją kliniczną częściowo wspólnego podłoża genetycznego, a sztywność naczyń można traktować zarówno jako fenotyp pośredni dla zdarzeń sercowo-naczyniowych, jak i fenotyp końcowy, będący konsekwencją związku z tradycyjnymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego.

Następnie na podstawie SNP, które wykazały istotny związek z parametrem PWV, skonstruowano zliczone punktacje ryzyka genetycznego (GRS, ang. *genetic risk score*), które sumują efekt pojedynczych polimorfizmów SNP. Wykazano, że wraz ze wzrostem punktacji GRS (tj. z liczbą niekorzystnych alleli), wzrasta średnia wartość parametru PWV. Potwierdza to hipotezę predyspozycji genetycznej przedwczesnego starzenia naczyń, co może pomóc w przewidywaniu niekorzystnych zmian właściwości

ścian dużych tętnic (sztywności naczyń) na wczesnym etapie zmian narządowych lub nawet jeszcze przed ich wystąpieniem. Potwierdzono także, że GRS wyjaśniają większą część zmienności parametru PWV niż każdy z polimorfizmów SNP osobno. Procent wyjaśnionej zmienności parametru PWV wynosił od 1,92% do 8,42%. Na podstawie skonstruowanych GRS i/lub klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego zaproponowano modele predykcyjne szacujące ryzyko przedwczesnego starzenia naczyniowego ocenianego na podstawie parametru PWV oraz modele szacujące ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Replikacja i walidacja zaproponowanych modeli predykcyjnych pozwoli stwierdzić czy GRS wiążą się niezależnie z ryzykiem przedwczesnego starzenia naczyń oraz ryzykiem sercowo-naczyniowym. I jeśli tak, to czy zmieniają klasyfikację chorego pod względem ryzyka i rokowania w kilkuletniej perspektywie. Potwierdzenie zdolności predykcyjnej tych modeli może w przyszłości skuteczniej ukierunkować działania o charakterze prewencyjnym i podjąć efektywne leczenie chorych, co w konsekwencji może zmniejszyć ryzyko rozwoju poważnych powikłań nadciśnienia tętniczego.

III. WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Angielska nazwa	Polska nazwa
ABPM	<i>Ambulatory blood pressure monitoring</i>	24-godzinny pomiar ciśnienia tętniczego
ACEI	<i>Angiotensin converting enzyme inhibitor</i>	Inhibitor konwertazy angiotensyny
ACR	<i>Albumine/creatinine ratio</i>	Stosunek albumina/kreatynina
AIx	<i>Augmentation index</i>	Współczynnik wzmocnienia
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	Jednoczynnikowa analiza wariancji
ARB	<i>Angiotensin receptor blocker</i>	Antagonista receptora angiotensyny
BB	<i>Beta blocker</i>	β-bloker
BMI	<i>Body mass index</i>	Wskaźnik masy ciała
CABG	<i>Coronary artery bypass graft</i>	Pomostowanie aortalno-wieńcowe
CAD	<i>Coronary artery disease</i>	Choroba niedokrwienna serca
CCB	<i>Calcium channel blocker</i>	Antagonista kanałów wapniowych
cDBP	<i>Central diastolic blood pressure</i>	Centralne ciśnienie rozkurczowe
CHD	<i>Coronary heart disease</i>	Choroba wieńcowa
CI	<i>Confidence interval</i>	Przedział ufności
CV	<i>Cardiovascular</i>	Sercowo-naczyniowe
DBP	<i>Diastolic blood pressure</i>	Ciśnienie rozkurczowe krwi
DM1/DM2	<i>Diabetes mellitus type 1/type 2</i>	Cukrzyca typu 1/typu 2
Ds	<i>Distensibility</i>	Rozszerzalność naczynia
eGFR	<i>Estimated glomerular filtration rate</i>	Wskaźnik filtracji kłębuszkowej
ESH	<i>European Society of Hypertension</i>	Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
EU	<i>European Union</i>	Unia Europejska
EVA	<i>Early vascular aging</i>	Syndrom przedwczesnego starzenia naczyniowego
GRS	<i>Genetic risk score</i>	Zliczona punktacja ryzyka genetycznego
GUMed		Gdański Uniwersytet Medyczny
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>	Badania asocjacyjne całego genomu
HDL	<i>High density lipoprotein</i>	Lipoproteina o wysokiej gęstości
HF	<i>Heart failure</i>	Niewydolność serca
HR	<i>Heart rate</i>	Tętno
hsCRP	<i>High-sensitivity C-reactive protein</i>	Białko C-reaktywne wysokiej czułości
IFG	<i>Impaired fasting glucose</i>	Nieprawidłowa glikemia na czczo
IGT	<i>Impaired glucose tolerance</i>	Upośledzona tolerancja glukozy
IMT	<i>Intima-media thickness</i>	Grubość kompleksu błony wewnętrznej
IR	<i>Insuline resistance</i>	Insulinooporność
KR	<i>Serum creatinine</i>	Kreatynina w surowicy
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>	Lipoproteina o niskiej gęstości
LVMI	<i>Left ventricular mass index</i>	Wskaźnik masy lewej komory serca
MAF	<i>Minor allele frequency</i>	Częstość rzadszego allelu

Skrót	Angielska nazwa	Polska nazwa
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>	Desorpcja laserowa z udziałem matrycy
MI	<i>Myocardial infarction</i>	Zawał mięśnia sercowego
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>	Macierzowe metaloproteinazy
MS	<i>Metabolic syndrome</i>	Zespół metaboliczny
NO	<i>Nitric oxide</i>	Tlenek azotu
NT		Nadciśnienie tętnicze
OR	<i>Odd ratio</i>	Iloraz szans
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Łańcuchowa reakcja polimerazy
PP	<i>Pulse pressure</i>	Ciśnienie tętna
PTCA	<i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>	Angioplastyka wieńcowa
PTNT		Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
PWV	<i>Pulse wave velocity</i>	Prędkość fali tętna
Q²CV	<i>Cross-validation determination coefficient</i>	Współczynnik walidacji krzyżowej
Q²Ext	<i>External validation coefficient</i>	Współczynnik walidacji zewnętrznej
r.ż.		Rok życia
R²	<i>Determination coefficient</i>	Współczynnik determinacji
RAAS	<i>renin-angiotensin-aldosterone system</i>	Układ renina-angiotensyna-aldosteron
RMSEC	<i>Root mean square error of calibration</i>	Średni kwadratowy błąd kalibracji
RMSECV	<i>Root mean square error of cross validation</i>	Średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej
RMSEP	<i>Root mean square error of prediction</i>	Średni kwadratowy błąd przewidywania
SBP	<i>Systolic blood pressure</i>	Ciśnienie skurczowe krwi
SD	<i>Standard deviation</i>	Odchylenie standardowe
SN		Sercowo-naczyniowe np. ryzyko
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	Polimorfizm pojedynczego nukleotydu
TC	<i>Total cholesterol</i>	Cholesterol całkowity
TG	<i>Triglyceride</i>	Trójglicerydy
TIA	<i>Transient ischemic attack</i>	Przemijający atak niedokrwienny
TOD	<i>Target organ damage</i>	Uszkodzenie narządowe
TOF	<i>Time of flight</i>	Analizator masy typu przelotu
TOL	<i>Tolerance</i>	Współczynnik tolerancji
VIF	<i>Variance inflation factor</i>	Współczynnik inflacji
WHR	<i>Waist to hip ratio</i>	Stosunek obwodu pasa do obwodu bioder

IV. WSTĘP

4.1. Epidemiologia chorób sercowo-naczyniowych i nadciśnienia tętniczego

Choroby układu krążenia są główną przyczyną inwalidztwa oraz przedwczesnej umieralności w krajach rozwiniętych. Z ich powodu co roku przedwcześnie umiera 2 mln mieszkańców Unii Europejskiej (UE), co stanowi blisko 40% wszystkich zgonów. Wśród chorób układu krążenia najczęstszą przyczyną zgonu jest choroba wieńcowa i udar mózgu (odpowiednio 50% i 30%). Ocenia się, że mimo znaczących postępów w diagnostyce i leczeniu, choroby sercowo-naczyniowe nadal pozostaną główną przyczyną zgonów w większości krajów świata (Nichols et al., 2013).

Dane za 2010 rok wskazały, że w Polsce z powodu chorób układu krążenia zmarło ok. 80 tys. mężczyzn i 91 tys. kobiet, co stanowi 41% wszystkich zgonów mężczyzn i 46% wszystkich zgonów kobiet. Co bardzo alarmujące, co trzeci zgon mężczyzn i co dziesiąty zgon kobiet dotyczył osób młodych i w średnim wieku tj. poniżej 64 r.ż. (Wojtyniak et al., 2012).

Choroby układu krążenia są także główną przyczyną chorobowości i hospitalizacji. Szacuje się, że obciążenie finansowe z powodu tej grupy chorób w 2006 roku wyniosło blisko 110 mld € na terenie całej UE. W przeliczeniu na jednego mieszkańca UE, roczny koszt leczenia chorób układu krążenia wynosi 223 €, co stanowi ok. 10% całkowitych wydatków na opiekę zdrowotną (Humphrey et al., 2014). W Polsce, jak wynika z raportu Narodowego Funduszu Zdrowia za 2004 rok, z powodu chorób układu krążenia hospitalizowano w Polsce blisko 1 mln chorych, co stanowiło 44% wszystkich hospitalizacji (<http://www.nfz.gov.pl>, data dostępu: 21.04.2014).

Badania epidemiologiczne, kliniczne i interwencyjne udowodniły, że wśród innych ustalonych czynników ryzyka, nadciśnienie tętnicze wiąże się z istotnym wzrostem ryzyka zarówno zachorowania, jak i zgonu z powodu chorób układu krążenia. Według najnowszego raportu NATPOL 2011 (Ogólnopolskie Badanie Rozpowszechnienia Czynniki Ryzyka Chorób Układu Krążenia) na nadciśnienie tętnicze choruje co trzeci Polak (tj. 9,5 mln), a zagrożonych nadciśnieniem tętniczym jest kolejne drugie tyle. W porównaniu z badaniem NATPOL 2002 zaobserwowano natomiast zwiększenie prawidłowej kontroli ciśnienia tętniczego z 12 do 26%. Niestety równocześnie 3,1 mln chorych z nadciśnieniem tętniczym nie jest świadoma tego zaburzenia (Zdrojewski et al., 2013).

4.2. Krążące biomarkery a biomarkery tkankowe

Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH, ang. *European Society of Hypertension*) rekomendują kontrolę klasycznych czynników ryzyka w połączeniu ze zmianą nawyków żywieniowych i stylu życia jako najbardziej skutecznego narzędzia zapobiegającego chorobie sercowo-naczyniowej (Graham et al., 2007; Mancia et al., 2007, 2014). Wyniki badania INTERHEART, obejmującego grupę

ok. 30 tys. chorych po przebytych zawałach serca w 52 krajach, wskazały na potencjalne modyfikowalne czynniki, m.in. palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, otyłość, zaburzenia gospodarki lipidowej, dietę, spożycie alkoholu i aktywność fizyczną, które wyjaśniają ok. 90% ryzyka zawału serca. Co bardzo wymowne, wymienione czynniki ryzyka pozostały takie same, niezależnie od płci i wieku, rejonu świata, religii czy rasy chorego (Yusuf et al., 2004).

Klasyczne skale ryzyka, jak amerykańska skala *Framingham* (Wilson et al., 1998) czy opracowana dla populacji europejskiej skala *Score* (ang. *European Systemic Coronary Risk Evaluation*) (Conroy et al., 2003) charakteryzują się dobrą jakością predykcji indywidualnego 10-letniego ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych z co najmniej kilkoma czynnikami ryzyka. Jednakże mogą one nie doszacowywać ryzyka w pewnych grupach chorych, u których można byłoby zastosować już bardzo wczesną profilaktykę i monitorowanie stanu zdrowia (Szyndler et al., 2011). Zaproponowano więc szereg innych biomarkerów, których celem było zwiększenie precyzji stratyfikacji indywidualnego ryzyka sercowo-naczyniowego, np. homocysteinę i białko C-reaktywne wysokiej czułości (hsCRP, ang. *high-sensitivity C-reactive protein*) (Lewington et al., 2012; Stoner et al., 2013). Takie biomarkery, których związane są ze krwią chorego, nazwano tzw. „krążącymi” biomarkerami (ang. „*circulating*” *biomarkers*). Wiele badań wskazuje jednak na to, że nowe biomarkery nie polepszają znacząco jakości predykcji ryzyka sercowo-naczyniowego, poza specyficznymi populacjami chorych (Lewington et al., 2012; Penn i Klemes, 2013). Przykładowo, Wang et al. (2006) wykazali, że zastosowanie nowych biomarkerów, zarówno pojedynczo jak i w kombinacjach, nie poprawiło jakości przewidywania zdarzeń sercowo-naczyniowych w populacji Framingham. Podobnie, chociaż wskazywano, że białko C-reaktywne wysokiej czułości (hsCRP) jest predyktorem incydentów sercowo-naczyniowych w różnych uwarunkowaniach klinicznych, to jednak jego wartość dodana w szacowaniu całkowitego ryzyka sercowo-naczyniowego pozostała niepewna. Dlatego obecnie nie zaleca się jego pomiaru w celu podejmowania decyzji klinicznych u chorych na nadciśnienie tętnicze (Mancia et al., 2014; Volpe i Tocci, 2009).

Zalecenia ESH mocno podkreślają natomiast znaczenie subklinicznych zmian narządowych w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego (Mancia et al., 2014). Wykazano, że subkliniczne uszkodzenia narządowe (TOD, ang. *target organ damage*) mogą reprezentować etap pośredni pomiędzy czynnikami ryzyka a zdarzeniem sercowo-naczyniowym. Często parametry za pomocą, których identyfikuje się i ocenia stopień zaawansowania TOD, określane są mianem „tkankowych” biomarkerów (ang. „*tissue*” *biomarkers*) (Korhonen et al., 2013; Neves et al., 2012).

W odróżnieniu od krążących biomarkerów, ocena uszkodzeń subklinicznych może skutecznie pomóc w identyfikacji chorych z grup dużego ryzyka sercowo-naczyniowego, którzy według standardowych skal ryzyka zostali zaklasyfikowani do kategorii o małym lub umiarkowanym ryzyku sercowo-naczyniowym. Uważa się, że TOD jest wynikiem kumulacji długoterminowego efektu wywieranego przez klasyczne czynniki ryzyka i wiek chorego. Co więcej, dzięki nowym, czułym technikom diagnostycznym i obrazowym, TOD mogą zostać zidentyfikowane na etapie przed manifestacją objawów klinicznych, w momencie kiedy zmiany mogą być jeszcze

odwracalne (Laurent et al., 2012; Muiesan et al., 2013; Nilsson et al., 2009; Shlomain et al., 2013).

Dobrze udokumentowanymi przykładami subklinicznych uszkodzeń narządowych w przebiegu nadciśnienia tętniczego są m.in. przerost lewej komory serca, mikroalbuminuria, pogrubienie kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej (IMT, ang. *intima-media thickness*), upośledzenie funkcji nerek oceniane na podstawie stężenia kreatyniny i/lub klirensu kreatyniny oraz zwiększona sztywność naczyń, której w ostatnich latach poświęca się coraz więcej badań (Korhonen et al., 2013; Muiesan et al., 2013; Neves et al., 2012; Shlomain et al., 2013).

4.3. Sztywność naczyń – marker ryzyka sercowo-naczyniowego

W ostatnich latach szczególna uwaga koncentruje się na uszkodzeniach drzewa naczyniowego określanych na podstawie sztywności naczyń, ciśnienia centralnego krwi, grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej (IMT) i dysfunkcji śródbłonna (Laurent i Boutouyrie, 2007a). Opublikowano wiele wyników badań wskazujących na silny związek uszkodzeń w małych naczyniach tętniczych w sercu, mózgu, siatkówce i nerkach ze sztywnością dużych naczyń tętniczych (Rizzoni et al., 2009).

Sztywność naczyń można traktować jako „tkankowy” marker ryzyka sercowo-naczyniowego, który kumuluje długoterminowy wpływ czynników ryzyka sercowo-naczyniowego oraz wieku, czyli naturalnego procesu starzenia organizmu (Wang et al., 2008). Dla porównania, natężenie klasycznych czynników ryzyka np. średnie ciśnienie krwi, stężenie lipidów oraz glukozy we krwi zmienia się w czasie i pod wpływem stosowanego leczenia, dając różne wyniki i szacunki ryzyka sercowo-naczyniowego w różnych punktach czasowych obserwacji chorego. Z tego powodu pomiar tzw. krążących biomarkerów daje tylko chwilowy obraz stanu naczyniowego (ang. „*snapshot*”) i nie pozwala ocenić długoterminowej ekspozycji na te czynniki w przeszłości, co może powodować błędną klasyfikację chorego pod względem ryzyka sercowo-naczyniowego (Nilsson et al., 2009). Dlatego, w odróżnieniu od krążących biomarkerów, ocena sztywności naczyń, łącznie lub najlepiej niezależnie od klasycznych czynników ryzyka, może pomóc w identyfikacji chorych należących do grup dużego ryzyka, którzy według klasycznych skal zostali zaklasyfikowani do niskiego i umiarkowanego ryzyka sercowo-naczyniowego (Nilsson et al., 2013). Ta reklasyfikacja względem ryzyka sercowo-naczyniowego jest bardzo istotna z klinicznego punktu widzenia, ponieważ zalecenia diagnostyczne i terapeutyczne różnią się dla chorych zakwalifikowanych do kategorii niskiego/umiarkowanego lub wysokiego ryzyka (Mancia et al., 2014; Widecka et al., 2011).

4.4. Patofizjologia zjawiska sztywności naczyń

Zadaniem układu naczyniowego jest zapewnienie ciągłego przepływu krwi do tkanek i narządów. Odpowiadają za to funkcja transportująca, która zapewnia przepływ krwi z zachowaniem ciśnienia perfuzji do tkanek i narządów oraz funkcja amortyzująca.

Prawidłowe właściwości naczyń tętniczych (głównie elastyczność) warunkują prawidłowe rozchodzenie się fali tętna w drzewie naczyniowym tj. zamianę pulsacyjnego przepływu wywołanego cyklem pracy serca na przepływ ciągły oraz jej wzmocnienie na obwodzie (Glagov et al., 1988; Wootton i Ku, 1999). W przypadku prawidłowego starzenia się organizmu, następuje powolny wzrost sztywności naczyń, którego konsekwencją jest wzrost prędkości rozchodzącej się fali tętna wygenerowanej przez kurczącą się lewą komorę serca (Greenwald, 2007). W stanach patologicznych (np. w przypadku utrzymujących się podwyższonych wartości ciśnienia krwi) obserwuje się nadmierne sztywnienie naczyń w stosunku do wieku metrykalnego chorego. Takie zjawisko w ostatnich latach zostało zdefiniowane jako syndrom przedwczesnego starzenia naczyniowego (EVA, ang. *early vascular aging*) (Nilsson, 2008a, 2008b, 2011).

Nadmierna sztywność naczyń tętniczych powoduje szereg niekorzystnych konsekwencji, w tym szybszy powrót fali odbitej, która dociera do aorty wstępującej w fazie skurczu serca, zwiększając istotnie wzmocnienie ciśnienia skurczowego. To z kolei prowadzi do nadmiernego obciążenia lewej komory i jej przerostu, zwiększonego zapotrzebowania serca na tlen oraz upośledzonego krążenia wieńcowego (Nichols i Edwards, 2001; Nichols i Singh, 2002; Saeki et al., 1995).

W nadciśnieniu tętniczym pierwotnym (zwłaszcza źle kontrolowanym) obserwuje się często nadmierną sztywność naczyń. Zjawisko to przypomina mechanizm tzw. błędnego koła, w którym nadciśnienie tętnicze można traktować zarówno jako przyczynę, jak i konsekwencję zwiększonej sztywności naczyń tętniczych (Tomiyaama i Yamashina, 2012). Utrzymujące się podwyższone ciśnienie krwi wewnątrz tętnic uruchamia mechanizmy kompensacyjne, które pozwalają na utrzymanie prawidłowego naprężenia ściany naczynia i zachowanie równowagi hemodynamicznej. W pierwszym etapie obserwowane jest zwiększenie grubości ściany naczynia spowodowane wzrostem ilości elementów sprężystych oraz przebudowa strukturalna głównie w obrębie błony mięśniowej. Na tym etapie sztywność naczyń nie zmienia się lub jest nieznacznie zwiększona. W przypadku dalej utrzymujących się wysokich wartości ciśnienia krwi, dochodzi do wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych i wyraźnego wzrostu sztywności naczyń ze wszystkimi jej konsekwencjami m.in. wzrostem centralnego ciśnienia skurczowego (Cattan et al., 2006; Zieman et al., 2005).

4.5. Wartość predykcyjna sztywności naczyń ocenianej na podstawie prędkości fali tętna PWV

W ostatnich latach wykazano, że stopień sztywności naczyń tętniczych jest niezależnym czynnikiem ryzyka śmierci ze strony układu sercowo-naczyniowego. Podkreśla się wysoką wartość predykcyjną oceny elastyczności/sztywności tętnic w ocenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych, a także możliwość wczesnego wykrywania niekorzystnych rokowniczo zmian w układzie naczyniowym w różnych grupach chorych (Boutouyrie et al., 2002; Laurent et al., 2001, 2003a; Mattace-Raso et al., 2006; Pereira et al., 2013; Ben-Shlomo et al., 2014; Willum-Hansen et al., 2006).

W dokumencie, będącym stanowiskiem ekspertów dotyczącym nieinwazyjnych metod oceny sztywności dużych tętnic, uwzględniono wyniki 11 długoletnich badań wskazujących na wartość prognostyczną sztywności naczyń w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego. Jako złoty standard w ocenie sztywności tętnic uznano pomiar prędkości fali tętna pomiędzy tętnicą szyjną a udową (PWV) (Laurent et al., 2006). Wartość prognostyczna parametru PWV, niezależnie od innych klasycznych czynników ryzyka, została udowodniona w wielu badaniach obejmujących zarówno populację generalną, jak i nadciśnieniową. M.in. badanie przeprowadzone w grupie 1045 chorych wskazało, że u osób z niepowikłanym nadciśnieniem pierwotnym wartość parametru PWV wykazuje niezależną wartość prognostyczną w zakresie śmiertelności całkowitej i chorobowości z przyczyn sercowo-naczyniowych, incydentów wieńcowych i udarów mózgu. Największą wartość predykcyjną PWV stwierdzono u tych chorych, którzy według skali *Framingham* zostali zakwalifikowani do grupy niskiego ryzyka (Laurent et al., 2001). Obserwacje te zostały również potwierdzone przez Mattace-Raso et al. (2006) oraz Willum-Hansen et al. (2006), którzy potwierdzili wartość parametru PWV jako niezależnego predyktora umieralności z przyczyn sercowo-naczyniowych w populacji generalnej. Wartość predykcyjna PWV pozostała taka sama nawet u tych chorych, u których stosowano leczenie wobec modyfikowalnych klasycznych czynników ryzyka np. zaburzeń gospodarki węglowodanowej czy lipidowej. Potwierdza to wartość predykcyjną PWV niezależnie od stosowanego leczenia farmakologicznego i niefarmakologicznego.

Chociaż opublikowane wyniki badań wskazują na liniowy związek między sztywnością naczyń a incydentami sercowo-naczyniowymi, jako wartość progową istotnych zmian właściwości ścian tętnic u chorych z nadciśnieniem tętniczym zaproponowano wartość powyżej 12 m/s. Od 2007 roku ocenę sztywności naczyń na podstawie parametru PWV ujęto w wytycznych ESH (Mancia et al., 2007).

4.6. Czynniki genetyczne a sztywność naczyń

Wyniki badań populacyjnych wykazały, że sztywność naczyń, oceniana m.in. na podstawie parametru PWV, jest cechą uwarunkowaną częściowo genetycznie, a jej dziedziczność szacuje się od 26% do 40% (Mitchell et al., 2005; Sayed-Tabatabaei et al., 2005; Seidlerova et al., 2008). To zapoczątkowało badania zmierzające do identyfikacji genów wykazujących związek ze sztywnością naczyń. W ciągu ostatnich lat najczęściej stosowano model badań asocjacyjnych tzw. genów kandydujących. Wybór genów kandydujących dla sztywności naczyń nawiązuje do patogenetycznych hipotez podłoża choroby. W badaniach nad podłożem genetycznym zjawiska sztywnienia tętnic ocenia się najczęściej wpływ polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) genów kandydatów, których produkty związane z kontrolą ciśnienia tętniczego. Należą do nich geny kodujące m.in. składniki układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS, ang. *renin-angiotensin-aldosterone system*), syntazę tlenku azotu (NO), endotelinę i jej receptory, białka sygnałowe G oraz geny kodujące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej naczynia krwionośnego oraz czynniki wpływające na jej właściwości (Khaleghi i Kullo, 2007;

Lacolley et al., 2009; Nilsson, 2012; Yasmin i O'Shaughnessy, 2008; Polonis et al., 2011).

4.6.1. Geny związane z kontrolą ciśnienia krwi

Spośród genów kandydatów związanych z kontrolą ciśnienia tętniczego krwi, największe zainteresowanie budzą geny kodujące składowe układu RAAS, a szczególnie polimorfizm genu angiotensynogenu (*AGT*), konwertazy angiotensyny (*ACE*) i syntazy aldosteronu (*CYP11B2*).

W ostatnich latach trwają intensywne badania m.in. nad polimorfizmem 704C>T (rs699) genu *AGT* polegającego na tranzycji nukleotydu cytozynowego na tyminowy, co skutkuje zmianą sekwencji aminokwasów w łańcuchu białkowym angiotensyny (Met235Thr). Badanie przeprowadzone w grupie chorych na nadciśnienie tętnicze wykazało, że nosiciele genotypu TT charakteryzują się wyższym o 15–40% stężeniem angiotensynogenu oraz zwiększoną grubością kompleksu IMT w porównaniu z homozygotami CC. Chorzy z genotypem TT wykazywali także mniejszą podatność tętnicy szyjnej określanej za pomocą modułu Younga (stosunek modułu sprężystości do grubości ściany tętnicy i jej napięcia) niezależnie od ciśnienia krwi. Nie wykazano natomiast związku tego polimorfizmu ze sztywnością naczyń ocenianą na podstawie parametru PWV (Bozec et al., 2004). Związku tego polimorfizmu z jakimkolwiek fenotypem sztywności naczyń (tj. PWV, podatnością czy ciśnieniem tętna) nie zaobserwowano natomiast w badaniu *The Rotterdam Study* (Sie et al., 2009). Baker et al. (2007) wykazali natomiast związek innego polimorfizmu genu *AGT* (235C>T) ze wzrostem sztywności tętnic i ciśnienia tętna. Zakładając model addytywny, stwierdzono, że z każdą kopią allelu T ciśnienie tętna wzrasta o 5%.

Opublikowano wiele wyników badań dotyczących związku polimorfizmu 1166A>C genu *AGTRI* ze sztywnością naczyń u chorych z nadciśnieniem tętniczym (Benetos et al., 1995, 1996, 2013; Gardier et al., 2004; Lajemi et al., 2001a). Jedno z pierwszych badań wykazało związek tego polimorfizmu ze sztywnością tętnic zarówno u chorych na nadciśnienie tętnicze, jak i u osób normotensyjnych, nawet po uwzględnieniu wieku, wartości ciśnienia tętniczego oraz wskaźnika masy ciała (BMI) (Benetos et al., 1996). Wyniki tych badań zostały potwierdzone po 16-letniej obserwacji, w której wykazano, że nosiciele allelu C charakteryzowali się o 35% wyższą wartością parametru PWV w porównaniu z nosicielami allelu A (Benetos et al., 2013). Lajemi et al. (2001a) wykazali z kolei, że polimorfizm 153A>G genu *AGTRI* wpływa na tempo wzrostu sztywności tętnic wraz z wiekiem, a związek ten jest szczególnie widoczny po 55 r.ż. Co więcej, wyniki badań sugerują, że u chorych z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym polimorfizmy 1166A>C i 153A>G mogą mieć addytywny wpływ na progresję sztywnienia naczyń wraz z wiekiem.

Związek polimorfizmu I/D genu konwertazy angiotensyny *ACE* (polimorfizm insercyjno/delecyjny) ze sztywnością dużych tętnic jest szeroko dyskutowany, a wyniki opublikowanych badań często stoją w sprzeczności. Niektóre badania wykazały, że allel I wykazuje związek ze wzrostem sztywności tętnic zarówno u chorych z nadciśnieniem tętniczym, jak i z prawidłowymi wartościami ciśnienia krwi (Benetos et al., 1996; Dima et al., 2008) oraz u chorych z cukrzycą typu II (Ljungberg et al., 2014; Taniwaki et al.,

1999). Z kolei wyniki badania *The Rotterdam Study* wskazały, że genotyp ID i DD jest związany z lokalną zwiększoną sztywnością tętnicy szyjnej i wartością ciśnienia tętna (szczególnie u osób poniżej 70 r.ż.), ale nie z prędkością fali tętna PWV (Mattace-Raso et al., 2004; Sie et al., 2009). Bardzo interesujących wyników dostarczyło również prospektywne badanie populacyjne FLEMENGHO (*Flemish Study on Environment Genes and Health Outcomes*), które wskazało na wzajemne oddziaływanie polimorfizmów genu konwertazy angiotensyny (*ACE*), alfa-adducyny (*ADD*) i syntazy aldosteronu (*CYP11B2*) na właściwości ścian dużych tętnic. U homozygot pod względem allelu D obserwowano również zwiększoną sztywność naczyń, ale jedynie przy współwystępowaniu allelu W (Trp) genu alfa-adducyny (Balkestein et al., 2002).

Spośród wielu polimorfizmów genu syntazy aldosteronu (*CYP11B2*) najwięcej badań poświęcono transwersji nukleotydu cytozynowego na tyminowy w pozycji -344 (rs1799998, -344C>T). Polimorfizm ten zlokalizowany jest w odcinku promotorowym, mogąc w ten sposób modulować poziom ekspresji genu. Pojoga et al. (1998) zaobserwował zwiększony poziom osoczowego aldosteronu u homozygot CC w porównaniu z homozygotami TT. Szereg innych badań nie potwierdziło natomiast związku tego polimorfizmu ze stężeniem aldosteronu, wykazało zaś jego związek z ryzykiem nadciśnienia tętniczego (Hlubocká et al., 2009; Sookoian et al., 2007). Niektóre opublikowane prace wykazały związek polimorfizmu -344C>T ze sztywnością tętnic ocenianą m.in. na podstawie parametru PWV (Pojoga et al., 1998; Safar et al., 2005; Wojciechowska et al., 2004), inne natomiast zaprzeczyły temu związkowi (Balkestein et al., 2002; Lajemi et al., 2001a). Jedno z ostatnich badań wykazało związek allelu C ze wzrostem wartości aortalnej fali tętna i zjawiskiem szybszego powrotu fali odbitej u chorych z nadciśnieniem tętniczym (Blacher et al., 2010). Wyniki innych badań sugerują, że obserwowany efekt może być modulowany przez wysoki poziom wydalania sodu, co wskazuje na możliwą interakcję polimorfizmu z czynnikami środowiskowymi (Wojciechowska et al., 2004, 2007).

Endotelina jest wytwarzanym przez komórki śródbłónka peptydem o silnym działaniu wazokonstrykcyjnym. Odgrywa też ważną rolę w biologii układu naczyniowego wpływając na syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej naczyń (Abraham i Dashwood, 2008). Pomimo że rola endoteliny i jej receptorów w nadciśnieniu tętniczym nie jest jasna, to opublikowano wyniki badań potwierdzające związek polimorfizmów genów *EDNI*, *EDNRA* i *EDRB* (kodujących odpowiednio endotelinę-1 oraz jej receptory) z nadciśnieniem tętniczym i sztywnością naczyń (Jin et al., 2003; Lajemi et al., 2001b; Nicaud et al., 1999). Przykładowo, w badaniu obejmującym chorych z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym, wykazano związek polimorfizmu -231A>G oraz 1363C>T genu *EDNRA*, polimorfizmu 30G>A genu *EDNRB* oraz polimorfizmu -1381I/D genu *EDNI* z prędkością fali tętna (PWV). W grupie kobiet allel -231G i 30G był związany z wyższymi wartościami parametru PWV niezależnie od czynnika wieku. Takiej zależności nie obserwowano jednak u mężczyzn, co może sugerować interakcję tych polimorfizmów z płcią (Lajemi et al., 2001b).

Tlenek azotu (NO) jest jednym z głównych neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym, bierze udział w regulacji hemostazy w nerkach, w układzie

sercowo-naczyniowym oraz jest mediatorem reakcji zapalnej. Wyniki badań sugerują, że obniżenie poziomu NO może być spowodowane m.in. genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami aktywności śródbłonkowej syntazy NO (Dosenko et al., 2002; Gerritsen, 2005). W wielu pracach wykazano zależność zmian w obrębie genu *NOS3*, kodującego syntazę NO ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych tj. nadciśnieniem tętniczym, chorobą wieńcową czy zawałem serca (Heltianu et al., 2005; Salvi et al., 2013). Publikowane wyniki badań dotyczące związku polimorfizmów genu *NOS3* z nadciśnieniem tętniczym i sztywnością naczyń często są jednak sprzeczne (Pereira et al., 2007). Przykładowo, wykazano związek polimorfizmu 894G>T genu *NOS3* ze sztywnością naczyń w populacji amerykańskiej pochodzenia afrykańskiego. W badaniu tym nosiciele allelu T charakteryzowali się niższym skurczowym ciśnieniem krwi i mniejszą sztywnością tętnicy szyjnej, ale nie sztywnością ocenianą na podstawie parametru PWV (Chen et al., 2004). Wyniki tych badań są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Lacolley et al. (1998), co może tłumaczyć obserwowane etniczne różnice występowania nadciśnienia tętniczego i zjawiska sztywnienia naczyń. Interesujące są również wyniki badań, które sugerują, że wpływ polimorfizmów genu *NOS3* jest zależny od interakcji z paleniem papierów (Mayer et al., 2010), a także z polimorfizmem genu podjednostki $\beta 3$ białka G (*GNB3*) (Bhuiyan et al., 2008).

Białka G o aktywności GTP-azy stanowią grupę polimorficznych białek związanych z transdukcją sygnału w komórkach. Zaktywowane białka G uczestniczą w regulowaniu aktywności enzymów oraz kanałów jonowych (Farfel et al., 1999). Potencjalny mechanizm związku polimorfizmu genu *GNB3* kodującego podjednostkę $\beta 3$ białka G ze sztywnością naczyń nie jest jasny. Sugeruje się, że białko G uczestnicząc m.in. w procesach proliferacji i migracji komórek mięśniówki gładkiej, aktywacji i adhezji płytek krwi, może wpływać na procesy miażdżycowe i przebudowy ścian tętnic (Siffert, 2005). Wiele badań wykazało związek polimorfizmu 825C>T (rs5443) genu (*GNB3*) z nadciśnieniem tętniczym (Sartori et al., 2004; Siffert, 2003, 2005; Zhu et al., 2006). Do tej pory opublikowano niewiele wyników badań dotyczących związku tego polimorfizmu ze sztywnością naczyń. Nürnbergger et al. (2004) w badaniu populacji młodych mężczyzn wykazał zwiększoną wartość parametru PWV i współczynnika wzmocnienia (AIx) u nosicieli allelu T, a związek ten pozostał niezależny od współistniejących czynników ryzyka. Badania rodzin włączonych do międzynarodowego badania EPOGH (*European Project on Genes in Hypertension*) potwierdziły te obserwacje, ale jedynie w starszej grupie pokoleniowej badanej populacji (Olszanecka et al., 2004). Z kolei wyniki badań Jerrard-Dunne et al. (2007) zaprzeczyły związkowi polimorfizmu 825C>T z nadciśnieniem tętniczym i sztywnością naczyń.

4.6.2. Geny związane z właściwościami macierzy zewnątrzkomórkowej naczyń

Sztywność naczyń zależy od szeregu czynników, w tym od właściwości elementów macierzy pozakomórkowej naczyń, głównie kolagenu, elastyny oraz fibriliny. Elementy te ulegają ciągłemu procesowi przebudowy, w którym biorą udział macierzowe metaloproteinazy (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) należące do

rodziny wielodomenowych enzymów proteolitycznych, zawierających w miejscu katalitycznym jon cynku. Związek aktywności MMP z wieloma procesami fizjologicznym, takimi jak apoptoza, angiogeneza czy migracja komórek, które są powiązane z wieloma stanami patologicznymi, doprowadziły do intensywnych badań nad tą grupą enzymów (Hamacher et al., 2004; Malesud, 2006). Badania te również obejmują wpływ polimorfizmów genów kodujących MMP oraz ich substratów na zaburzenia w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej naczyń krwionośnych i ich przebudowę oraz związek z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. Badania nad wpływem polimorfizmów genetycznych na właściwości ściany tętnic skupiają się głównie na genach kodujących włókna elastyny, fibrilinę-1 i MMP (Kingwell i Boutouyrie, 2007).

Fibrylina-1 jest glikoproteinową składową mikrofibrili macierzy zewnątrzkomórkowej, które uczestniczą we właściwym formowaniu i dojrzewaniu włókien elastynowych, nadając odpowiednią elastyczność tkance łącznej (Kielty et al., 2002, 2005). Najintensywniejsze badania dotyczą polimorfizmów genu *FBNI* o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń motywu TAAAA (polimorfizm VNTR) w intronie 28. Mimo że związek polimorfizmu regionu intronowego genu *FBNI* ze zjawiskiem sztywnienia tętnic nie jest jasny, postuluje się, że może on wpływać na poziom ekspresji genu *FBNI* lub (ze względu na lokalizację w pobliżu końca 3' egzonu 28) na proces składania mRNA (Biery et al., 1999; Pereira et al., 1993).

W badaniu obejmującym zdrowych mężczyzn wykazano, że osoby z genotypem 2-3 VNTR charakteryzowały się wyższymi wartościami ciśnienia krwi, zwiększoną sztywnością naczyń i ciśnieniem tętna w porównaniu z genotypem 2-2 i 2-4 (Powell et al., 2005). Medley et al. (2002) wykazali z kolei związek genotypu 2-3 ze zwiększoną sztywnością aorty i ciśnieniem tętna u chorych z chorobą wieńcową. Jednocześnie kolejne duże badanie przeprowadzone w populacji zdrowych osób bez stwierdzonej choroby sercowo-naczyniowej i współistniejących czynników ryzyka w wywiadzie, nie wykazało żadnego związku polimorfizmu VNTR ze sztywnością tętnic ocenianą na podstawie parametru PWV i wskaźnika wzmocnienia (AIx), po uwzględnieniu czynnika wieku, płci czy średniego ciśnienia tętniczego (Yasmin et al., 2006a).

Elastyna jest białkiem strukturalnym o budowie fibrylarnej, która nadaje właściwości elastyczne naczyniom krwionośnym (Baldwin et al., 2013). Jak dotąd opublikowano wyniki tylko jednego badania, które badało związek pomiędzy polimorfizmem 422A>G genu *ELN* a sztywnością naczyń w zdrowej populacji bez stwierdzonej choroby sercowo-naczyniowej (Hanon et al., 2001). W badaniu tym stwierdzono, że nosiciele allelu A charakteryzowali się zmniejszoną podatnością tętnicy szyjnej w porównaniu z nosicielami allelu G, również po uwzględnieniu czynnika wieku i średniego ciśnienia krwi. Związek był szczególnie zaznaczony u osób powyżej 50 r.ż. Nie wykazano natomiast związku polimorfizmu ze sztywnością tętnic obwodowych, co może wynikać z różnic w budowie tętnic szyjnej i udowej.

Opublikowano dwa wyniki badań nad związkiem polimorfizmu 2064G>T genu *COL1A* (kodującego kolagen typu 1A) ze sztywnością naczyń. W dużym badaniu kohortowym obejmującym zdrowe osoby, wykazano większą podatność tętnic u osób z genotypem GG. Związek ten był niezależny od płci, średniej wartości ciśnienia krwi,

wskaźnika masy ciała BMI, wywiadu rodzinnego w kierunku nadciśnienia tętniczego czy palenia papierosów (Brull et al., 2001). Podobną tendencję wykazał również Powell et al. (2005), chociaż wynik nie osiągnął zadanego poziomu istotności.

Stromielizyna typu 1 (MMP-3) może odgrywać jedną z kluczowych ról w sztywności naczyń, ponieważ bierze udział w degradacji elastyny oraz aktywuje liczne proenzymy. Do najbardziej intensywnie badanych polimorfizmów genu *MMP-3* należy polimorfizm -1612 5A>6A (rs3025058). Polimorfizm ten zlokalizowany jest w miejscu promotorowym genu, zatem może wpływać na poziom jego ekspresji. Badania istotnie potwierdziły, że polimorfizm ten wpływa na powinowactwo wiązania się miejsca regulatorowego promotora genu z czynnikiem represyjnym ZBP-89 (Ye, 2000; Ye et al., 1995). Medley et al. (2003) wykazał związek genotypów 5A/5A i 6A/6A ze zwiększoną sztywnością naczyń u chorych powyżej 61 r.ż. Co więcej, u nosicieli allelu 5A i 6A stwierdzono odpowiednio, 4-krotnie i 2-krotnie większy poziom ekspresji MMP-3 w porównaniu z heterozygotami. W innym badaniu przekrojowym obejmującym populację między 27 a 77 r.ż zaobserwowano, że polimorfizm 5A/6A wpływa na wysokość ciśnienia krwi. Homozygoty 5A/5A wykazywały wyższe wartości ciśnienia krwi, a związek ten pozostał silny po uwzględnieniu klasycznych czynników ryzyka. Prawdopodobne wydaje się, że podwyższone wartości ciśnienia krwi u homozygot 5A/5A są powiązane z nasilonymi procesami degradacji elastyny w ścianie naczynia oraz w konsekwencji ich sztywnieniem (Beilby et al., 2005).

Metaloproteinaza MMP-9 (gelatynaza B) degraduje głównie kolagen IV, czego konsekwencją jest zniszczenie fizycznej bariery uniemożliwiającej komórkom migrację. Może mieć to znaczenie podczas stanów zapalnych i naciekania makrofagów. MMP-9 degraduje również włókna elastyny w błonie podstawnej naczynia, biorąc udział w procesie jego przebudowy i sztywnienia (Galis et al., 2002; Yasmin et al., 2005).

Najwięcej doniesień naukowych dotyczy polimorfizmu -1562C>T (rs3918242) znajdującego się w regionie promotora genu *MMP-9*. Badania wskazują, że polimorfizm ten wpływa na poziom ekspresji genu poprzez interakcję z jądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że allel T związany jest ze zwiększonym poziomem ekspresji genu *MMP-9* (Zhang et al., 1999). Ten sam efekt *in vivo* potwierdził Medley et al. (2004), wykazując u nosicieli allelu T wyższy poziom mRNA oraz samej MMP-9. Dodatkowo Blankenberg et al. (2003) wykazał związek tego polimorfizmu z ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Podobnie jak w przypadku polimorfizm -1612 5A>6A genu *MMP-3*, wiele badań wykazało związek polimorfizmu -1562C>T ze sztywnieniem tętnic. Medley et al., (2002) wykazał, że nosiciele allelu T z rozpoznaną chorobą wieńcową charakteryzują się zwiększoną sztywnością aorty ocenianą na podstawie charakterystyki impedancji w porównaniu z homozygotami CC. Związek ten pozostał silny po uwzględnieniu czynnika wieku, płci, średniego ciśnienia krwi oraz stężenia lipidów we krwi. Co więcej, nosiciele allelu T wykazali istotnie wyższe skurczowe ciśnienie krwi oraz ciśnienie tętna. Yasmin et al. (2006b) badał również związek polimorfizmu 855A>G genu *MMP-9* (inaczej: 279R>Q, Arg279Gln, rs17576) na zjawisko sztywnienia tętnic w zdrowej populacji mężczyzn i kobiet. Nosiciele allelu Q wykazywali wyższe wartości

parametru PWV w porównaniu z homozygotami RR, a efekt ten był niezależny od płci. Ponadto u osób z genotypem QQ stwierdzono najwyższe stężenie białka MMP-9. Wynik ten sugeruje, że sztywnienie dużych naczyń u nosicieli allelu Q może być powiązane ze zmożonymi procesami degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Ta obserwacja jest potencjalnym wyjaśnieniem zwiększonej prędkości fali tętna u nosicieli allelu Q polimorfizmu 855A>G i allelu T polimorfizmu -1562C>T.

4.6.3. Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS)

Dzięki spektakularnym postępom w zakresie genetyki molekularnej, od 2005 roku jedną z najszerzej stosowanych technik badania związku danego fenotypu z genami i polimorfizmami genetycznymi jest asocjacyjne badanie całego genomu (GWAS, ang. *genome-wide association study*). W odróżnieniu od badań asocjacyjnych genów kandydatów, badania GWAS są od początku wolne od jakichkolwiek hipotez (każdy gen jest teoretycznie „genem kandydującym”) i polegają na równomiernym przeszukiwaniu całego genomu pod kątem asocjacji z daną jednostką chorobową. Badanie GWAS stwarza zatem nowe możliwości poznania genów związanych z etiopatogenezą przedwczesnego starzenia naczyniowego.

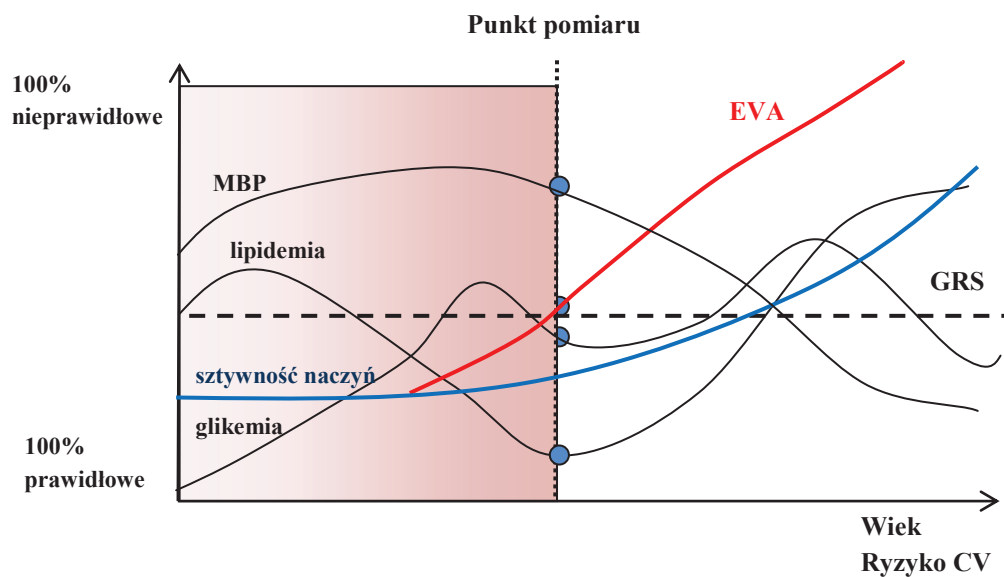
Do tej pory opublikowano niewiele wyników badań GWAS dotyczących sztywności naczyń. W 2009 roku Tarasov et al. (2009) wykazali związek polimorfizmu rs3742207 w genie *COL4A1* ze sztywnością naczyń ocenianą na podstawie parametru PWV. Potwierdziło to wyniki uzyskane metodą asocjacyjną genów kandydatów w latach wcześniejszych ((Brull et al., 2001; Powell et al., 2005). W 2011 roku konsorcjum “*International Consortium of Blood Pressure Genome-Wide Association Studies (ICBP-GWAS)*” opublikowało wyniki badań GWAS dotyczące sztywności naczyń określanej na podstawie ciśnienia tętna (PP, ang. *pulse pressure*) oraz średniego ciśnienia tętniczego (MAP, ang. *mean arterial pressure*) (Wain et al., 2011). Badanie GWAS ujawniło odpowiednio, 5 i 3 nowych *loci* mających związek z PP i MAP. Żaden z genów zlokalizowanych w pobliżu tych miejsc nie był genem kandydującym dla ciśnienia krwi, niemniej autorzy sugerują mechanizmy łączące je z regulacją ciśnienia krwi. Dodatkowo, odpowiednio 5 i 19 polimorfizmów SNP, wykazujących wcześniej związek z ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym krwi, wykazało istotny związek z PP i MAP. W 2012 roku Mitchell et al. (2012) opublikowali wyniki badań wskazujące na związek polimorfizmu rs7152623 (zlokalizowanego w obrębie genu *BCL11B* kodującego czynniki transkrypcyjne) z prędkością fali tętna PWV. Co więcej, polimorfizm ten wykazał związek z ryzykiem choroby wieńcowej i niewydolnością nerek.

4.7. Koncepcja genetyczno-epidemiologicznego modelu zjawiska sztywnienia naczyń

Wiele opublikowanych badań wykazało istotny związek sztywności naczyń tętniczych z klasycznymi czynnikami ryzyka, do których zaliczamy m.in. zaburzenia gospodarki lipidowej i węglowodanowej, otyłość, wysokość ciśnienia tętniczego krwi czy palenie tytoniu (Bastard et al., 2006; Cecelja i Chowienczyk, 2012; Franklin, 2008;

Nilsson, 2011). Czynniki te można uznać za fenotypy pośrednie, które mogą w znaczący sposób ułatwić wyodrębnienie poszczególnych zespołów warunkujących proces sztywnienia naczyń. Mimo że sztywność naczyń niesie informację o długotrwałym wpływie tych czynników ryzyka, to czynniki te nie tłumaczą jednak całkowicie tego zjawiska i obserwowanej zmienności międzypersonicznej (Khaleghi i Kullo, 2007). Może to częściowo wynikać z faktu, że zazwyczaj do modelowania zjawiska sztywnienia naczyń wykorzystywane są wartości zmierzone w jednym lub dwóch punktach czasowych. Natomiast natężenie rejestrowanych czynników ryzyka może zmieniać się w czasie pod wpływem zastosowanego leczenia farmakologicznego i niefarmakologicznego (zmiana stylu życia). Dlatego duże nadzieje wiąże się z niemodyfikowalnymi czynnikami ryzyka, których nie można zmienić ani na nie wpłynąć, a które pozwalają zidentyfikować osoby należące do grupy zwiększonego ryzyka sercowo-naczyniowego. Do takich czynników należy m.in. wiek, płeć i czynniki genetyczne (Khaleghi i Kullo, 2007; Martín-Ventura et al., 2009).

Pomimo znacznych dokonań w zakresie profilaktyki i leczenia chorób sercowo-naczyniowych, istnieje nadal potrzeba rozwijania modeli patofizjologicznych opartych na nowych koncepcjach (biomarkerach) dla lepszego zrozumienia i zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego. Rozróżnienie naturalnego starzenia narządów od wczesnych objawów choroby jest jednym z najistotniejszych zagadnień medycznych ostatnich lat. Zakłada się, że modele genetyczno-epidemiologiczne mogą umożliwić skuteczną zidentyfikowanie chorych z predyspozycją do przedwczesnego starzenia naczyniowego. Model taki oparty zarówno na klasycznych czynnikach ryzyka, jak i na swoistym wzorcu niekorzystnych wariantów genetycznych (np. w postaci zliczonej punktacji ryzyka genetycznego [GRS, ang. *genetic risk score*]), może pomóc w przewidywaniu niekorzystnych zmian właściwości ścian dużych tętnic (sztywności naczyń) na wczesnym etapie zmian narządowych (Rys. 1). W przypadku, gdy u chorego z wysoką punktacją ryzyka genetycznego, wskazującą na predyspozycję do syndromu EVA, zostanie stwierdzona nadmierna sztywność naczyń w stosunku do wieku metrykalnego, będzie można skuteczniej ukierunkować działania o charakterze prewencyjnym i podjąć efektywne leczenie.



Rys. 1. Schemat modelu genetyczno-epidemiologicznego obrazujący sztywność naczyń jako fenotyp kumulujący wpływ wieku oraz długoterminowe oddziaływanie czynników ryzyka. W punkcie pomiarowym, stwierdzenie przedwczesnego starzenia naczyniowego wraz z predyspozycją genetyczną (GRS) sugeruje podjęcie odpowiednich kroków diagnostycznych i terapeutycznych. Zmodyfikowane na podstawie Nilsson et al., (2009).

MBP – średnie ciśnienie krwi, **EVA** – syndrom przedwczesnego starzenia naczyniowego, **GRS** – zliczona punktacja ryzyka genetycznego, **ryzyko CV** – ryzyko sercowo-naczyniowe.

V. HIPOTEZA BADAWCZA

5.1. Zasadność prowadzonych badań

Niniejsza rozprawa doktorska jest jednym z kroków w kierunku stworzenia podstaw medycyny molekularnej w diagnostyce i leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz profilaktyce powikłań sercowo-naczyniowych. Dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że wykorzystanie najnowszych osiągnięć biologii molekularnej w medycynie prewencyjnej może pozwolić na przewidywanie przyszłych zdarzeń sercowo-naczyniowych na podstawie analizy genetyczno-środowiskowego uwarunkowania ich rozwoju. W niedalekiej przyszłości, uwzględnienie molekularnego podtypu choroby oraz osobniczej zmienności odpowiedzi na leczenie i czynniki środowiskowe może wspomóc tradycyjne sposoby leczenia nadciśnienia tętniczego (wynikające z osobistego doświadczenia lekarza), prowadząc do:

- Bardziej precyzyjnego szacowania ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych u chorych z rozpoznanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym,
- Indywidualizacji procesu diagnostycznego i leczniczego (konceptja terapii „szytej na miarę” pacjenta, terapii personalizowanej),
- Bardziej wydajnej opieki medycznej w odniesieniu do pojedynczego chorego, jak i całej populacji na poziomie systemu ochrony zdrowia, a tym samym zmniejszenia przypadków poważnych powikłań nadciśnienia tętniczego (tj. zawałów serca czy udarów mózgu) i obniżenia społecznych kosztów chorób układu krążenia.

Wyrazem wczesnych powikłań naczyniowych w przebiegu nadciśnienia tętniczego jest zmiana właściwości ścian naczyń tętniczych przejawiających się m.in. zwiększeniem ich sztywności. Coraz więcej dowodów naukowych wskazuje, że zmiany we właściwościach ścian dużych naczyń tętniczych są:

- Niezależnym od innych czynników **predyktorem chorobowości i umieralności** z przyczyn sercowo-naczyniowych (Gasecki et al., 2012; Laurent et al., 2001, 2003b, 2012).
- Konsekwencją **wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych** naczyń tętniczych w odpowiedzi na utrzymujące się podwyższone ciśnienie krwi (nadciśnienie tętnicze) (Schiffrin, 2011)
- Zależne od **czynników genetycznych** oraz **czynników środowiskowych**.

Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) dotyczące fenotypów sercowo-naczyniowych i ich czynników ryzyka wskazały na istotne asocjacje na poziomie genomu. Wykazały one związek polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) z wysokością ciśnienia tętniczego krwi, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz innymi klasycznymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego oraz ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych np. choroby wieńcowej serca, zawału, udaru, niewydolności nerek.

Metaanalizy wyników GWAS potwierdziły ponadto, że niektóre polimorfizmy SNP związane z m.in. z wysokością ciśnienia krwi, okazały się być również związane z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. Sugeruje to, że różne fenotypy sercowo-naczyniowe mogą być manifestacją kliniczną częściowo wspólnego podłoża genetycznego.

5.2. Hipoteza badawcza

Szywność naczyń można rozważyć zarówno jako fenotyp pośredni, jak i końcowy. Zwiększona szywność naczyń, oceniana np. na podstawie szyjno-udowej prędkości fali tętna, PWV, jest niezależnym od innych czynników predyktorem zdarzeń sercowo-naczyniowych (Adji et al., 2011; Ben-Shlomo et al., 2014). W tym kontekście szywność naczyń można uznać jako fenotyp pośredni dla ryzyka wystąpienia zawału serca, udaru czy przewlekłej niewydolności nerek (Laurent i Boutouyrie, 2007b). Jednocześnie wyniki badań wskazują na związek wysokości ciśnienia krwi, zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej, otyłości oraz palenia papierosów itp. ze szywnością naczyń (Cavalcante et al., 2011; Laurent i Boutouyrie, 2007a; Nilsson, 2011). W tym kontekście te czynniki można rozpatrywać jako fenotypy pośrednie mające związek ze szywnością naczyń jako fenotypem końcowym.

Biorąc pod uwagę powyższe, wydaje się zasadne postawienie hipotezy, że część polimorfizmów SNP, które w badaniach GWAS wykazały związek z ryzykiem choroby niedokrwiennej serca, zawałem serca czy niewydolnością nerek, powinna wykazać również związek ze szywnością naczyń. Podobnie, te polimorfizmy SNP, które w badaniach GWAS wykazały związek z wysokością ciśnienia krwi, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i lipidowej powinny wykazać również związek ze szywnością naczyń.

W obecnej chwili związek polimorfizmów SNP wpływających na ciśnienie krwi, gospodarkę lipidową czy ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych z właściwościami ścian dużych tętnic u chorych z rozpoznaniem pierwotnym nadciśnieniem tętniczym jest bardzo słabo udokumentowany. Stwierdzenie takiego związku wydaje się celowe, ponieważ polimorfizmy te mogą być potencjalnie wykorzystane jako markery genetyczne przewidujące niekorzystne zmiany strukturalne tętnic w przebiegu nadciśnienia tętniczego, a docelowo przewidywać ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Według wytycznych postępowania w nadciśnieniu tętniczym (ESH i PTNT) ocena stanu naczyń tętniczych jest jednym z elementów szacowania globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego, od którego zależy postępowanie z chorym. Dodatkowo w szacowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego bierze się pod uwagę takie czynniki ryzyka jak dyslipidemia, zaburzona gospodarka węglowodanowa, otyłość czy palenie tytoniu. Czynniki te jednak mogą ulegać modyfikacji w trakcie całego życia, tym samym zmieniając przynależność chorego do kategorii globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego.

Zaletą koncepcji zliczonej punktacji ryzyka genetycznego (GRS, ang. *genetic risk scores*), które sumują efekt polimorfizmów typu SNP, jest fakt, że opierają się na właściwościach organizmu, które z zasady nie ulegają zmianom i w stosunkowo prosty sposób można je oznaczyć. W praktyce klinicznej może to pozwolić na zastosowanie odpowiedniej dalszej diagnostyki i leczenia jeszcze przed wystąpieniem uszkodzeń subklinicznych w celu zminimalizowania ryzyka poważnych powikłań sercowo-naczyniowych tj. zawałów i udarów mózgu niezależnie lub, co bardziej prawdopodobne, komplementarnie z tradycyjnymi czynnikami ryzyka.

5.3. Cel badań

Celem badań objętych niniejszą rozprawą doktorską jest ocena związku polimorfizmów SNP z właściwościami ścian dużych tętnic. Cel ten został osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

Cel 1: Identyfikacja polimorfizmów SNP, które wyjaśniają zmienność cechy fenotypowej jaką jest szyjno-udowa prędkość fali tętna (PWV, ang. *pulse wave velocity*).

Cel 2: Skonstruowanie zliczonej punktacji ryzyka genetycznego (GRS, ang. *genetic risk scores*) dla parametru PWV oraz weryfikacja czy średnie wartości PWV różnią się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami punktacji ryzyka genetycznego.

Cel 3: Weryfikacja czy zaproponowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS wyjaśniają w sposób istotny większą część zmienności parametru PWV niż każdy z polimorfizmów SNP osobno.

Cel 4: Zaproponowanie wstępnych modeli predykcyjnych, przewidujących ryzyko syndromu przedwczesnego starzenia naczyń i ryzyka sercowo-naczyniowego, opartych na danych klinicznych i opracowanych punktacjach ryzyka genetycznego GRS, w celu przyszłej walidacji i określenia ich wartości predykcyjnej w populacji chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze.

VI. MATERIAŁY I METODY

6.1. Badana grupa

Badanie przeprowadzono w Zakładzie Nadciśnienia Tętniczego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed). Do badania włączono łącznie 860 chorych, z czego 7 chorych zrezygnowało z udziału w trakcie badania. Ostatecznie analizy przeprowadzono w grupie 853 chorych w wieku od 18 do 84 lat (średni wiek±odchylenie standardowe /SD, ang. *standard deviation*/, 54,45±13,5), kobiet i mężczyzn, z rozpoznaniem pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Chorzy byli rekrutowani do badania w ramach zainicjowanego przez Zakład Nadciśnienia Tętniczego Ogólnopolskiego Rejestru Nadciśnienia Tętniczego. Wszyscy chorzy włączeni do badania, po zapoznaniu się z jego projektem, wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu. Formularz zgody na udział w badaniu został zaaprobowany przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy GUMed.

6.2. Kryteria włączenia i wyłączenia do badania

Kryteria włączenia do badania:

- a. Pierwotne nadciśnienie tętnicze i wiek powyżej 18 r.ż.

Kryteria wyłączenia:

- a. Brak pisemnej zgody na udział w badaniu
- b. Kobiety w ciąży lub karmiące
- c. Wtórne nadciśnienie tętnicze
- d. Schyłkowa niewydolność serca
- e. Schyłkowa niewydolność nerek
- f. Choroba zastawek serca
- g. Ciężkie powikłania cukrzycy (np. stopa cukrzycowa)
- h. Choroba nowotworowa

6.3. Dane kliniczne

Dane do oceny klinicznej chorych włączonych do badania zostały zebrane podczas badania przedmiotowego, podmiotowego i dodatkowych badań według zaleceń Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) i Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH) (Widecka et al., 2011). Charakterystyka badanej populacji pod względem analizowanych w pracy zmiennych została przedstawiona w Tab. 1 oraz Tab. 2.

Tab. 1. Charakterystyka badanej populacji chorych pod względem analizowanych zmiennych ciągłych (statystyki opisowe).

Zmienna	Jednostka	N	Średnia	SD	CI dla średniej		Min	Max	Skośność	Kurtozja
					- 95%	+ 95%				
Wiek	[lata]	853	54,45	13,53	53,54	55,36	18,00	84,00	-0,51	-0,11
Trwanie NT	[lata]	853	13,64	9,70	12,99	14,29	0,00	47,00	0,71	0,01
TC	[mg/dl]	851	197,47	45,07	194,44	200,51	103,00	617,00	1,57	9,28
HDL	[mg/dl]	851	49,20	13,62	48,28	50,12	24,00	155,00	1,64	6,67
TG	[mg/dl]	851	139,16	134,07	130,14	148,18	31,00	3326,00	16,41	377,44
LDL	[mg/dl]	838	121,03	37,52	118,48	123,57	32,20	293,60	0,76	1,27
eGFR	[ml/min·1,72m ²]	851	90,04	18,50	88,79	91,28	37,29	160,25	0,06	0,17
Liczba leków		848	2,92	1,50	2,82	3,02	0,00	7,00	0,21	-0,30
SBPdn	[mmHg]	849	129,10	12,85	128,24	129,97	102,41	192,08	0,98	2,44
DBPdn	[mmHg]	849	76,95	9,19	76,33	77,57	52,08	119,48	0,24	0,67
PPdn	[mmHg]	849	52,16	10,16	51,47	52,84	29,50	95,87	1,05	1,61
SBPd	[mmHg]	849	132,19	13,15	131,30	133,08	102,98	195,26	0,88	2,16
DBPd	[mmHg]	849	79,50	9,52	78,85	80,14	52,81	122,07	0,19	0,60
PPd	[mmHg]	849	52,70	10,36	52,00	53,39	29,54	98,75	1,01	1,59
SBPn	[mmHg]	846	118,44	14,26	117,48	119,40	82,57	192,29	0,96	2,17
DBPn	[mmHg]	846	68,16	9,94	67,49	68,83	38,86	114,14	0,50	0,82
PPn	[mmHg]	846	50,28	10,42	49,58	50,99	29,00	95,60	1,00	1,22
BMI	[kg/m ²]	853	29,78	5,04	29,44	30,12	17,60	50,60	0,65	0,46
Pas	[cm]	853	101,30	13,83	100,37	102,22	64,00	151,00	0,27	0,03
Biodra	[cm]	853	107,08	8,80	106,49	107,67	87,00	154,00	0,89	1,66
WHR		853	0,94	0,09	0,94	0,95	0,73	1,22	0,08	-0,27
PWV	[m/s]	770	10,20	2,25	10,04	10,36	5,50	24,80	1,40	4,70

NT – nadcisnienie tętnicze; TC – cholesterol całkowity; HDL – cholesterol LDL; TG – trójglicerydy; LDL – cholesterol LDL; eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej; SBPdn, SBPd, SBPdn – średnie ciśnienie skurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; DBPdn, DBPd, DBPn – średnie ciśnienie rozkurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; PPdn, PPd, PPn – średnie ciśnienie tętna odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; BMI – wskaźnik masy ciała; WHR – stosunek obwodu pasa do obwodu bioder; PWV – szybkość propagacji fali tętna; SD – odchylenie standardowe; CI – 95% przedział ufności; Min – wartość minimalna; Max – wartość maksymalna.

Tab. 2. Charakterystyka badanej populacji pod względem analizowanych zmiennych o charakterze jakościowym.

Zmienna	N	%	N ogółem
Choroba sercowo-naczyniowa (CVD):	148	17,35	853
Choroby serca, w tym:	100	11,72	853
CHD	92	10,78	853
MI	29	3,40	853
PTCA	25	2,93	853
CABG	7	0,82	853
HF	11	1,29	853
Choroba naczyń mózgowych, w tym:	63	7,38	853
Udar niedokrwienny	39	4,57	853
Udar krwotoczny	4	0,47	853
TIA	13	1,52	853
Inne	7	0,82	853
Dyslipidemia	652	76,44	853
Zaburzenia węglowodanowe, w tym:	350	40,98	853
DM1	1	0,12	853
DM2	174	20,40	853
IGF/IGT	174	20,40	853
Palenie	116	13,60	853
Płeć*	463	54,28	853

* - podane dla mężczyzn

CHD – choroba wieńcowa; **MI** – zawał serca; **PTCA** - stan po rewaskularyzacji naczyń wieńcowych; **CABG** – pomostowanie aortalno-wieńcowe; **HF** – niewydolność serca; **TIA** – przemijające ataki niedokrwienne; **DM1/DM2** – cukrzyca typu 1/typu 2; **IGF/IGT** – nieprawidłowa glikemia na czczo/upośledzona tolerancja glukozy.

6.3.1. Badanie podmiotowe

W trakcie badania podmiotowego uzyskano informacje o:

- Czasie trwania nadciśnienia tętniczego (= rok włączenia do badania – rok rozpoznania) (zmienna **Trwanie NT**)
- Stosowanej terapii hipotensyjnej ze szczególnym uwzględnieniem grupy leków należących do:
 - Inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI, ang. *angiotensin converting enzyme inhibitor*).
 - Antagonistów kanałów wapniowych (CCB, ang. *calcium channel blocker*).
 - Antagonistów receptora angiotensyny (ARB, ang. *angiotensin receptor blocker*).
 - β -blokerów (BB, ang. *beta blocker*).

Zmienna „**Ilość leków**“ stosowana w pracy oznacza ilość przyjmowanych leków hipotensyjnych należących do grupy ACEI i/lub CCB i/lub ARB i/lub BB.

- Historii przebiegu choroby sercowo-naczyniowej (**CVD**, ang. *cardiovascular disease*) tj. o wystąpieniu:
 - Choroby naczyniowej mózgu:

- udar niedokrwienny
- przejściowy atak niedokrwienny (TIA, ang. *transient ischemic attack*)
- udar krwotoczny
- inne nieprawidłowości w strukturze naczyń mózgowych
- Choroby serca:
 - zawał mięśnia sercowego (MI, ang. *myocardial infarction*)
 - choroba wieńcowa (CHD, ang. *coronary heart disease*)
 - stan po rewaskularyzacji naczyń wieńcowych (PTCA, ang. *percutaneous transluminal coronary angioplasty*)
 - pomostowanie aortalno-wieńcowe (CABG, ang. *coronary artery bypass graft*)
 - niewydolność serca (HF, ang. *heart failure*)
- d. Tradycyjnych czynników ryzyka tj.
 - Zaburzenia lipidowe (zmienna **Dyslipidemia**)
 - Zaburzenia węglowodanowe
 - cukrzyca typu 1 (DM1, ang. *diabetes mellitus type 1*) (Zmienna **DM**)
 - cukrzyca typu 2 (DM2, ang. *diabetes mellitus type 2*) (Zmienna **DM**)
 - nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT, ang. *impaired glucose tolerance*)
 - nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG, ang. *impaired fasting glucose*)
 - Palenie tytoniu (bieżące)
 - Otyłość

6.3.2. Badanie przedmiotowe

W trakcie badania podmiotowego uzyskano informacje o:

- a. Wiek chorego
- b. Obwodzie pasa w pozycji stojącej (zmienna **Pas**)
- c. Obwodzie bioder w pozycji stojącej (zmienna **Biodra**)
- d. Wskaźniku masy ciała (**BMI**, ang. *body mass index*) obliczana według wzoru:
masa ciała [kg] / (wzrost [m])²

6.3.3. Badania dodatkowe

- a. Badania biochemiczne krwi wykonano standardowymi metodami analityki medycznej w Akademickim Centrum Medycyny Laboratoryjnej. Zgromadzono następujące parametry laboratoryjne:
 - Profil lipidowy tj.
 - stężenie cholesterolu całkowitego (**TC**, ang. *total cholesterol*)
 - lipoprotein niskiej gęstości (**LDL**, ang. *low density lipoprotein*)
 - lipoprotein wysokiej gęstości (**HDL**, ang. *high density lipoprotein*)

– trójglicerydów (TG)

- Wskaźnik filtracji kłębuszkowej (**eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*) wyliczany na podstawie wzoru MDRD.
- b. 24-godzinna rejestracja ciśnienia tętniczego (ABPM, ang. *ambulatory blood pressure monitoring*) z zastosowaniem urządzenia Spacelab 90207. Pomiaru dzienne rejestrowane były w godzinach 6.00 – 22.00 w odstępach 15 minutowych, pomiary nocne zaś w godzinach 22.00 – 6.00 w odstępach 30 minutowych.

Oceniano następujące parametry:

- Średnie ciśnienie skurczowe (**SBPdn**, ang. *day&night systolic blood pressure*)
- Dzielne średnie ciśnienie skurczowe (**SBPd**, ang. *day systolic blood pressure*)
- Nocne średnie ciśnienie skurczowe (**SBPn**, ang. *night systolic blood pressure*)
- Średnie ciśnienie rozkurczowe (**DBPdn**, ang. *day&night diastolic blood pressure*)
- Dzielne średnie ciśnienie rozkurczowe (**DBPd**, ang. *day diastolic blood pressure*)
- Nocne średnie ciśnienie rozkurczowe (**DBPn**, ang. *night diastolic blood pressure*)

6.3.4. Ocena sztywności naczyń

Sztywność naczyń oceniano za pomocą szyjno-udowej prędkości fali tętna, PWV. Wykorzystano do tego celu metodę tonometrii aplanacyjnej (urządzenie Sphygmocor AtCor 232). Miarą PWV był stosunek odległości, jaką pokonuje fala tętna pomiędzy punktami rejestracji na tętnicy szyjnej i udowej, do czasu jej przejścia między tymi punktami ([m/s]). Wszystkie badania zostały wykonane przez tego samego badacza na tym samym urządzeniu, co zapewniło powtarzalność i wiarygodność wykonanych pomiarów.

6.4. Oznaczenia genetyczne

Izolacja materiału genetycznego została wykonana w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed. Genotypowanie polimorfizmów SNP wykonano w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu w Lund (Szwecja).

6.4.1. Pobranie krwi i izolacja materiału genetycznego

Od każdego chorego pobrano 2 ml krwi obwodowej do próbówki z antykoagulantem w postaci EDTA (Vacutainer). Do momentu izolacji materiału genetycznego, krew przechowywano w temperaturze -80°C . Izolację materiału genetycznego wykonano za pomocą komercyjnego zestawu Genomic Micro AX Blood Gravity (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem producenta, otrzymując stężenie DNA nie mniejsze niż 20 ng/ μl .

6.4.2. Genotypowanie

Genotypowanie (oznaczenia) polimorfizmów SNP wykonano w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu w Lund za pomocą platformy genotypizującej *iPLEX MassARRAY* (Sequenom, San Diego, CA, USA) zgodnie z protokołem producenta. Metoda ta wykorzystuje łańcuchową reakcję polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) oraz spektrometrię mas w konfiguracji MALDI-TOF. Spektrometr mas MALDI-TOF do jonizacji cząsteczek wykorzystuje desorpcję laserową z udziałem matrycy (MALDI, ang. *matrix assisted laser desorption Ionisation*) i analizator masy typu przelotu (TOF, ang. *time of flight*).

Wykonano genotypowanie łącznie 168 polimorfizmów SNP. Polimorfizmy SNP wybrano na podstawie opublikowanych wyników badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS). Wykazały one związek z m.in. zmiennością ciśnienia tętniczego, stężeniem lipidów w surowicy, funkcją nerek, ryzykiem choroby wieńcowej serca oraz zawałem. Pełne informacje o oznaczonych polimorfizmach SNP oraz o fenotypach z nimi związanymi znajdują się w Zał. 1.

6.5. Przygotowanie danych do analiz statystycznych

6.5.1. Zmienne modelowane (zależne)

Wykorzystując technikę regresji liniowej prostej i wielorakiej modelowano zmienną opisującą sztywność dużych naczyń tj. parametr PWV.

Wykonano ocenę jakości parametrów uzyskanych w badaniu za pomocą urządzenia Sphygmocor. Z analiz usunięto wyniki badań, które nie wykazały powtarzalności, czyli takie, dla których odchylenie standardowe (SD) danego pomiaru było większe niż 10%.

6.5.2. Wyniki genotypowania

Wyniki genotypowania przekodowano z pierwotnego zapisu literowego (np. AA) na zapis cyfrowy w taki sposób, że:

„0” oznacza genotyp homozygotyczny o większej frekwencji

„1” oznacza genotyp heterozygotyczny

„2” oznacza genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji

Jest to kodowanie charakterystyczne dla addytywnego modelu dziedziczenia (Tab. 3). Sposób kodowania dla każdego polimorfizmu SNP wraz z frekwencją poszczególnych genotypów i alleli znajduje się w Zał. 2.

Następnie w zależności od testowanego modelu genetycznego, recesywnego lub dominującego, odpowiednio przekodowano wyniki genotypowania (Tab. 3).

Tab. 3. Przykładowy sposób kodowania pierwotnych wyników genotypowania w zależności od rodzaju modelu genetycznego.

Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji	Genotyp heterozygotyczny	Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji	Typ modelu
AA	AG	GG	pierwotne kodowanie
0	1	2	addytywny
0	1	1	dominujący
0	0	1	recesywny

Następnie polimorfizmy SNP podzielono na grupy w zależności od fenotypu, z jakim były pierwotnie związane. Wyróżniono 8 grup związanych z poszczególnymi fenotypami (Tab. 4).

Szczegółowa informacja dotycząca polimorfizmów z poszczególnych grup wraz z odniesieniem literaturowym znajduje się w Zał. 1.

W przypadku analiz techniką regresji liniowej z macierzy wyników genotypowania usunięto polimorfizmy SNP, których:

- braki oznaczeń genotypów były większe niż 10% (sukces genotypowania <90%) – łącznie usunięto 13 polimorfizmów SNP
- częstość rzadszego allelu (MAF, ang. *minor allele frequency*) w badanej grupie chorych była mniejsza niż 5% – łącznie usunięto 3 polimorfizmy SNP.

Szczegółowe informacje dotyczące sukcesu genotypowania oraz MAF poszczególnych polimorfizmów SNP znajdują się w Zał. 2.

Tab. 4. Wyszczególnione grupy polimorfizmów SNP.

L.p.	Grupa-SNP	Liczba SNP	Usunięte SNP	Fenotypy
1.	Lipidy-SNP	70	8	LDL, HDL, TG, TC
2.	BP-SNP	38	1	BP
3.	Serce-SNP	25	3	CAD, MI, LVMI
4.	Cukrzyca-SNP	10	0	DM, IGF, IGT, MS, IR
5.	Nerki-SNP	9	2	KR, CKD
6.	Masa ciała-SNP	6	0	Otyłość, BMI, obwód pasa
7.	Palenie-SNP	5	1	Palenie tytoniu (skłonność do uzależnienia, intensywności palenia, zaprzestania)
8.	Hormony-SNP	5	2	Rak jajnika, rak sutka, dysfunkcja śródbłonna

Liczba SNP – sumaryczna liczba analizowanych polimorfizmów SNP przed wyeliminowaniem tych, które nie spełniły kryteriów, **Usunięte SNP** – polimorfizmy SNP usunięte z danej grupy z powodu sukcesu genotypowania <90% lub frekwencji rzadszego allelu (MAF) <5%.

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – trójglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

6.6. Schemat analizy danych

Cel 1: Identyfikacja polimorfizmów SNP, które wyjaśniają największą zmienność parametru PWV

Etap 1: Budowa modelu podstawowego

Celem budowy takiego modelu było wyjaśnienie jak największej części zmienności analizowanej zmiennej na podstawie dostępnych predyktorów. Reszty modelu zostały potraktowane jako odciążone wartości analizowanej zmiennej (adjPWV) od zmiennych wpływających w sposób istotny na jej wartości.

- Zastosowano technikę regresji liniowej krokowej wstecznej oraz krosvalidację i walidację modelu.
- Wybierając początkowe zestawy zmiennych kierowano się wiedzą ekspercką dotyczącą specyfiki badanego zagadnienia.
- Zaproponowano budowę 4 modeli o różnych zestawach zmiennych niezależnych (Tab. 5).

Tab. 5. Zaproponowane modele podstawowe wyjaśniające zmienności analizowanych zmiennych.

	Wprowadzone zmienne
Model A	Wiek, Płeć, Trwanie NT, CVD, Zaburzenia, DM, Palenie, eGFR, Liczba leków, BP, Otyłość
Model B	Wiek, BP, Płeć, eGFR, Otyłość, Palenie, DM, Zaburzenia lipidowe
Model C	Wiek, BP
Model D	Wiek

NT – nadciśnienie tętnicze, CVD – choroba sercowo-naczyniowa, DM – cukrzyca typu 1 lub typu 2, eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej, BP – ciśnienie krwi.

Pod zmienną „BP” rozważano wprowadzenie wartości oznaczających średnie ciśnienie skurczowe (SBP), rozkurczowe (DBP) lub ciśnienie tętna ($PP=SBP-DBP$) (średnie z całej doby, średnie dzienne, średnie nocne) uzyskane w badaniu ABPM. Pod zmienną „Otyłość” rozważano wprowadzenie zmiennej BMI, obwodu pasa (zmienna: Pas), obwodu bioder (zmienna: Biodra) oraz stosunku obwodu pasa do obwodu bioder (WHR, ang. *waist to hip ratio*). Pod zmienną „zaburzenia lipidowe” rozważano wprowadzenie zmiennej jakościowej oznaczającej status rozpoznania dyslipidemii lub zmienną ilościową tj. stężenie cholesterolu całkowitego (TC), LDL, HDL lub trójglicerydów (TG). Wyboru zmiennych dokonano na podstawie macierzy korelacji ze zmienną zależną PWV, wybierając zmienną niezależną o najwyższym współczynniku korelacji, który wykazał istotność statystyczną.

Etap 2: Identyfikacja polimorfizmów SNP wyjaśniających w sposób istotny zmienność analizowanego parametru

- Zastosowano technikę regresji liniowej i kroskalibrację modelu.
- Jako zmienną zależną wprowadzano:
 - ✓ surową wartość zmiennej PWV – model surowy
 - ✓ zmienną „odciążoną” z wpływu zmiennych towarzyszących tj. adjPWV – model skorygowany

- Jako zmienną niezależną wprowadzano kolejno polimorfizmy SNP w modelu addytywnym, dominującym i recesywnym.
- Do dalszej analizy wybrano te polimorfizmy SNP, których współczynniki równania regresji były istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,1$, a modele charakteryzowały się dostateczną jakością dopasowania do danych (tj. $R^2_{adj} > 0,001$ oraz zbliżonymi błędami kalibracji i kroskalibracji).

Cel 2: Stworzenie punktacji ryzyka genetycznego (GRS) na podstawie polimorfizmów SNP, które niekorzystnie wpływają na wartości analizowanych zmiennych. Weryfikacja czy średnie wartości analizowanych zmiennych różnią się pomiędzy poszczególnymi grupami punktacji ryzyka genetycznego.

Etap 1: Przekodowanie wybranych polimorfizmów SNP

- Na podstawie wartości współczynnika równania regresji przekodowano wybrane polimorfizmy SNP w taki sposób, że:
 - ✓ 0-1-2 oznacza odpowiednio 0, 1 lub 2 allele ryzyka (tj. wpływające niekorzystnie na wartość analizowanej zmiennej) w modelu addytywnym
 - ✓ 0-1 oznacza odpowiednio 0 lub 1/2 genotypy ryzyka (tj. wpływające niekorzystnie na wartość analizowanej zmiennej) w modelu dominującym lub recesywnym

Etap 2: Zliczenie punktacji ryzyka genetycznego

- Dla każdego chorego zliczono punktację ryzyka GRS, sumując liczbę niekorzystnych alleli/genotypów, uzyskując nową zmienną:
 - ✓ **GRS_1** – do zliczenia punktacji ryzyka genetycznego wzięto pod uwagę jedynie te polimorfizmy SNP, których współczynniki równania regresji były istotne na poziomie $p < 0,05$.
 - ✓ **GRS_2** – do zliczenia punktacji ryzyka genetycznego wzięto pod uwagę te polimorfizmy SNP, których współczynniki równania regresji były istotne na poziomie $p < 0,1$.
 Nie zliczano punktacji ryzyka genetycznego dla przypadków, w których brakowało więcej niż 1 oznaczenia polimorfizmu SNP wchodzącego w skład GRS_1 lub GRS_2.
- Badaną populację podzielono na grupy wyznaczone przez wartości kwartyli zmiennej GRS_1 i GRS_2, uzyskując cztery grupy chorych.

Etap 3: Porównanie średnich wartości parametru PWV w grupach wyznaczonych przez kwartyle GRS_1 i GRS_2

Cel 3: Sprawdzenie czy zaproponowane punktacje ryzyka genetycznego wyjaśniają w sposób istotny większą część zmienności parametru PWV niż każdy z polimorfizmów SNP osobno.

Etap 1: Zastosowano technikę regresji liniowej i kroskalibrację modelu.

- Jako **zmienną zależną** wprowadzono:
 - ✓ surową wartość analizowanej zmiennej tj. PWV
 - ✓ zmienną „odciążoną” z wpływu zmiennych towarzyszących – adjPWV
- Jako **zmienną niezależną** wprowadzono zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS_1 oraz GRS_2 (jako zmienne ciągłe) uzyskane w modelu addytywnym, dominującym i recesywnym.

Etap 2: Porównano procent wyjaśnionej zmienności pomiędzy modelami, w których wprowadzano pojedynczo polimorfizmy SNP lub zliczoną punktację ryzyka genetycznego GRS_1 i GRS_2.

6.7. Analiza statystyczna

6.7.1. Pakiety statystyczne

Analizy statystyczne wykonano za pomocą następujących pakietów statystycznych i programów:

- STATISTICA 10 (StatSoft, USA)
- SPSS Statistics 20 (IBM, USA)
- Matlab 2010b (MathWorks, USA)

6.7.2. Zastosowane testy statystyczne

Analiza korelacji

W celu zbadania liniowego związku pomiędzy dwiema zmiennymi o charakterze ilościowym obliczano współczynnik korelacji Pearsona. Podawano wartość współczynnika R, współczynnika determinacji R^2 , poziom jego istotności oraz liczebność próby.

Test niezależności χ^2 Pearsona

Zmienne mierzone na skali nominalnej prezentowano w postaci tabel wielodzzielczych (tabel kontyngencji). Do zbadania statystycznej istotności związku między zmiennymi nominalnymi zastosowano test niezależności χ^2 Pearsona. W tabelach o dwóch wierszach i dwóch kolumnach (2x2) obliczono statystykę χ^2 Pearsona (z poprawką Yatesa w przypadku liczebności komórki <10). Gdy tabela 2x2 zawierała komórkę o oczekiwanej częstości poniżej 5 wykonano test dokładny Fishera.

Analiza wariancji

Ze względu na to, że rozkłady analizowanych zmiennych nie były zgodne z rozkładem normalnym oraz porównywane grupy były różnoliczne, zastosowano nieparametryczne techniki analizy statystycznej. Do oceny różnic między średnimi

wartościami analizowanej zmiennej w dwóch grupach zastosowano nieparametryczny test U Manna–Whitneya. Do porównania więcej niż dwóch średnich wykorzystano test Kruskala-Wallisa (nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji, ANOVA). W celu określenia, które średnie się różnią od siebie zastosowano testy po fakcie (post hoc).

Regresja liniowa

Zbudowano dwa rodzaje modeli regresji liniowej:

- Model jednoczynnikowy prosty tj. taki, do którego wprowadzono tylko jedną zmienną objaśniającą (niezależną):
 - Model surowy (ang. *unadjusted model*) – do modelu jako zmienną zależną wprowadzono surową zmienną PWV
 - Model skorygowany (ang. *adjusted model*) – do modelu jako zmienną zależną wprowadzono zmienną adjPWV
- Model wieloczynnikowy – wykorzystany do konstrukcji tzw. modelu podstawowego skorygowanego o zmienne zakłócające.

W modelu skorygowanym (ang. *adjusted model*) jako zmienną zależną wprowadzono reszty regresyjne otrzymane z danego modelu podstawowego, co umożliwiło porównanie efektów zmiennych niezależnych (polimorfizmów SNP) przy jednoczesnej eliminacji wpływu innych czynników skorelowanych z wyjściową zmienną. Algorytm polegał na wykorzystaniu metod regresji liniowej do oddzielenia wpływu zmiennych zakłócających, a następnie zastosowaniu analizy wariancji wobec zmiennych skorygowanych (tj. wobec tej części zmienności, która nie jest wyjaśniona przez zmienną towarzyszącą). W wyniku zastosowania algorytmu, suma kwadratów błędu została odciążona ze zmienności wynikającej z obecności zmiennych towarzyszących, a w konsekwencji test F zyskał większą moc do wykrywania prawdziwych efektów analizowanych czynników.

W modelach regresji liniowych nie uwzględniano interakcji pomiędzy zmiennymi niezależnymi.

Konstrukcja modelu regresji liniowej obejmowała następujące etapy:

1. Wybór próbek do zbioru uczącego i testowego – zapewniono reprezentatywność zbioru modelowego, sortując rosnąco wartość zmiennej zależnej danej macierzy docelowej i wybierając z niej równomiernie taką liczbę przypadków, aby zbiór uczący zawierał 70% macierzy wyjściowej, a zbiór testowy 30%.
2. Kalibracja modelu regresji liniowej – do kalibracji modelu uczącego zastosowano metodę najmniejszych kwadratów, uzyskując współczynniki równania regresji liniowej. Oceniano jakość dopasowania modelu do danych eksperymentalnych wyliczając współczynnik determinacji R^2 (ang. *determination coefficient*) oraz średni błąd kwadratowy kalibracji zbioru uczącego (RMSEC, ang. *root mean square error of calibration*).

3. Kalibracja krzyżowa modelu – oceniano elastyczność modelu wyliczając błąd przewidywania tj. współczynnik walidacji krzyżowej (Q^2_{CV} , ang. *cross-validation determination coefficient*) oraz średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej ($RMSE_{CV}$, ang. *root mean square error of cross validation*) stosując metodę „wyrzucić jeden obiekt” (ang. *leave-one-out crossvalidation*).
4. Walidacja modelu – oceniano jego zdolności predykcyjne dla zbioru próbek, które nie były użyte do jego konstrukcji (dla zbioru testowego). Błąd przewidywania dla próbek zbioru testowego określono za pomocą współczynnika walidacji zewnętrznej (Q^2_{EXT} , ang. *external validation coefficient*) oraz średniego błędu kwadratowego przewidywania ($RMSEP$, ang. *root mean square error of prediction*). Walidację zastosowano w celu uniknięcia nadmiernego dopasowania modelu podstawowego do danych (tzw. przeuczenia).
5. Testowanie założeń regresji liniowej – polegało na eksploracji cech analizowanego zbioru danych oraz testowanego modelu regresji. Za pomocą różnych narzędzi diagnostycznych identyfikowano problem współliniowości na podstawie wartości współczynnika inflacji VIF (ang. *variance inflation factor*) oraz współczynnika tolerancji (TOL), problem obecności obserwacji wpływowych oraz heterogeniczność wariancji.
6. Diagnozowano obecność obiektów odległych na podstawie reszt pochodzących od stabilnego modelu kalibracyjnego. W pierwszym kroku, po zbudowaniu modelu zawierającego zmienne wejściowe, z macierzy danych usuwano przypadki, dla których bezwzględne wartości standaryzowanych reszt modelu były większe od 2. Następnie ponownie budowano model, uzyskując znaczną poprawę dopasowania i jakości modelu.

W przypadku budowy tzw. modelu podstawowego zastosowano technikę regresji krokowej wstecznej, eliminując kolejno zmienne na podstawie krytycznej wartości statystyki t, aż do uzyskania zadowalającego modelu.

Wszystkie etapy konstrukcji modelu regresji liniowej wykonano za pomocą skryptów napisanych w programie MATLAB.

6.7.3. Uwagi ogólne

- Przeprowadzono kontrolę danych w celu wyeliminowania pomyłek powstałych w trakcie przygotowywania danych (tzw. „błędów grubych”) tj. wykrycie w zbiorze danych przypadków różniących się istotnie od innych (tzw. punktów odstających) – korekta wartości.
- Transformowano zmienne w celu zwiększenia liniowej zależności pomiędzy zmiennymi. W analizie podawano postać zastosowanej funkcji transformującej.
- Przy każdej analizie podano sposób obsłużenia wartości odstających.
- Jeśli nie zaznaczono inaczej braki danych usuwano parami.

- Wyniki dotyczące zmiennych ciągłych przedstawiono jako średnią wraz z odchyleniem standardowym (SD, ang. *standard deviation*).
- Wyniki analiz zmiennych jakościowych przedstawiono zarówno jako surową liczebność oraz procent przypadków o danej cesze.
- Jako znamiennej poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.
- Wyniki analiz raportowano zgodnie z zaleceniami „The GRIPS Statement” (ang. *genetic risk prediction study*) (Janssens et al., 2011) w celu zapewnienia przejrzystości otrzymanych wyników.

VII. WYNIKI

7.1. Charakterystyka populacji pod względem analizowanych zmiennych ilościowych i jakościowych

Analiza średnich wartości porównywanych parametrów w grupie kobiet i mężczyzn wykazała na istotne statystycznie różnice na poziomie istotności $p < 0,0001$. Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy średnich zmiennej określającej czas trwania NT (zmienna Trwanie NT), ilości przyjmowanych leków hipotensyjnych (zmienna Liczba leków), całodobowego, dziennego i nocnego ciśnienia tętna (odpowiednio zmienna PPdn, PPd, PPn). Nie wykazano również istotnych różnicy średniej prędkości fali tętna (zmienna PWV) (Tab. 6).

Wykazano, że mężczyźni istotnie częściej niż kobiety cierpią na zaburzenia gospodarki węglowodanowej (N=206 vs. N=143, $p=0,0206$). Różnica ta jednak nie występuje, jeśli analizie poddaje się częstość występowania konkretnych zaburzeń węglowodanowych tj. nieprawidłową glikemię na czczo (IGF), upośledzoną tolerancję glukozy (IGT) oraz cukrzycę typu 1 i typu 2.

Zaobserwowano również istotnie większą liczbę aktywnych palaczy w grupie mężczyzn (N=76 vs. N=40, $p=0,0089$) (Tab. 7).

Tab. 6. Charakterystyka badanej populacji według płci dla zmiennych ciągłych.

Zmienna	Kobiety					Mężczyźni					p
	N	Średnia	SD	Min	Max	N	Średnia	SD	Min	Max	
Wiek	390	57,34	11,92	18,00	83,00	463	52,02	14,31	18,00	84,00	<0,0001
Trwanie NT	390	14,02	9,91	0,00	47,00	463	13,32	9,52	0,00	46,00	0,3290
TC	388	205,87	44,83	110,00	391,00	463	190,44	44,10	103,00	617,00	<0,0001
HDL	388	53,56	13,64	27,00	155,00	463	45,54	12,49	24,00	124,00	<0,0001
TG	388	133,18	76,01	40,00	600,00	463	144,18	167,85	31,00	3326,00	<0,0001
LDL	384	125,65	39,32	32,20	293,60	454	117,12	35,50	35,00	243,60	<0,0001
eGFR	388	86,13	15,68	41,09	160,25	463	93,31	20,01	37,29	149,54	<0,0001
Liczba leków	388	2,81	1,45	0,00	7,00	460	3,01	1,54	0,00	7,00	0,0861
SBPdn	390	127,40	14,01	102,41	192,08	459	130,55	11,60	105,21	183,03	<0,0001
DBPdn	390	75,20	9,60	54,69	119,48	459	78,44	8,57	52,08	110,08	<0,0001
PPdn	390	52,21	11,46	29,50	95,66	459	52,11	8,93	33,36	95,87	0,1489
SBPd	390	130,53	14,30	102,98	195,26	459	133,60	11,92	108,32	186,59	<0,0001
DBPd	390	77,85	9,99	54,92	122,07	459	80,89	8,87	52,81	116,11	<0,0001
PPd	390	52,68	11,64	29,54	95,67	459	52,71	9,14	33,33	98,75	0,1282
SBPn	389	116,60	14,84	82,57	184,67	457	120,01	13,56	92,54	192,29	<0,0001
DBPn	389	66,10	9,73	38,86	110,54	457	69,91	9,80	43,73	114,14	<0,0001
PPn	389	50,50	11,56	29,36	95,60	457	50,10	9,35	29,00	85,23	0,4449
BMI	390	29,41	5,44	17,60	50,60	463	30,09	4,65	19,60	47,50	<0,0001
Pas	390	95,56	13,10	64,00	147,00	463	106,12	12,54	75,00	151,00	<0,0001
Biodra	390	106,76	10,04	87,00	154,00	463	107,35	7,61	89,00	139,00	<0,0001
WHR	390	0,89	0,07	0,73	1,11	463	0,99	0,07	0,78	1,22	<0,0001
PWV	348	10,20	2,12	5,50	21,70	422	10,21	2,36	5,60	24,80	0,7211

NT – nadciśnienie tętnicze; TC – cholesterol całkowity; HDL – cholesterol LDL; TG – trójglicerydy; LDL – cholesterol LDL; eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej; SBPdn, SBPd, SBPn – średnie ciśnienie skurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; DBPdn, DBPd, DBPn – średnie ciśnienie rozkurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; PPdn, PPd, PPn – średnie ciśnienie tętna odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; BMI – wskaźnik masy ciała; WHR – stosunek obwodu pasa do obwodu bioder; PWV – prędkość fali tętna; SD – odchylenie standardowe; Min – wartość minimalna; Max – wartość maksymalna; p – poziom istotności statystycznej.

Tab. 7. Charakterystyka badanej populacji pod względem zmiennych jakościowych w podziale na płeć.

Zmienna	Kobiety		Mężczyźni		Ogółem	
	N	%	N	%	N	p
Choroba sercowo-naczyniowa (CVD)	67	7,9	81	9,5	148	0,9036
Choroby serca	43	5,0	57	6,7	100	0,5610
CHD	38	4,5	54	6,3	92	0,3680
MI	10	1,2	19	2,2	29	0,2164
PTCA	8	0,9	17	2,0	25	0,1622
CABG	1	0,1	6	0,7	7	0,0937
HF	5	0,6	6	0,7	11	0,9858
Choroba naczyń mózgowych	31	3,6	32	3,8	63	0,5639
Udar niedokrwienny	18	2,1	21	2,5	39	0,9557
Udar krwotoczny	2	0,2	2	0,2	4	1
TIA	8	0,9	5	0,6	13	0,2486
Inne	1	0,1	4	0,5	5	0,3830
Dyslipidemia	298	34,9	354	41,5	652	0,9557
Zaburzenia węglowodanowe	143	16,8	206	24,2	349	0,0206
DM1	0	0,0	1	0,1	1	1
DM2	72	8,4	102	12,0	174	0,1976
IGF/IGT	71	8,3	103	12,1	174	0,1445
Palenie	40	4,7	76	8,9	116	0,0089
ACEI	178	21,0	226	26,7	404	0,3445
ATI	149	17,6	187	22,1	336	0,5045
CB	203	23,9	265	31,2	468	0,1228
BB	251	29,6	282	33,3	533	0,3093

CHD – choroba wieńcowa; MI – zawał serca; PTCA – angioplastyka naczyń wieńcowych; CABG – pomostowanie aortalno-wieńcowe; HF – niewydolność serca; TIA – przemijające ataki niedokrwienne; DM1/DM2 – cukrzyca typu 1/typu 2; IGF/IGT – nieprawidłowa glikemia na czczo/upośledzona tolerancja glukozy; p – poziom istotności statystycznej.

7.2. Zgodność rozkładu polimorfizmów SNP z prawem równowagi genetycznej Hardy’ego-Weinberga

Analizę rozkładu częstości genotypów poszczególnych polimorfizmów SNP wykonano stosując test χ^2 Pearsona. Szczegółowe wyniki analiz wraz z liczebnościami obserwowanymi i oczekiwanymi są przedstawione w Zał. 3. W przypadku 5 polimorfizmów SNP wystąpiły komórki tabeli o liczebnościach mniejszych niż 5, nie zastosowano jednak dokładnego testu Fishera z poprawką Freemana-Haltona ze względu na ograniczenia obliczeniowe programu matematycznego.

W grupie badanej, dla 21 spośród 168 polimorfizmów SNP, rozkłady genotypów nie były zgodne z prawem równowagi Hardy’ego-Weinberga ($p < 0,05$). Nie wykluczono jednak tych polimorfizmów z dalszych analiz. Ze względu na to, że grupa badana jest populacją chorych na nadciśnienie tętnicze pierwotne, brak zgodności rozkładu genotypów z prawem Hardy’ego-Weinberga może wskazywać na potencjalne znaczenie tych polimorfizmów jako biomarkerów zwiększonego ryzyka wystąpienia nadciśnienia tętniczego. Potwierdzenie tego wymagałoby porównania częstości genotypów tych

polimorfizmów SNP w grupie kontrolnej bez stwierdzonego NT (Bochud, 2012; Lucchinetti i Zaugg, 2008).

Porównano zatem frekwencje genotypów polimorfizmów SNP (wskaźniki struktury), które nie pozostają w równowadze Hardy'ego-Weinberga z danymi dla populacji europejskiej zgromadzonymi w ramach projektu „1000 Genomes” (<http://www.1000genomes.org/>, data dostępu: 18.04.2014). Rozpatrywano obszar krytyczny dwustronny oraz dla oszacowania wielkości efektu wyliczono 95% przedział ufności (CI ang. *confidence interval*). Dla 12 spośród 21 polimorfizmów SNP wykazano istotną różnicę między frekwencją występowania danego allelu w grupie badanej a frekwencją w populacji europejskiej (Tab. 8)

Tab. 8. Wyniki testu dla dwóch wskaźników struktury – porównanie frekwencji danego allelu w grupie badanej i populacji europejskiej (1000Genomes).

L.p.	SNP	Allel o większej frekwencji	Frekwencja		N	Frekwencja 1000Genomes	N	P	CI	
			w grupie badanej	N					- 95%	+ 95%
1.	rs1051730	C	0,66	820	0,64	379	0,4986	-0,0379	0,0779	
2.	rs11153768	C	0,53	840	0,54	379	0,7460	-0,0505	0,0705	
3.	rs11220462	C	0,84	853	0,86	379	0,3692	-0,0237	0,0637	
4.	rs11953630	C	0,65	836	0,67	379	0,4965	-0,0376	0,0776	
5.	rs13107325	T	0,93	858	0,08	379	<0,0001	0,7931	0,9069	
6.	rs1495741	G	0,75	799	0,25	379	<0,0001	0,4399	0,5601	
7.	rs1532085	A	0,66	857	0,37	379	<0,0001	0,2302	0,3498	
8.	rs17271305	A	0,62	803	0,59	379	0,3236	-0,0296	0,0896	
9.	rs1731274	G	0,54	841	0,44	379	0,0120	0,0394	0,1606	
10.	rs198358	G	0,80	860	0,20	379	<0,0001	0,5412	0,6588	
11.	rs2068888	G	0,51	819	0,51	379	1,0000	-0,0609	0,0609	
12.	rs2234693	T	0,53	829	0,60	379	0,0232	0,0096	0,1304	
13.	rs2925979	A	0,73	845	0,30	379	<0,0001	0,3706	0,4894	
14.	rs3025343	G	0,88	861	0,92	379	0,0364	0,0025	0,0775	
15.	rs3127573	T	0,91	853	0,88	379	0,1041	-0,0062	0,0662	
16.	rs4373814	C	0,52	856	0,48	379	0,1947	-0,0205	0,1005	
17.	rs4607517	G	0,88	842	0,82	379	0,0050	0,0181	0,1019	
18.	rs5756931	C	0,61	817	0,36	379	<0,0001	0,1892	0,3108	
19.	rs6040055	C	0,64	836	0,60	379	0,1815	-0,0187	0,0987	
20.	rs633185	G	0,64	835	0,28	379	<0,0001	0,2994	0,4206	
21.	rs8017377	A	0,54	827	0,46	379	0,0099	0,0192	0,1408	

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP; p – poziom istotności statystycznej; CI – 95% przedział ufności.

7.3. Analiza zmiennej PWV

7.3.1. Budowa modelu podstawowego dla zmiennej PWV

- Liczebność próby wynosiła $N = 669$ (usunięto przypadki, w których miał miejsce jakikolwiek brak danej w zmiennej branej pod uwagę w budowie modelu podstawowego).
 - Wartości ekstremalne $PWV=(24,8; 23,2; 20,3)$ zastąpiono wartością 99 percentyla tj. wartością 16,53.
 - Zmienną PWV poddano przekształceniu funkcją transformującą postaci $\log(PWV-4,5)$ uzyskując zmienną **logPWV**. Postać funkcji ustalono empirycznie, wybierając tę, która znacząco zwiększyła liniowość zależności pomiędzy zmienną PWV a zmiennymi niezależnymi.
1. Wykonano analizę korelacji pomiędzy zmienną logPWV a zmienną niosącą informację o wysokości ciśnienia krwi i otyłości (Tab. 9).

Tab. 9. Wyniki analizy korelacji pomiędzy zmienną logPWV a zmiennymi niosącymi informację o wysokości ciśnienia krwi, otyłości oraz zaburzeniach lipidowych.

Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05$		
logPWV		
Zmienna	R	R ²
SBPdn	0,3116	0,0971
DBPdn	0,0912	0,0083
PPdn	0,3197	0,1022
SBPd	0,2904	0,0843
DBPd	0,0666	0,0044
PPd	0,3144	0,0988
SBPn	0,3212	0,1032
DBPn	0,1488	0,0221
PPn	0,3045	0,0927
BMI	0,0886	0,0079
Pas	0,1187	0,0141
Biodra	0,0202	0,0004
WHR	0,1659	0,0275
TC	0,0263	0,0007
HDL	-0,0043	0,0000
TG	0,0700	0,0049
LDL	0,0900	0,0010
Dyslipidemia	-	0,0280*

* - R² uzyskany w analizie regresji prostej

R – współczynnik korelacji Pearsona; **R²** – współczynnik determinacji; **TC** – cholesterol całkowity; **HDL** – cholesterol LDL; **TG** – trójglicerydy; **LDL** – cholesterol LDL; **SBPdn, SBPd, SBPn** – średnie ciśnienie skurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; **DBPdn, DBPd, DBPn** – średnie ciśnienie rozkurczowe odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; **PPdn, PPd, PPn** – średnie ciśnienie tętna odpowiednio z całej doby, z dnia, z nocy; **BMI** – wskaźnik masy ciała; **WHR** – stosunek obwodu pasa do obwodu bioder.

Zmienna SBPn i zmienna PPdn wykazały najwyższą korelację ze zmienną logPWV ($R^2_{SBPn}=0,1032$ oraz $R^2_{PPdn}=0,1022$). Do modelu wprowadzono zmienną PPdn (pomimo

nieznacznie niższego R^2), gdyż niesie w sobie informację dotyczącą zarówno ciśnienia skurczowego, jak i rozkurczowego.

Zmienna WHR wykazała największą korelację ze zmienną logPWV ($R^2_{\text{WHR}}=0,0275$) i wprowadzono ją do modelu.

Stężenia cholesterolu całkowitego TC, cholesterolu HDL i LDL oraz trójglicerydów TG nie wykazały istotnej korelacji ze zmienną logPWV. Do modelu wprowadzono zmienną jakościową „Dyslipidemia”, która w sposób istotny wyjaśniła 2,8% zmienności logPWV.

2. Zbudowano modele podstawowe A-D o zaproponowanym początkowym zestawem zmiennych

Model A (Tab. 10) zawierający pełen zestaw zmiennych wejściowych, jest wysoce istotny statystycznie [$F(1,493)=44,24$, $p=3,86 \cdot 10^{-54}$] oraz wyjaśnia 41,28% zmienności logPWV. Jednak współczynniki równania regresji dla zmiennej Palenie oraz DM mają ujemną wartość (zależność odwrotna od spodziewanej) oraz duże błędy standardowe. Dlatego postanowiono wyeliminować te zmienne z modelu. Także z powodu dużego obciążenia współczynników równania regresji, wyeliminowano kolejno zmienną Dyslipidemia i WHR. Ostatecznie uzyskano model A*, który zawiera zmienną Wiek, Płeć, eGFR oraz PPdn. **Model A*** (Tab. 11) jest wysoce istotny statystycznie [$F(1,493)=88,95$, $p=9,72 \cdot 10^{-57}$] i wyjaśnia 41,69% zmienności logPWV. W stosunku do modelu A, nastąpiła poprawa dopasowania modelu. Średnie wartości błędów kalibracji (RMSEC), krosvalidacji (RMSECV) oraz przewidywania (RMSEP) mają zbliżone wartości, co świadczy o dobrej jakości zbudowanego modelu.

Model B (Tab. 12) i **B*** (Tab. 13) uzyskano stosując metodę krokową wsteczną (redukując zestaw zmiennych wejściowych). **Model B** zawiera następujące zmienne niezależne: Wiek, Płeć, eGFR, PPdn oraz WHR. Model jest wysoce istotny statystycznie [$F(1,492)=70,39$, $p=2,55 \cdot 10^{-55}$] i wyjaśnia 41,41% zmienności logPWV. Mimo że współczynniki równania regresji dla zmiennej Płeć i WHR nie osiągnęły zadanego poziomu istotności, pozostawiono te zmienne w modelu, gdyż ich błędy standardowe mają akceptowalną wartość. W stosunku do modelu A, nastąpiła poprawa dopasowania modelu tj. wyższa wartość współczynnika determinacji R^2 oraz niższe błędy szacunku modelu. Średnie wartości błędów kalibracji (RMSEC), krosvalidacji (RMSECV) oraz przewidywania (RMSEP) mają zbliżone wartości, co świadczy o dobrej jakości zbudowanego modelu.

Eliminując zmienną Płeć, otrzymano **Model B***, który zawiera następujące zmienne niezależne: Wiek, eGFR, PPdn oraz WHR. Model jest wysoce istotny statystycznie [$F(1,492)=87,12$, $p=8,56 \cdot 10^{-56}$] i wyjaśnia 41,23% zmienności parametru PWV. Istotność otrzymanych współczynników równania regresji oraz niskie błędy szacunku potwierdzają dobre dopasowanie modelu. Średnie wartości błędów kalibracji (RMSEC), krosvalidacji (RMSECV) oraz przewidywania (RMSEP) mają zbliżone wartości, co świadczy o dobrej jakości zbudowanego modelu.

Model C (Tab. 14) jest wysoce istotne statystycznie [$F(1,494)=137,89$, $p=2,98 \cdot 10^{-48}$] oraz wyjaśnia 35,71% zmienności logPWV. Istotność otrzymanych współczynników równania

regresji oraz niskie błędy szacunku potwierdzają dobre dopasowanie modelu. Średnie wartości błędów kalibracji (RMSEC), krosvalidacji (RMSECV) oraz przewidywania (RMSEP) mają zbliżone wartości, co świadczy o dobrej jakości zbudowanego modelu.

Model D (Tab. 15) jest wysoce istotny statystycznie [$F(1,493)=244,44$, $p=5,57 \cdot 10^{-45}$] oraz wyjaśnia 33,08% zmienności zmiennej logPWV. Istotność otrzymanych współczynników równania regresji oraz niskie błędy szacunku potwierdzają dobre dopasowanie modelu. Średnie wartości błędów kalibracji (RMSEC), krosvalidacji (RMSECV) oraz przewidywania (RMSEP) mają zbliżone wartości, co świadczy o dobrej jakości zbudowanego modelu.

Tab. 10. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model A

Zmienna	Model A										Ocena jakości modelu										
	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	N	F	P	R ²	R ² _{adj}	Q ² _{CV}	Q ² _{Ext}	RMSEC	RMSECV	RMSEP	
						-95%	+95%														
stała	0,2418	0,0820	0,0000	2,95	0,0033	0,0807	0,4028				493	44,24	3,86·10 ⁻⁵³								
Wiek	0,0061	0,0005	0,5188	11,79	2,2·10⁻²⁸	0,0051	0,0071	0,62	1,6	0,6046											
Płeć	0,0206	0,0138	0,0666	1,50	0,1344	-0,0064	0,0476	0,61	1,65	-0,0278											
Dyslipidemia	0,0054	0,0135	0,0149	0,40	0,6886	-0,0211	0,0319	0,86	1,16	0,2218											
DM	-0,0017	0,0145	-0,0043	-0,12	0,9076	-0,0301	0,0267	0,86	1,17	0,1797											
Palenie	-0,0010	0,0163	-0,0021	-0,06	0,9509	-0,0330	0,0310	0,98	1,02	-0,0308											
eGFR	-0,0008	0,0003	-0,0921	-2,27	0,0238	-0,0014	-0,0001	0,72	1,38	-0,3620											
PPdn	0,0033	0,0006	0,2070	5,73	1,8·10⁻⁸	0,0022	0,0044	0,91	1,09	0,3355											
WHR	0,0490	0,0817	0,0276	0,60	0,5486	-0,1114	0,2094	0,57	1,77	0,1875											

Tab. 11. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model A*

Zmienna	Model A*										Ocena jakości modelu										
	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	N	F	P	R ²	R ² _{adj}	Q ² _{CV}	Q ² _{Ext}	RMSEC	RMSECV	RMSEP	
						-95%	+95%														
stała	0,2811	0,0538	0,0000	5,22	2,61·10 ⁻⁷	0,1754	0,3869				493	88,95	9,72·10 ⁻⁵⁷								
Wiek	0,0062	0,0005	0,5300	12,97	2,8·10⁻³³	0,0053	0,0071	0,7	1,4	0,6046											
Płeć	0,0259	0,0110	0,0837	2,35	0,0190	0,0043	0,0476	0,9	1,1	-0,0278											
eGFR	-0,001	0,0003	-0,0929	-2,32	0,0209	-0,0014	-0,0001	0,7	1,4	-0,3620											
PPdn	0,0033	0,0006	0,2084	5,88	7,44·10⁻⁹	0,0022	0,0044	0,9	1,1	0,3355											

DM – cukrzyca typu 1 i typu 2; eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej; PPdn – średnie ciśnienie tętna z całej doby; WHR – stosunek obwodu bioder do obwodu pasa.

B – niestandardowy współczynnik równania regresji, SE – błąd standardowy współczynnika równania regresji, BETA – standaryzowany współczynnik regresji, t – wartość statystyki t, p – poziom istotności, 95% CI – 95% przedział ufności dla B, TOL – współczynnik tolerancji, VIF – współczynnik inflacji, KOR – korelacja rzędu zerowego, N – liczba obserwacji, R² – współczynnik determinacji, R²_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji, Q²_{CV} – współczynnik walidacji krzyżowej, Q²_{Ext} – współczynnik walidacji zewnętrznej, RMSEC – średni kwadratowy błąd kalibracji, RMSECV – średni kwadratowy błąd walidacji, RMSEP – średni kwadratowy błąd przewidywania.

Tab. 12. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model B

Zmienna	Model B										Ocena jakości modelu									
	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	N	F	P	R ²	R ² _{adj}	Q ² _{CV}	Q ² _{EXT}	RMSEC	RMSECV	RMSEP
						-95%	+95%													
stała	0,2092	0,0797	0	2,62	0,009	0,0525	0,3658				492	70,39	2,55·10 ⁻⁵⁵							
Wiek	0,0058	0,0005	0,4924	11,56	1,7·10⁻²⁷	0,0048	0,0068	0,7	1,5	0,5892										
Płec	0,0216	0,0138	0,0702	1,563	0,119	-0,006	0,0487	0,6	1,7	0,0033	0,4200	0,4141	0,4078							
eGFR	-0,0009	0,0003	-0,109	-2,73	0,007	-0,002	-0,0003	0,8	1,3	-0,3600										
PPdn	0,0034	0,0006	0,2169	6,06	2,8·10⁻⁹	0,0023	0,0045	0,9	1,1	0,3536										
WHR	0,1132	0,0801	0,0631	1,41	0,158	-0,044	0,2706	0,6	1,7	0,2198										

Tab. 13. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model B*

Zmienna	Model B*										Ocena jakości modelu									
	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	N	F	P	R ²	R ² _{adj}	Q ² _{CV}	Q ² _{EXT}	RMSEC	RMSECV	RMSEP
						-95%	+95%													
stała	0,1562	0,0723		2,16	0,0311	0,0142	0,2982				492	87,12	8,56·10 ⁻⁵⁶							
Wiek	0,0056	0,0005	0,4732	11,59	1,33·10⁻²⁷	0,0046	0,0065	0,72	1,39	0,5892										
eGFR	-0,0009	0,0003	-0,1044	-2,62	0,0090	-0,0015	-0,0002	0,76	1,32	-0,3600	0,4171	0,4123	0,4071							
PPdn	0,0034	0,0006	0,2194	6,12	1,87·10⁻⁹	0,0023	0,0045	0,93	1,07	0,3536										
WHR	0,1889	0,0639	0,1053	2,96	0,0033	0,0634	0,3144	0,94	1,06	0,2198										

DM – cukrzyca typu 1 i typu 2; eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej; PPdn – średnie ciśnienie tętna z całej doby; WHR – stosunek obwodu bioder do obwodu pasa.

B – niestandardowy współczynnik równania regresji, SE – błąd standardowy współczynnika równania regresji, BETA – standardowy współczynnik regresji, t – wartość statystyki t, p – poziom istotności, 95% CI – 95% przedział ufności dla B, TOL – współczynnik tolerancji, VIF – współczynnik inflacji, KOR – korelacja rzędu zerowego, N – liczba zbioru uczącego, F – wartość statystyki F, R² – współczynnik determinacji, R²_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji, Q²_{CV} – współczynnik walidacji krzyżowej, Q²_{EXT} – współczynnik walidacji zewnętrznej, RMSEC – średni kwadratowy błąd kalibracji, RMSECV – średni kwadratowy błąd kalibracji, RMSEP – średni kwadratowy błąd przewidywania.

Tab. 14. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model C

Zmienna	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	Ocena jakości modelu			
						-95%	+95%				N	F	P	
stała	0,2292	0,0325		7,05	$6,1 \cdot 10^{-12}$	0,1653	0,2931				494	137,89	$2,98 \cdot 10^{-48}$	
Wiek	0,0054	0,0004	0,4679	12,41	$5,7 \cdot 10^{-31}$	0,0046	0,0063	0,92	1,09	0,5435	R^2	R^2_{adj}	Q^2_{CV}	Q^2_{Ext}
PPdn	0,0040	0,0006	0,2646	7,02	$7,3 \cdot 10^{-12}$	0,0028	0,0051	0,92	1,09	0,3983	0,3597	0,3571	0,3541	0,3859
												RMSEC	RMSECV	RMSEP
												0,1245	0,1251	0,1239

Tab. 15. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model D

Zmienna	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		TOL	VIF	KOR	Ocena jakości modelu			
						-95%	+95%				N	F	P	
stała	0,3587	0,0242		14,70	$3,1 \cdot 10^{-41}$	0,3110	0,4063				493	244,24	$5,57 \cdot 10^{-45}$	
Wiek	0,0069	0,0004	0,5764	15,63	$5,6 \cdot 10^{-45}$	0,0060	0,0077	1	1	0,5764	R^2	R^2_{adj}	Q^2_{CV}	Q^2_{Ext}
											0,3322	0,3308	0,3292	0,3164
												RMSEC	RMSECV	RMSEP
												0,1264	0,1268	0,1310

DM – cukrzyca typu 1 i typu 2; **eGFR** – wskaźnik filtracji kłębuszkowej; **PPdn** – średnie ciśnienie tętna z całej doby; **WHR** – stosunek obwodu bioder do obwodu pasa.

B – niestandardowy współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standaryzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B, **TOL** – współczynnik tolerancji, **VIF** – współczynnik inflacji, **KOR** – korelacja rzędu zerowego, **N** – liczba zbioru uczącego, **F** – wartość statystyki F, R^2 – współczynnik determinacji, R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji, Q^2_{CV} – współczynnik walidacji krzyżowej, Q^2_{Ext} – współczynnik walidacji zewnętrznej, **RMSEC** – średni kwadratowy błąd kalibracji, **RMSECV** – średni kwadratowy błąd kalibracji **RMSEP** – średni kwadratowy błąd przewidywania.

Porównano wartości parametrów opisujących jakość dopasowania i przewidywania każdego zbudowanego modelu podstawowego (Tab. 16). Stwierdzono że Modele C i D wyjaśniają największą część zmienności parametru PWV (odpowiednio 33,08% i 35,71%) i charakteryzują się dobrą jakością dopasowania oraz przewidywania, ale nie odzwierciedlają w pełni złożoności zjawiska sztywności naczyń.

Modele A*, B i B* wyjaśniają ponad 40% zmienności parametru PWV oraz wykazują zbliżone wartości parametrów opisujących jakość dopasowania i przewidywania modelu.

Tab. 16. Porównanie parametrów zbudowanych modeli dla zmiennej zależnej PWV.

Zmienne w modelu	Model A*	Model B	Model B*
	Wiek [#] , Płeć [#] , eGFR [#] , PPdn [#]	Wiek [#] , Płeć, eGFR [#] , PPdn [#] , WHR	Wiek [#] , eGFR [#] , PPdn [#] , WHR [#]
R^2_{adj}	0,4169	0,4141	0,4123
Q^2_{CV}	0,4117	0,4078	0,4071
Q^2_{EXT}	0,3374	0,3522	0,3429
RMSEC	0,1183	0,1176	0,1178
RMSECV	0,1191	0,1185	0,1185
RMSEP	0,1293	0,1277	0,1286

[#] współczynnik równania regresji dla danej zmiennej jest istotny statystycznie ($p < 0,05$)

eGFR – wskaźnik filtracji kłębuszkowej, PPdn – średnie ciśnienie tętna z całej doby; WHR – stosunek obwodu bioder do obwodu pasa, R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji, Q^2_{CV} – współczynnik walidacji krzyżowej, Q^2_{EXT} – współczynnik walidacji zewnętrznej, RMSEC – średni kwadratowy błąd kalibracji RMSECV – średni kwadratowy błąd kalibracji RMSEP – średni kwadratowy błąd przewidywania.

Zadecydowano o wyborze modelu, który będzie kompromisem pomiędzy modelowaniem statystycznym i biologicznym. Taki model może uwzględnić zmienne, których współczynniki równania regresji nie osiągnęły zadanego poziomu istotności statystycznej (za to pozwala na kontrolowanie ich wpływu na zmienną zależną), eliminując jednocześnie te zmienne, które w znaczący sposób pogarszają jakość opracowanego modelu (p. Dyskusja 8.2).

Wybrano **model B**, który przyjmuje postać:

$$\text{LogPWV} = 0,2092 + 0,0058 \cdot \text{Wiek} + 0,0216 \cdot \text{Płeć} - 0,0009 \cdot \text{eGFR} + 0,0034 \cdot \text{PPd} + 0,1132 \cdot \text{WHR} \pm 0,1176$$

Na podstawie równania regresji modelu B oszacowano prognozowane wartości logPWV, a następnie zgromadzono reszty modelu jako odciążone wartości logPWV, otrzymując zmienną **adjPWV (model skorygowany)**.

7.3.2. Identyfikacja polimorfizmów SNP wyjaśniających w sposób istotny zmienność parametru PWV

Kolejno dla surowej zmiennej PWV oraz odciążonej zmiennej adjPWV wykonano analizę regresji liniowej, gdzie do modelu wprowadzono tylko jedną zmienną niezależną – kolejno wyniki genotypowania każdego analizowanego SNP w modelu addytywnym, dominującym i recesywnym.

Z każdej analizy wybrano te polimorfizmy SNP, których współczynniki równania regresji były istotne na poziomie co najmniej $p < 0,1$, a model charakteryzował się dobrym dopasowaniem do danych.

W modelu surowym (zmienna **PWV**) wyselekcjonowano łącznie:

- **15 polimorfizmów SNP** (w tym 10 na poziomie $p < 0,05$) w **modelu addytywnym** (Tab. 17) – polimorfizmy te mają związek ze stężeniem lipidów we krwi (9 SNP), z wysokością ciśnienia krwi (3 SNP), stężeniem kreatyniny w osoczu (1 SNP), ryzykiem zawału serca (1 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP).
- **16 polimorfizmów SNP** (w tym 10 na poziomie $p < 0,05$) w **modelu dominującym** (Tab. 19) – polimorfizmy te mają związek ze stężeniem lipidów we krwi (9 SNP), z wysokością ciśnienia krwi (3 SNP), ryzykiem zawału serca i/lub choroby niedokrwiennej serca (2 SNP), upośledzonym poziomem glukozy na czczo (1 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP).
- **16 polimorfizmów SNP** (w tym 4 na poziomie $p < 0,05$) w **modelu recesywnym** (Tab. 21) – polimorfizmy te mają związek ze stężeniem lipidów we krwi (6 SNP), z wysokością ciśnienia krwi (5 SNP), stężeniem kreatyniny w osoczu (2), ryzykiem zawału serca i/lub choroby niedokrwiennej serca (2 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP).

W modelu skorygowanym (zmienna **adjPWV**) wyselekcjonowano łącznie:

- **17 polimorfizmów SNP** (w tym 6 na poziomie istotności $p < 0,05$) w **modelu addytywnym** (Tab. 18) – polimorfizmy te mają związek z ryzykiem zawału serca i/lub choroby niedokrwiennej serca (5 SNP) oraz cukrzycy typu 2 (1 SNP), wysokością ciśnienia krwi (5 SNP), stężeniem lipidów we krwi (5 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP).
- **14 polimorfizmów SNP** (w tym 8 na poziomie istotności $p < 0,05$) w **modelu dominującym** (Tab. 20) – polimorfizmy te mają związek z ryzykiem zawału serca i/lub choroby niedokrwiennej serca (3 SNP) oraz cukrzycy typu 2 (1 SNP), wysokością ciśnienia krwi (4 SNP), stężeniem lipidów we krwi (5 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP).
- **14 polimorfizmów SNP** (w tym 5 na poziomie istotności $p < 0,05$) w **modelu recesywnym** (Tab. 22) – polimorfizmy te mają związek z wysokością ciśnienia krwi (6 SNP), stężeniem lipidów we krwi (4 SNP), ryzykiem zawału serca i/lub

choroby niedokrwiennej serca (2 SNP), cukrzycą typu 2 (1 SNP) oraz zespołem metabolicznym (1 SNP).

Tab. 17. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu addytywnym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
						Model addytywny – zmienna PWV								
rs1327235	-0,2831	0,1083	-0,0959	-2,61	0,0091	-0,4957	-0,0705	739	0,0078	A	0,47	G	0,53	BP
rs2954029	0,2735	0,1071	0,0924	2,55	0,0108	0,0633	0,4837	759	0,0072	A	0,50	T	0,50	TG
rs2131925	-0,2853	0,1154	-0,0897	-2,47	0,0136	-0,5118	-0,0589	756	0,0067	T	0,31	G	0,69	TG
rs3025343	-0,3689	0,1582	-0,0843	-2,33	0,0200	-0,6794	-0,0584	761	0,0058	G	0,88	A	0,12	Palenie tytoniu
rs17145738	-0,3816	0,1741	-0,0794	-2,19	0,0286	-0,7233	-0,0399	759	0,0050	C	0,89	T	0,11	TG
rs633185	0,2119	0,0971	0,0800	2,18	0,0294	0,0213	0,4024	741	0,0051	C	0,36	G	0,64	BP
rs3136441	-0,3234	0,1515	-0,0776	-2,14	0,0331	-0,6208	-0,0261	755	0,0047	T	0,85	C	0,15	HDL
rs17319721	-0,2333	0,1126	-0,0758	-2,07	0,0385	-0,4543	-0,0123	745	0,0044	G	0,41	A	0,59	KR
rs2259816	0,2280	0,1101	0,0750	2,07	0,0387	0,0119	0,4441	761	0,0043	A	0,36	C	0,64	MI/CAD
rs12328675	-0,3083	0,1570	-0,0715	-1,96	0,0499	-0,6164	-0,0001	753	0,0038	T	0,14	C	0,86	HDL
rs16942887	-0,2826	0,1520	-0,0681	-1,86	0,0634	-0,5811	0,0158	743	0,0033	G	0,86	A	0,14	HDL
rs2293889	0,1986	0,1110	0,0651	1,79	0,0740	-0,0193	0,4165	755	0,0029	T	0,39	G	0,61	HDL
rs3184504	-0,1858	0,1087	-0,0625	-1,71	0,0879	-0,3992	0,0277	746	0,0026	T	0,49	C	0,51	BP
rs1689800	-0,1913	0,1124	-0,0619	-1,70	0,0891	-0,4118	0,0293	755	0,0025	T	0,34	C	0,66	HDL
rs7241918	0,2478	0,1499	0,0617	1,65	0,0988	-0,0466	0,5421	717	0,0024	G	0,17	T	0,83	HDL

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – trójglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardyzowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standardyzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Tab. 18. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWW oraz polimorfizmów SNP w modelu addytywnym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
rs6725887	-0,0292	0,0106	-0,1012	-2,76	0,0060	-0,0500	-0,0084	737	0,0089	T	0,12	C	0,88	MI/CAD
rs3025343	-0,0269	0,0102	-0,0957	-2,65	0,0082	-0,0469	-0,0070	761	0,0079	G	0,88	A	0,12	Palenie tytoniu
rs7593730	-0,0244	0,0098	-0,0910	-2,47	0,0136	-0,0437	-0,0050	735	0,0069	C	0,86	T	0,14	DM2
rs7134594	-0,0145	0,0069	-0,0762	-2,08	0,0376	-0,0281	-0,0008	745	0,0045	T	0,43	C	0,57	HDL
rs3136441	-0,0201	0,0097	-0,0751	-2,07	0,0390	-0,0392	-0,0010	755	0,0043	T	0,85	C	0,15	HDL
rs17145738	-0,0231	0,0112	-0,0748	-2,06	0,0393	-0,0451	-0,0011	759	0,0043	C	0,89	T	0,11	TG
rs1530440	0,0192	0,0102	0,0710	1,89	0,0597	-0,0008	0,0393	705	0,0036	T	0,15	C	0,85	BP
rs3184504	-0,0131	0,0070	-0,0686	-1,88	0,0611	-0,0268	0,0006	746	0,0034	T	0,49	C	0,51	BP
rs13139571	0,0149	0,0080	0,0676	1,86	0,0631	-0,0008	0,0306	757	0,0032	A	0,24	C	0,76	BP
rs12190287	0,0136	0,0074	0,0674	1,84	0,0662	-0,0009	0,0282	744	0,0032	G	0,67	C	0,33	CAD
rs7255436	0,0125	0,0069	0,0663	1,82	0,0688	-0,0010	0,0260	755	0,0031	C	0,53	A	0,47	HDL
rs17609940	-0,0165	0,0093	-0,0646	-1,78	0,0755	-0,0346	0,0017	758	0,0029	G	0,17	C	0,83	CAD
rs11206510	0,0163	0,0092	0,0648	1,77	0,0772	-0,0018	0,0344	745	0,0029	C	0,18	T	0,82	MI/CAD
rs1057293	0,0184	0,0105	0,0635	1,75	0,0811	-0,0023	0,0390	756	0,0027	T	0,12	C	0,88	BP
rs633185	0,0107	0,0062	0,0631	1,72	0,0860	-0,0015	0,0230	741	0,0026	C	0,36	G	0,64	BP
rs4765127	0,0136	0,0080	0,0638	1,70	0,0891	-0,0021	0,0293	712	0,0027	T	0,31	G	0,69	HDL
rs1746048	-0,0175	0,0103	-0,0613	-1,69	0,0915	-0,0378	0,0028	758	0,0024	C	0,13	T	0,87	MI/CAD

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – triglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standardyzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Tab. 19. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu dominującym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
rs2259816	0,3815	0,1540	0,0895	2,48	0,0135	0,0791	0,6838	761	0,0067	CA+AA	0,45+0,14	CC	0,42	MI/CAD
rs1122608	-0,3702	0,1594	-0,0857	-2,32	0,0205	-0,6830	-0,0573	732	0,0060	GG	0,61	GT+TT	0,34+0,05	MI/CAD
rs2954029	0,4021	0,1747	0,0834	2,30	0,0216	0,0592	0,7449	759	0,0056	AT+AA	0,50+0,25	TT	0,25	TG
rs2131925	-0,3411	0,1526	-0,0811	-2,23	0,0257	-0,6407	-0,0415	756	0,0053	TT	0,48	GT+GG	0,42+0,10	TG
rs2652834	0,3443	0,1566	0,0797	2,20	0,0282	0,0369	0,6517	758	0,0050	TC+TT	0,33+0,05	CC	0,62	HDL
rs3136441	-0,3530	0,1695	-0,0757	-2,08	0,0376	-0,6858	-0,0203	755	0,0044	TT	0,71	TC+CC	0,26+0,02	HDL
rs17145738	-0,3852	0,1860	-0,0751	-2,07	0,0387	-0,7503	-0,0202	759	0,0043	CC	0,78	TC+TT	0,20+0,01	TG
rs3025343	-0,3760	0,1841	-0,0739	-2,04	0,0414	-0,7374	-0,0146	761	0,0042	GG	0,78	GA+AA	0,19+0,02	Palenie tytoniu
rs633185	0,3151	0,1546	0,0748	2,04	0,0418	0,0117	0,6186	741	0,0042	GC+CC	0,29+0,22	GG	0,50	BP
rs1327235	-0,3455	0,1714	-0,0740	-2,02	0,0442	-0,6819	-0,0090	739	0,0041	AA	0,29	GA+GG	0,48+0,22	BP
rs12328675	-0,3214	0,1764	-0,0664	-1,82	0,0688	-0,6677	0,0248	753	0,0031	TT	0,75	CT+CC	0,23+0,02	HDL
rs174546	-0,2775	0,1531	-0,0659	-1,81	0,0703	-0,5780	0,0230	756	0,0030	CC	0,49	TC+TT	0,41+0,10	TG
rs2288774	0,2935	0,1638	0,0652	1,79	0,0735	-0,0280	0,6150	754	0,0029	TC+CC	0,48+0,19	TT	0,33	BP
rs1367117	0,2655	0,1562	0,0627	1,70	0,0896	-0,0411	0,5721	735	0,0026	AG+AA	0,43+0,11	GG	0,46	LDL
rs11220462	-0,2793	0,1678	-0,0606	-1,66	0,0964	-0,6087	0,0501	754	0,0023	CC	0,71	TC+TT	0,28+0,01	LDL
rs7034200	0,2905	0,1760	0,0619	1,65	0,0994	-0,0551	0,6361	711	0,0024	CA+CC	0,48+0,24	AA	0,27	IGF

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – triglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standaryzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Tab. 20. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWW oraz polimorfizmów SNP w modelu dominującym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
rs6725887	-0,0361	0,0117	-0,1131	-3,09	0,0021	-0,0591	-0,0131	737	0,0114	TT	0,77	CT+CC	0,21+0,02	MI/CAD
rs3025343	-0,0314	0,0118	-0,0959	-2,66	0,0081	-0,0546	-0,0082	761	0,0079	GG	0,78	GA+AA	0,19+0,02	Palenie tytoniu
rs7593730	-0,0263	0,0112	-0,0866	-2,35	0,0189	-0,0482	-0,0044	735	0,0061	CC	0,73	CT+TT	0,24+0,02	DM2
rs17145738	-0,0260	0,0120	-0,0787	-2,17	0,0302	-0,0494	-0,0025	759	0,0049	CC	0,78	CT+TT	0,20+0,01	TG
rs2954029	0,0242	0,0113	0,0777	2,14	0,0323	0,0020	0,0463	759	0,0047	AT+AA	0,50+0,25	TT	0,25	TG
rs1173771	0,0217	0,0104	0,0757	2,08	0,0374	0,0013	0,0421	756	0,0044	CT+TT	0,51+0,15	CC	0,34	BP
rs13139571	0,0198	0,0100	0,0721	1,99	0,0474	0,0002	0,0394	757	0,0039	CA+AA	0,35+0,06	CC	0,58	BP
rs12190287	0,0197	0,0100	0,0722	1,97	0,0489	0,0001	0,0393	744	0,0039	GC+GG	0,44+0,11	CC	0,45	CAD
rs3136441	-0,0200	0,0109	-0,0668	-1,84	0,0664	-0,0414	0,0014	755	0,0031	TT	0,71	TC+CC	0,26+0,02	HDL
rs7134594	-0,0186	0,0105	-0,0650	-1,77	0,0763	-0,0392	0,0020	745	0,0029	TT	0,33	TC+CC	0,48+0,19	HDL
rs1057293	0,0203	0,0118	0,0626	1,72	0,0854	-0,0028	0,0433	756	0,0026	CT+TT	0,21+0,02	CC	0,77	BP
rs2288774	0,0178	0,0105	0,0614	1,69	0,0920	-0,0029	0,0385	754	0,0024	TC+CC	0,48+0,19	TT	0,33	BP
rs579459	-0,0164	0,0099	-0,0597	-1,65	0,0998	-0,0359	0,0031	761	0,0023	TT	0,58	TC+CC	0,37+0,06	CAD
rs1367117	0,0164	0,0100	0,0607	1,65	0,0999	-0,0031	0,0360	735	0,0023	AG+AA	0,43+0,11	GG	0,46	LDL

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – trójglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standardyzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Tab. 21. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu recesywnym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
rs6511720	3,2969	1,2117	0,099	2,72	0,0067	0,9182	5,6757	750	0,0085	TT	0,004	GT+GG	0,83+0,17	LDL
rs1327235	-0,4215	0,1851	-0,0836	-2,28	0,023	-0,7849	-0,0582	739	0,0056	AA+GA	0,29+0,48	GG	0,22	BP
rs17367504	1,3668	0,6373	0,0778	2,14	0,0323	0,1156	2,618	758	0,0047	GG	0,01	GA+AA	0,80+0,19	BP
rs13082711	0,7018	0,3298	0,0772	2,13	0,0336	0,0544	1,3492	758	0,0046	CC	0,06	CT+TT	0,60+0,35	BP
rs13038305	-0,6622	0,341	-0,0705	-1,94	0,0525	-1,3317	0,0072	757	0,0037	CC+CT	0,58+0,37	TT	0,05	KR
rs2954029	0,3278	0,1758	0,0676	1,86	0,0626	-0,0173	0,6729	759	0,0033	AA	0,25	AT+TT	0,25+0,50	TG
rs737337	1,7575	0,9451	0,0682	1,86	0,0633	-0,0978	3,6129	742	0,0033	CC	0,01	CT+TT	0,84+0,15	HDL
rs17249754	-1,0915	0,5875	-0,0674	-1,86	0,0636	-2,2448	0,0617	758	0,0032	GG+AG	0,78+0,20	AA	0,02	BP
rs9818870	-1,0256	0,5659	-0,0658	-1,81	0,0703	-2,1365	0,0853	757	0,0030	CC+CT	0,73+0,25	TT	0,02	MI/CAD
rs3025343	-0,9068	0,5006	-0,0656	-1,81	0,0705	-1,8895	0,0759	761	0,0030	GG+GA	0,78+0,19	AA	0,02	Palenie tytoniu
rs17319721	-0,3775	0,2096	-0,0659	-1,8	0,0722	-0,789	0,0341	745	0,0030	GG+GA	0,34+0,50	AA	0,16	KR
rs633185	0,327	0,1879	0,0639	1,74	0,0823	-0,0419	0,696	741	0,0027	CC	0,22	CG+GG	0,50+0,29	BP
rs2131925	-0,4353	0,2539	-0,0623	-1,71	0,0869	-0,9338	0,0632	756	0,0026	TT+GT	0,48+0,42	GG	0,10	TG
rs17609940	-0,785	0,461	-0,0618	-1,7	0,0891	-1,69	0,1201	758	0,0025	GG+CG	0,69+0,29	CC	0,03	CAD
rs1689800	-0,3893	0,2319	-0,0611	-1,68	0,0937	-0,8446	0,066	755	0,0024	TT+CT	0,44+0,44	TT	0,12	HDL
rs16942887	-0,8086	0,4872	-0,0609	-1,66	0,0974	-1,765	0,1478	743	0,0024	GG+GA	0,74+0,24	AA	0,03	HDL

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – triglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMI** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standardyzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Tab. 22. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWV oraz polimorfizmów SNP w modelu recesywnym.

SNP	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	RISK	RISK freq.	PROT	PROT freq.	Fenotyp
						-95%	+95%							
rs17367504	0,1171	0,0429	0,0988	2,73	0,0065	0,0329	0,2014	758	0,0084	GG	0,01	GA+AA	0,80+0,19	BP
rs17609940	-0,0806	0,0298	-0,0979	-2,7	0,0070	-0,1391	-0,0221	758	0,0083	GG+CG	0,69+0,29	CC	0,03	CAD
rs805303	-0,0317	0,0148	-0,0789	-2,14	0,0329	-0,0609	-0,0026	731	0,0049	GG+AG	0,40+0,47	AA	0,13	BP
rs2234693	0,0252	0,0124	0,0753	2,04	0,0416	0,001	0,0495	732	0,0043	CC	0,21	TC+TT	0,26+0,53	MS
rs633185	0,0239	0,0121	0,0726	1,98	0,0481	0,0002	0,0477	741	0,0039	CC	0,22	GC+GG	0,50+0,29	BP
rs4148008	-0,0476	0,0248	-0,0731	-1,92	0,0556	-0,0962	0,0011	686	0,0039	GG+CG	0,61+0,35	CC	0,04	HDL
rs198358	0,0404	0,0217	0,0674	1,86	0,0634	-0,0023	0,083	760	0,0032	GG	0,06	GA+AA	0,65+0,29	BP
rs1042034	-0,0482	0,0264	-0,0677	-1,83	0,0681	-0,0999	0,0036	727	0,0032	AA+AG	0,65+0,31	GG	0,04	TG
rs3184504	-0,021	0,0116	-0,0665	-1,82	0,0696	-0,0437	0,0017	746	0,0031	TT+CT	0,26+0,50	CC	0,24	BP
rs9818870	-0,0629	0,0353	-0,0647	-1,78	0,0751	-0,1323	0,0064	757	0,0029	CC+TC	0,73+0,25	TT	0,02	MI/CAD
rs17249754	-0,0661	0,0379	-0,0633	-1,74	0,0814	-0,1405	0,0083	758	0,0027	GG+AG	0,78+0,20	AA	0,02	BP
rs7241918	0,0576	0,0342	0,063	1,69	0,0920	-0,0094	0,1247	717	0,0026	GG	0,02	GT+TT	0,68+0,30	HDL
rs7578326	0,0227	0,0135	0,0611	1,69	0,0921	-0,0037	0,0491	761	0,0024	GG	0,16	GA+AA	0,37+0,47	DM2
rs10195252	-0,0227	0,0136	-0,0617	-1,67	0,0961	-0,0494	0,004	728	0,0024	TT+CT	0,37+0,47	CC	0,16	TG

LDL – cholesterol LDL, **HDL** – cholesterol HDL, **TG** – trójglicerydy, **TC** – cholesterol całkowity, **BP** – ciśnienie krwi, **CAD** – choroba niedokrwienna serca, **MI** – zawał serca, **LVMi** – wskaźnik masy lewej komory serca, **DM** – cukrzyca typu 1/typu 2, **IGF** – nieprawidłowa glikemia na czczo, **IGT** – upośledzona tolerancja glukozy, **MS** – zespół metaboliczny, **IR** – insulinooporność, **KR** – kreatynina w surowicy, **CKD** – przewlekła choroba nerek, **BMI** – wskaźnik masy ciała.

SNP – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP, **B** – niestandardowany współczynnik równania regresji, **SE** – błąd standardowy współczynnika równania regresji, **BETA** – standardyzowany współczynnik regresji, **t** – wartość statystyki t, **p** – poziom istotności, **95% CI** – 95% przedział ufności dla B; **N** – liczebność zbioru, **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji, **RISK/PROT** – allel bądź genotyp mający niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **RISK freq/PROT freq** – frekwencja allelu/genotypu mającego niekorzystny/korzystny wpływ na wartość zmiennej zależnej, **Fenotyp** – fenotyp, z którym pierwotnie związany jest dany polimorfizm SNP.

Część polimorfizmów SNP wyjaśniła w sposób istotny zmienność PWV w modelu surowym, jak i skorygowanym (odpowiednio zmienna PWV i adjPWV) niezależnie od zastosowanego modelu genetycznego. Odpowiednio dla PWV oraz adjPWV, co najmniej 5 oraz 3 polimorfizmy SNP wyjaśniły istotnie zmienność w co najmniej dwóch modelach genetycznych. Największą część współwystępujących polimorfizmów SNP wykazał model addytywny i dominujący (Tab. 23).

Tab. 23. Porównanie współwystępowania danych polimorfizmów SNP w różnych modelach genetycznych.

SNP	Model addytywny	Model dominujący	Model recesywny
Model surowy (zmienna PWV)			
rs12328675	✓	✓	
rs1327235	✓	✓	✓
rs1689800	✓		✓
rs16942887	✓		✓
rs17145738	✓	✓	
rs17319721	✓		✓
rs2131925	✓	✓	✓
rs2259816	✓	✓	
rs2954029	✓	✓	✓
rs3025343	✓	✓	✓
rs3136441	✓	✓	
rs633185	✓	✓	✓
Model skorygowany (zmienna adjPWV)			
rs1057293	✓	✓	
rs12190287	✓	✓	
rs13139571	✓	✓	
rs17145738	✓	✓	
rs17609940	✓		✓
rs3025343	✓	✓	
rs3136441	✓	✓	
rs3184504	✓		✓
rs633185	✓		✓
rs6725887	✓	✓	
rs7134594	✓	✓	
rs7593730	✓	✓	

Również niezależnie od postaci modelu tj. surowego czy skorygowanego w danym modelu genetycznym współwystępowały te same polimorfizmy SNP. Dla zmiennej PWV oraz adjPWV w modelu addytywnym, dominującym i recesywnym współwystępowało odpowiednio 6, 6 i 5 polimorfizmów SNP (Tab. 24).

Tab. 24. Porównanie współwystępowania polimorfizmów SNP w danym modelu genetycznym.

SNP	Model surowy (PWV)	Model skorygowany (adjPWV)
Model addytywny		
rs17145738	✓	✓
rs12328675	✓	
rs1327235	✓	
rs1689800	✓	
rs17145738	✓	✓
rs2131925	✓	
rs2259816	✓	
rs2954029	✓	
rs3025343	✓	✓
rs3136441	✓	✓
rs3184504	✓	✓
rs633185	✓	✓
rs7241918	✓	
Model dominujący		
rs11220462	✓	
rs1122608	✓	
rs1327235	✓	
rs1367117	✓	✓
rs17145738	✓	✓
rs174546	✓	
rs2131925	✓	
rs2259816	✓	
rs2288774	✓	✓
rs2652834	✓	
rs2954029	✓	✓
rs3025343	✓	✓
rs3136441	✓	✓
rs633185	✓	
Model recesywny		
rs13038305	✓	
rs13082711	✓	
rs1327235	✓	
rs16942887	✓	
rs17249754	✓	✓
rs17367504	✓	✓
rs17609940	✓	✓
rs2131925	✓	
rs2954029	✓	
rs633185	✓	✓
rs6511720	✓	
rs737337	✓	
rs9818870	✓	✓

7.3.3. Stworzenie zliczonej punktacji ryzyka genetycznego (GRS). Analiza średnich wartości parametru PWV w różnych grupach GRS.

Po odpowiednim przekodowaniu wybranych polimorfizmów SNP, zliczeniu alleli ryzyka (model addytywny), genotypów ryzyka (model dominujący i recesywny) oraz utworzeniu zmiennych GRS_1 i GRS_2 w każdym modelu genetycznym, porównano średnie wartości zmiennej PWV (model surowy) i adjPWV (model skorygowany) w grupach wyznaczonych przez kwartyle GRS_1 i GRS_2.

Niezależnie od modelu genetycznego zaobserwowano wzrost średniej wartości zmiennej PWV i adjPWV wraz z przynależnością do kolejnych grup zliczonej punktacji ryzyka genetycznego. Średnie wartości analizowanych parametrów wraz z podaną liczebnością danej grupy znajdują się w Tab. 25, Tab. 26 oraz Tab. 27.

Tab. 25. Tabela licznosci wraz z średnią i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model addytywny.

Zmienna	GRS_1				GRS_2			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Allele ryzyka	≤12	(12,13]	(13,14]	>14	≤16	(16,18]	(18,20]	>20
średnia	9,6604	10,0144	10,5063	10,9434	9,4149	9,9992	10,5882	11,0574
PWV N	313	127	153	166	194	223	210	119
SD	1,8083	2,1597	2,1565	2,2729	1,7543	1,9478	2,1749	2,3525
Allele ryzyka	≤9	(9,10]	(10,11]	>11	≤17	(17,18]	(19,20]	>20
średnia	0,1749	0,2092	0,2107	0,2589	0,1661	0,1898	0,2155	0,2552
adjPWV N	316	205	163	71	252	123	204	146
SD	0,1460	0,1272	0,1290	0,1112	0,1396	0,1386	0,1236	0,1240

Tab. 26. Tabela licznosci wraz z średnią i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model dominujący.

Zmienna	GRS_1				GRS_2			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Genotypy ryzyka	≤5	(5,6]	(6,7]	>7	≤8	(8,10]	(10,11]	>11
średnia	9,6084	10,2594	10,4564	11,2694	9,5126	9,9649	10,6870	11,1621
PWV N	297	201	162	97	206	278	126	132
SD	1,7217	2,1280	2,2315	2,4071	1,6115	2,0719	2,2712	2,3105
Genotypy ryzyka	≤4	(4,5]	(5,6]	>6	≤7	(7,8]	(8,10]	>10
średnia	0,1632	0,1908	0,2186	0,2335	0,1509	0,1987	0,2244	0,2595
adjPWV N	196	197	214	158	227	154	268	90
SD	0,1529	0,1359	0,1227	0,1260	0,1533	0,1254	0,1176	0,1186

Tab. 27. Tabela licznosci wraz z srednia i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model recesywny.

Zmienna	GRS_1				GRS_2			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Genotypy ryzyka	≤ 1			> 1	≤ 9	(9,10]		> 10
średnia	10,1060	–	–	11,4297	9,6736	10,2934	–	10,8665
PWV N	727	–	–	37	284	303	–	161
SD	2,0704	–	–	2,3863	1,9544	2,0454	–	2,2716
Genotypy ryzyka	≤ 2		(2,3]	> 3	≤ 6		(6,7]	> 7
średnia	0,1890	–	0,2236	0,2354	0,1878	–	0,2117	0,2308
adjPWV N	522	–	205	36	444	–	213	106
SD	0,1414	–	0,1261	0,1187	0,1396	–	0,1401	0,1146

Za pomocą testu Kruskala-Wallisa sprawdzono czy średnie wartości PWV w modelu surowym i skorygowanym (odpowiednio zmienna PWV i adjPWV) w wyznaczonych grupach GRS_1 i GRS_2 różnią się istotnie od siebie. Wyniki testu wskazały na istotne różnice pomiędzy średnimi wartościami analizowanych zmiennych we wszystkich modelach genetycznych zarówno w modelu surowym i skorygowanym. Podsumowanie wyników testu Kruskala-Wallisa znajduje się w Tab. 28.

Tab. 28. Wyniki testu Kruskala-Wallisa dla PWV w modelu surowym i skorygowanym. Grupy wyznaczone przez kwartyle zmiennej GRS_1 oraz GRS_2.

Model addytywny								
	GRS_1				GRS_2			
	N	H	df	p	N	H	df	p
PWV	759	40,66	3	$7,70 \cdot 10^{-9}$	746	52,39	3	$2,48 \cdot 10^{-11}$
adjPWV	755	21,53	3	$8,19 \cdot 10^{-5}$	725	40,57	3	$8,06 \cdot 10^{-9}$
Model dominujący								
	GRS_1				GRS_2			
	N	H	df	p	N	H	df	p
PWV	757	41,73	3	$4,58 \cdot 10^{-9}$	742	53,46	3	$1,46 \cdot 10^{-11}$
adjPWV	765	24,44	3	$2,02 \cdot 10^{-5}$	739	48,96	3	$1,33 \cdot 10^{-10}$
Model recesywny								
	GRS_1				GRS_2			
	N	H	df	p	N	H	df	p
PWV	764	11,45	1	0,0007	748	33,53	2	$5,24 \cdot 10^{-8}$
adjPWV	763	8,81	2	0,0122	763	9,79	2	0,0075

N – liczebność analizowanego zbioru danych, H – wartość statystyki Kruskala-Wallisa, df – stopnie swobody, p – poziom istotności statystycznej, GRS – zliczona punktacja ryzyka genetycznego.

Wielokrotne porównanie średnich (testy typu *post hoc*) wskazały na grupy, których średnie istotnie różnią się od siebie. Dla każdego porównania wykonano wykresy typu ramka-wąsy.

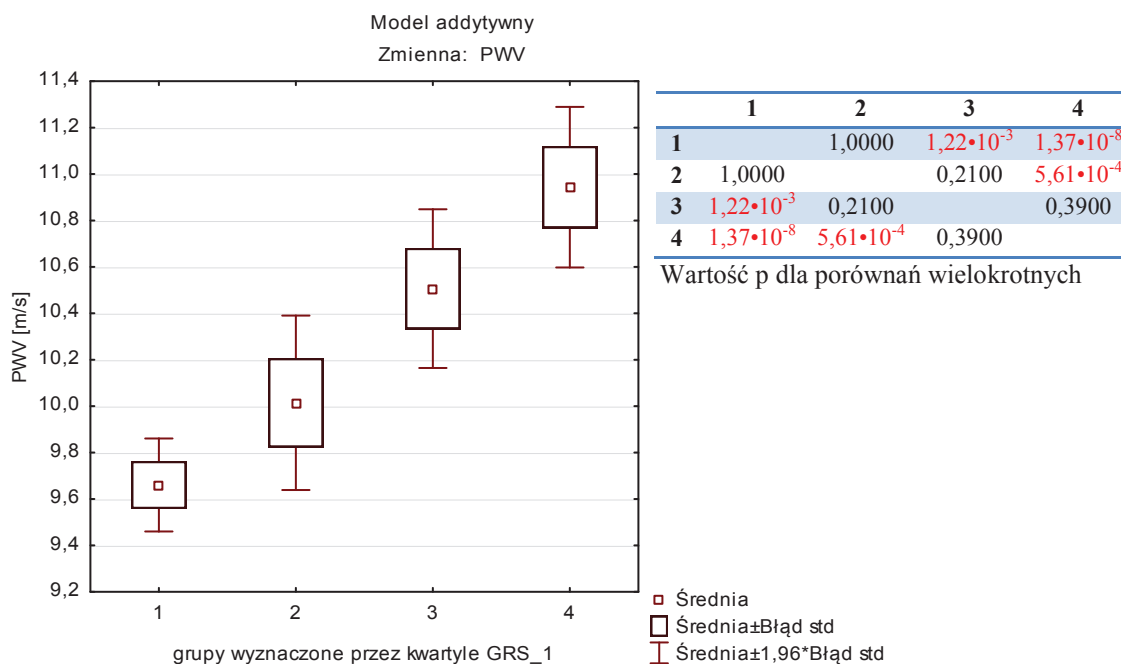
Modele addytywne

Model surowy – zmienna PWV

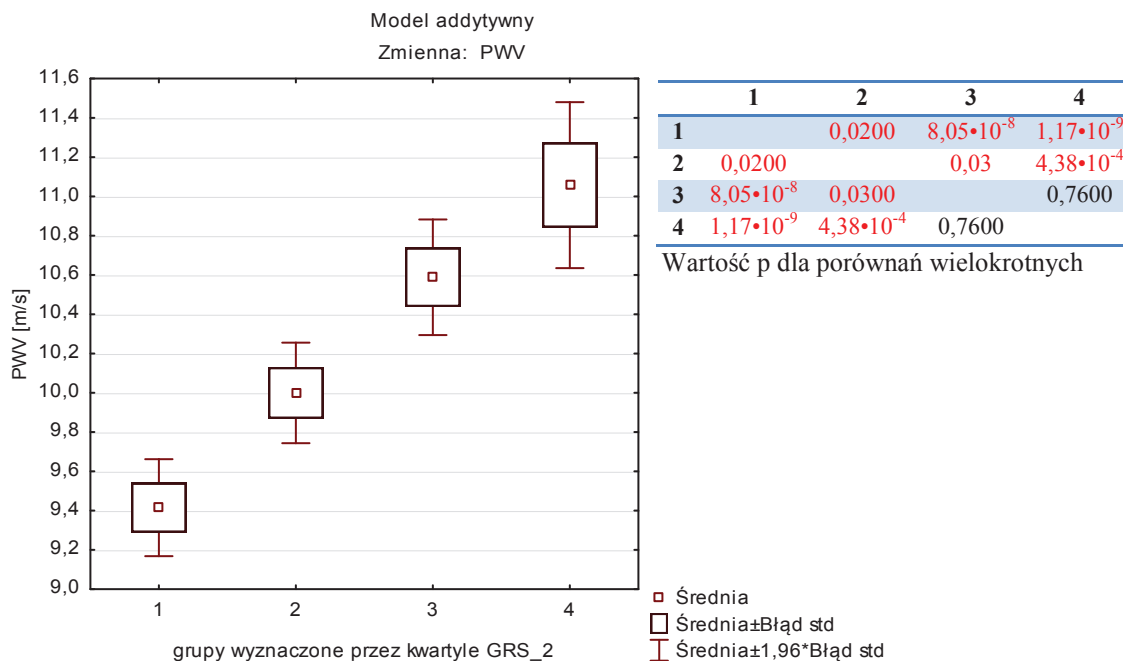
Niezależnie czy porównywano średnie wartości PWV w grupach wyznaczonych przez kwartyle GRS_1 czy GRS_2, obserwowano wzrost średniej wartości PWV wraz z przynależnością do grupy ze zwiększającą się liczbą zliczonych alleli ryzyka. Na uwagę zasługuje fakt, że zależność swoim kształtem przypomina liniową.

W przypadku GRS_1, średnia wartość PWV w grupie 1 (co najwyżej 12 alleli ryzyka) różni się w sposób istotny od średniej w grupie 3 (14 alleli ryzyka) oraz grupie 4 (powyżej 14 alleli ryzyka). Średnie wartości zmiennej PWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 9,66 m/s, 10,51 m/s oraz 10,94 m/s. Poziom istotności różnicy średniej wartości PWV pomiędzy 1 i 4 grupą osiągnął wartość $1,37 \cdot 10^{-8}$ (Rys. 2).

W przypadku GRS_2, średnia wartość PWV w grupie 1 (co najwyżej 16 alleli ryzyka) różni się istotnie od średniej w grupie 2 (od 17 do 18 alleli ryzyka), grupie 3 (od 19 do 20 alleli ryzyka) oraz grupie 4 (powyżej 20 alleli ryzyka). Średnie w tych grupach wynoszą odpowiednio 9,41 m/s, 10 m/s, 10,59 m/s oraz 11,06 m/s. Nieistotna statystycznie jest jedynie różnica pomiędzy średnimi w grupie 3 i grupie 4. Poziom istotności różnicy średniej wartości PWV pomiędzy grupą 1 i grupą 4 osiągnął wartość $1,17 \cdot 10^{-9}$ (Rys. 3).



Rys. 2. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model addytywny.

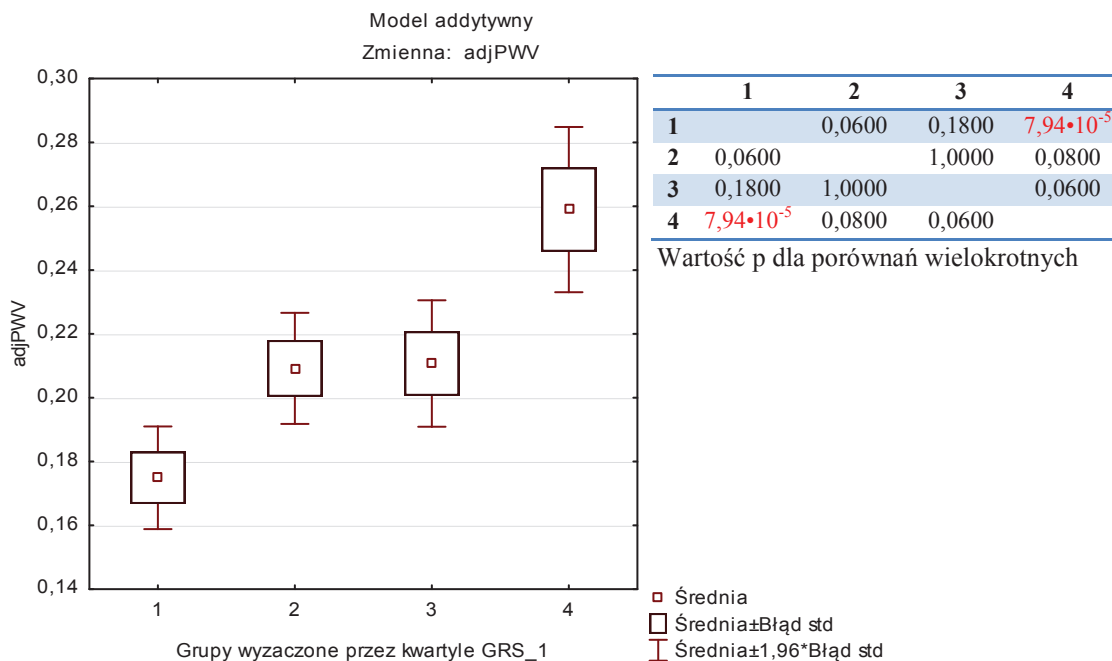


Rys. 3. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model addytywny.

Model skorygowany – zmienna adjPWV

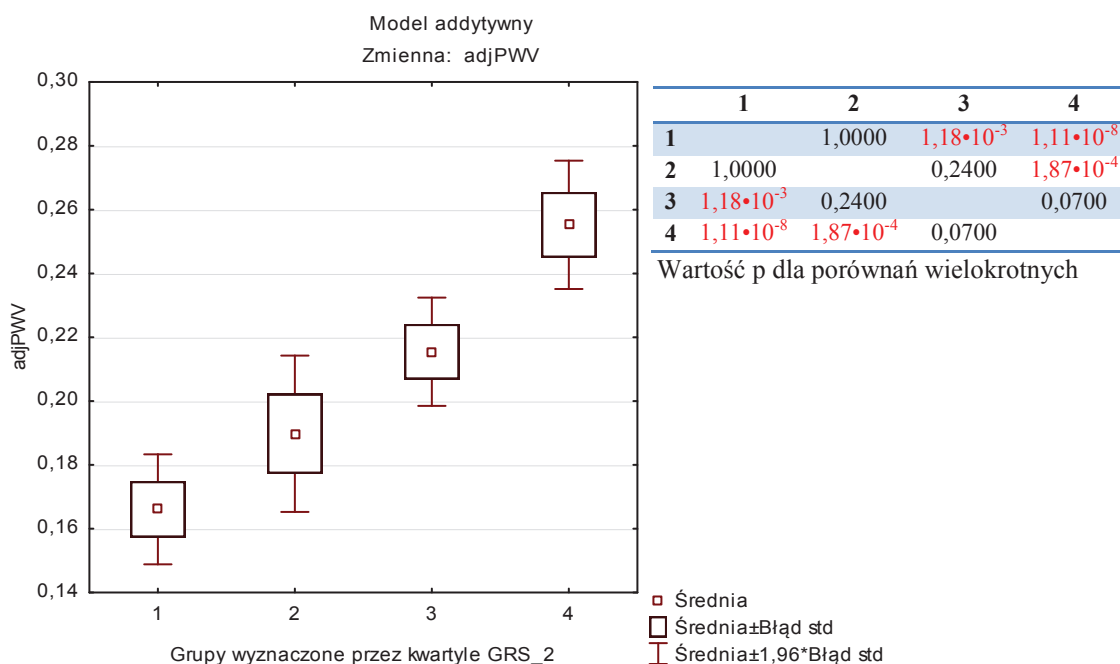
W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_1, średnia wartość zmiennej adjPWV w grupie 1 (co najwyżej 9 alleli ryzyka) różni się w sposób istotny od średniej w grupie 4 (więcej niż 11 alleli ryzyka) (0,17 vs. 0,25, $p=7,94 \cdot 10^{-5}$).

Średnia wartość grupy 2 (10 alleli ryzyka) i grupy 3 (11 alleli ryzyka) jest wyższa niż średnia grupy 1, jednak różnica ta nie osiągnęła zadanego poziomu istotności. Podobnie średnia wartość grupy 4 jest wyraźnie wyższa od średniej grupy 2 i grupy 3, ale różnica jest nieistotna statystycznie (Rys. 4).



Rys. 4. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model addytywny.

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_2, liniowa zależność pomiędzy średnią wartością parametru adjPWV a przynależnością do grupy ryzyka genetycznego jest bardziej zaznaczona. Średnia w grupie 1 (co najwyżej 17 alleli ryzyka) różni się istotnie od średniej w grupie 3 (20 alleli ryzyka) oraz grupie 4 (co najmniej 21 alleli ryzyka). Średnie w tych grupach wynoszą odpowiednio 0,17, 0,21 oraz 0,25. Istotność różnicy średniej w grupie 1 i grupie 4 osiągnęła poziom $p=1,11 \cdot 10^{-8}$ (Rys. 5).



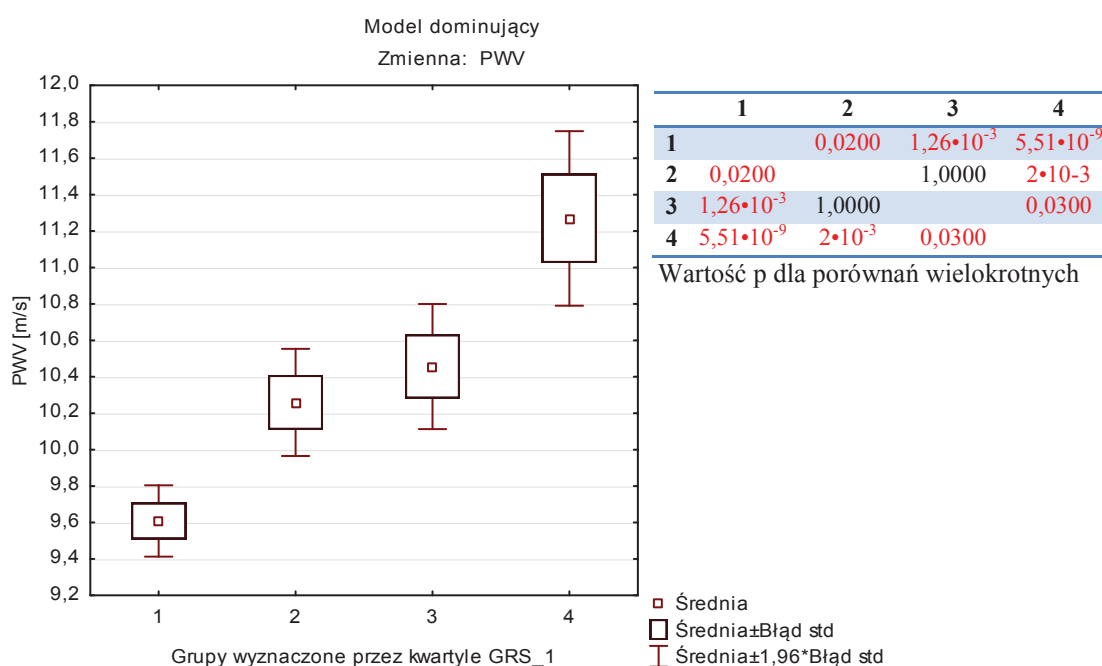
Rys. 5. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model addytywny.

Modele dominujące

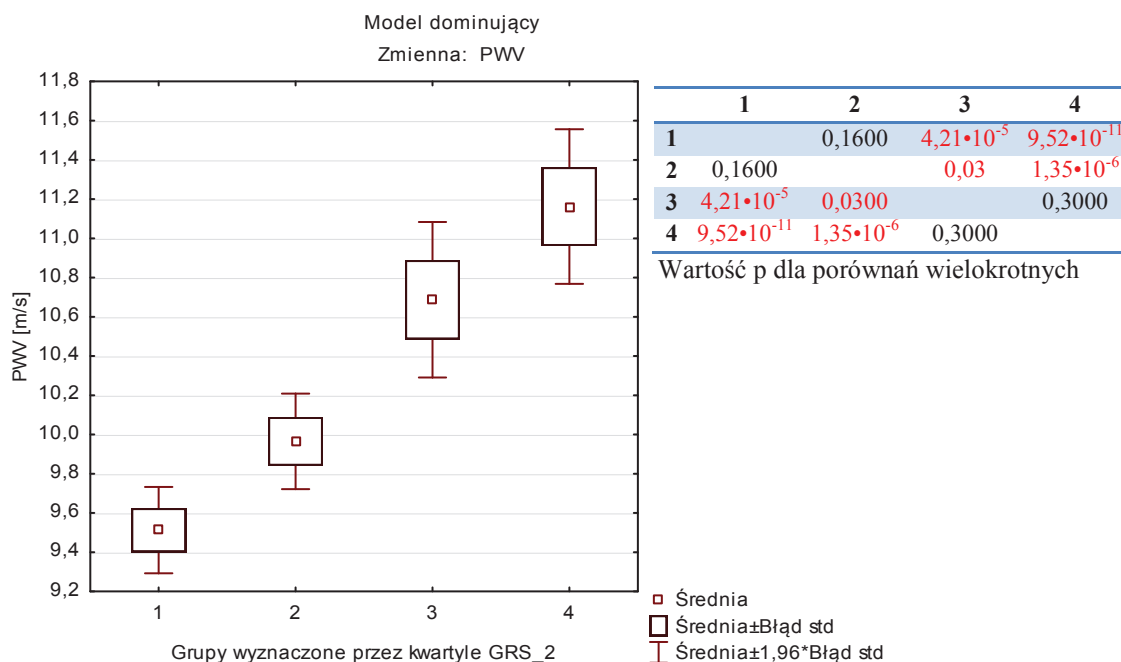
Model surowy – zmienna PWV

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_1, średnia wartość zmiennej PWV w grupie 1 (co najwyżej 5 genotypów ryzyka) różni się w sposób istotny od średniej w grupie 2 (6 genotypów ryzyka), w grupie 3 (7 genotypów ryzyka) oraz grupie 4 (nie mniej niż 7 genotypów ryzyka). Średnie wartości PWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 9,61 m/s, 10,26 m/s, 10,46 m/s oraz 11,27 m/s. Brak różnic w średnich obserwowano jedynie pomiędzy grupą 2 i 3, które mają zbliżone wartości zmiennej PWV. Poziom istotności różnicy średniej wartości PWV pomiędzy grupą 1 a grupą 4 osiągnął wartość $5,51 \cdot 10^{-9}$ (Rys. 6).

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_2, liniowa zależność pomiędzy średnią wartością parametru PWV a przynależnością do grupy ryzyka genetycznego jest bardziej zaznaczona. Średnia w grupie 1 (co najwyżej 8 genotypów ryzyka) różni się w sposób istotny od średniej w grupie 3 (11 genotypów ryzyka) oraz grupie 4 (co najmniej 12 genotypów ryzyka). Średnie wartości PWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 9,51 m/s, 10,69 m/s oraz 11,16 m/s. Średnia w grupie 2 (od 9 do 10 genotypów ryzyka) jest większa od średniej w grupie 1 (9,96 m/s vs. 9,51 m/s), ale nie wykazano istotności ich różnic. Poziom istotności różnicy średniej wartości PWV pomiędzy grupą 1 i grupą 4 osiągnął wartość $9,52 \cdot 10^{-11}$ (Rys. 7).



Rys. 6. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model dominujący.

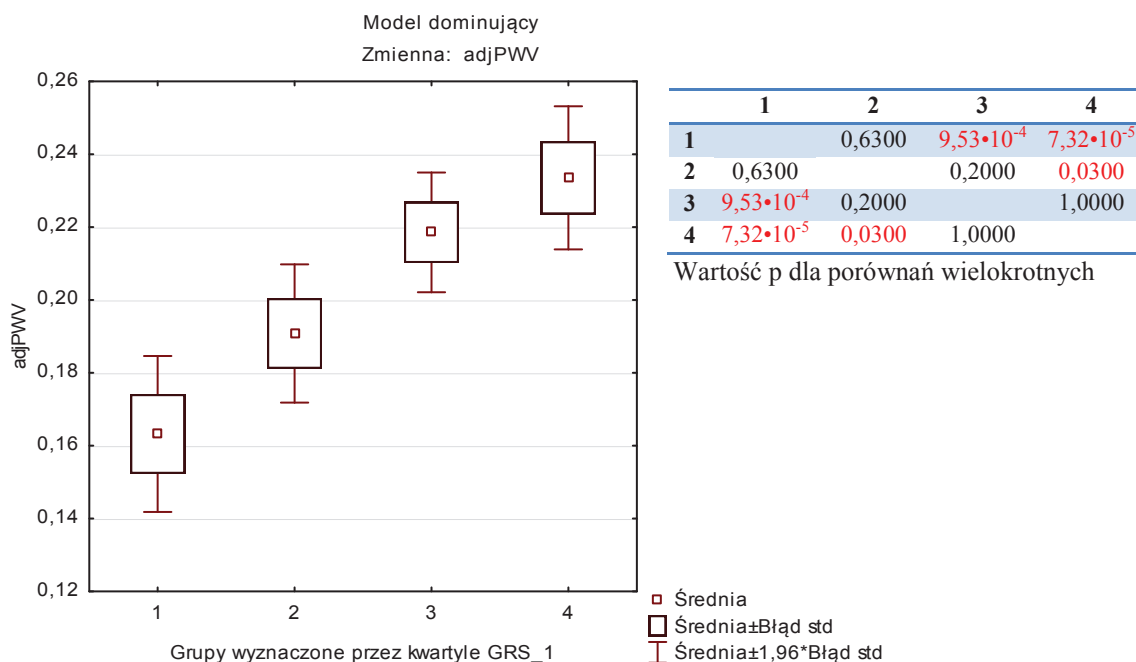


Rys. 7. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model dominujący.

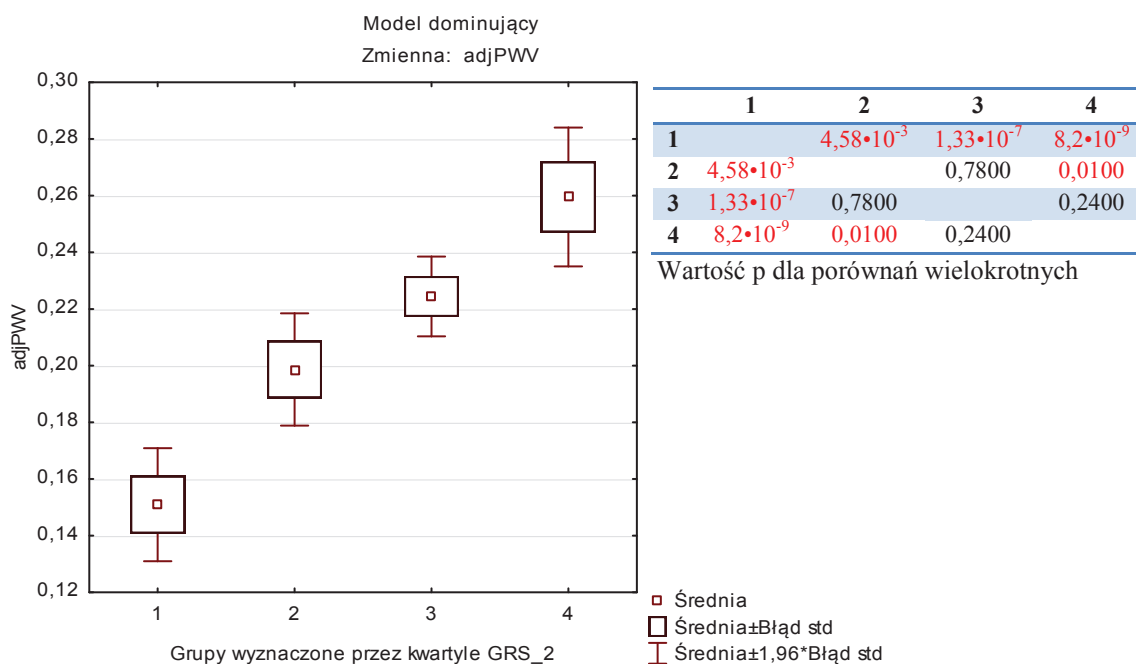
Model skorygowany – zmienna adjPWV

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_1, obserwowano wzrost średniej wartości zmiennej adjPWV wraz z przynależnością do grupy o co raz większej liczbie genotypów ryzyka. Średnia wartość w grupie 1 (co najwyżej 4 genotypy ryzyka) różni się istotnie od średniej w grupie 3 (6 genotypów ryzyka) i grupie 4 (co najmniej 7 genotypów ryzyka). Średnie wartości zmiennej adjPWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 0,16, 0,22 i 0,23. Poziom istotności różnicy średniej wartości adjPWV pomiędzy grupą 1 i grupą 4 osiągnął wartość $7,32 \cdot 10^{-5}$ (Rys. 8).

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_2, również obserwowano wzrost średniej wartości adjPWV wraz z przynależnością do grupy o coraz większej liczbie genotypów ryzyka, a zależność ta przypomina liniową. Średnia wartość w grupie 1 (co najwyżej 7 genotypów ryzyka) różni się istotnie od średniej w grupie 2 (8 genotypów ryzyka), w grupie 3 (od 9 do 10 genotypów ryzyka) i grupie 4 (co najmniej 11 genotypów ryzyka). Średnie wartości adjPWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 0,15, 0,20, 0,22 i 0,26. Poziom istotności różnicy średniej wartości adjPWV pomiędzy grupą 1 i grupą 4 osiągnął wartość $8,2 \cdot 10^{-9}$ (Rys. 9).



Rys. 8. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model dominujący.



Rys. 9. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model dominujący.

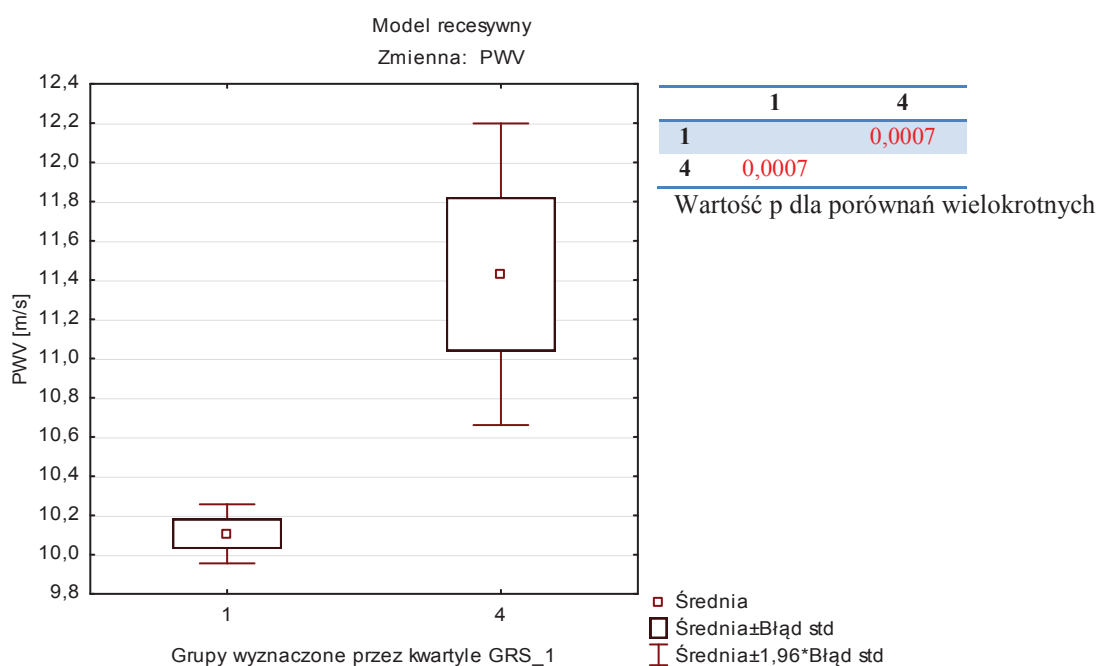
Model recesywny

Model surowy – zmienna PWV

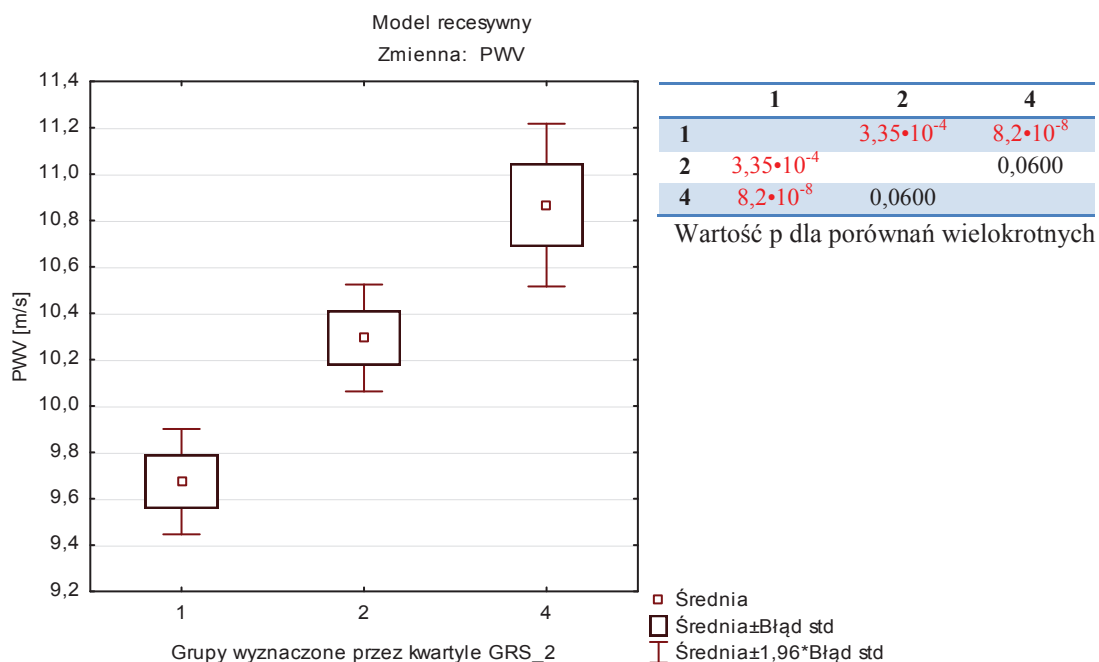
Kwartyle zmiennej GRS_1 wyznaczyły tylko dwie grupy. Do grupy 1 należą przypadki o co najwyżej 1 genotypie ryzyka, do grupy drugiej przypadki o co najmniej

2 genotypach ryzyka. Średnie w porównywanych grupach (10,11 m/s vs. 11,43 m/s) różnią się na poziomie istotności $p=0,0007$.

W przypadku trzech grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_2, obserwowano wzrost średniej wartości zmiennej PWV wraz z przynależnością do grupy o coraz większej liczbie genotypów ryzyka, a zależność ta przypomina liniową. Średnia wartość w grupie 1 (co najwyżej 9 genotypów ryzyka) różni się istotnie od średniej w grupie 2 (10 genotypów ryzyka) oraz grupie 4 (co najmniej 11 genotypów ryzyka). Średnie wartości zmiennej PWV w tych grupach wynoszą odpowiednio 9,67 m/s, 10,29 m/s oraz 10,87 m/s. Poziom istotności różnicy średniej wartości PWV pomiędzy grupą 1 a grupą 4 osiągnął wartość $p=8,2 \cdot 10^{-8}$ (Rys. 11).



Rys. 10. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model recesywny.

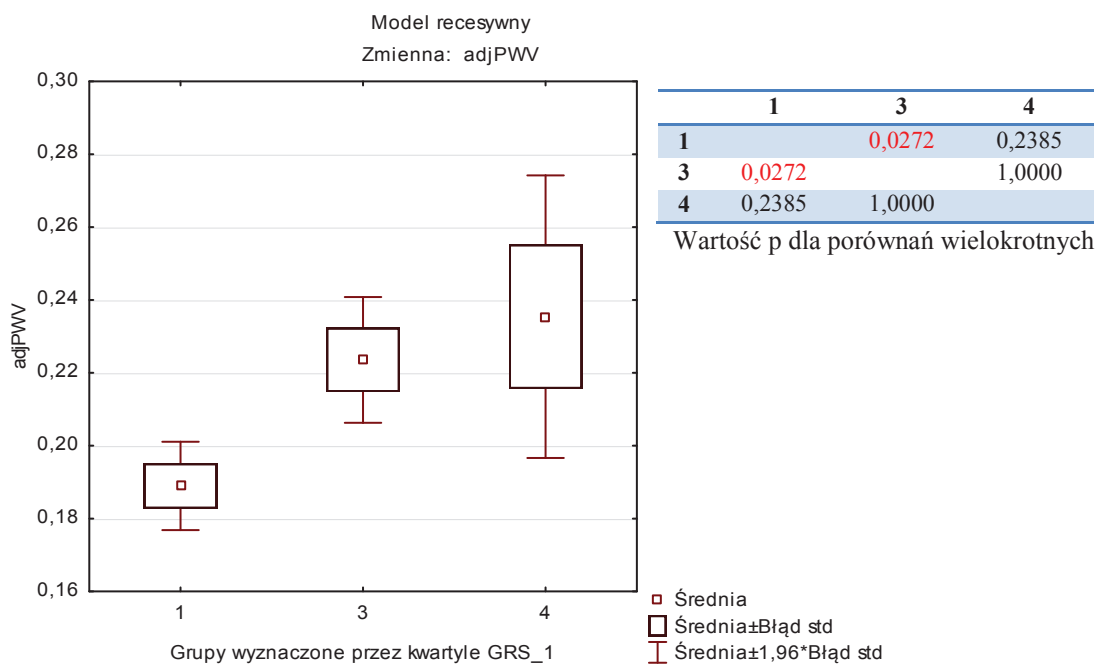


Rys. 11. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model recesywny.

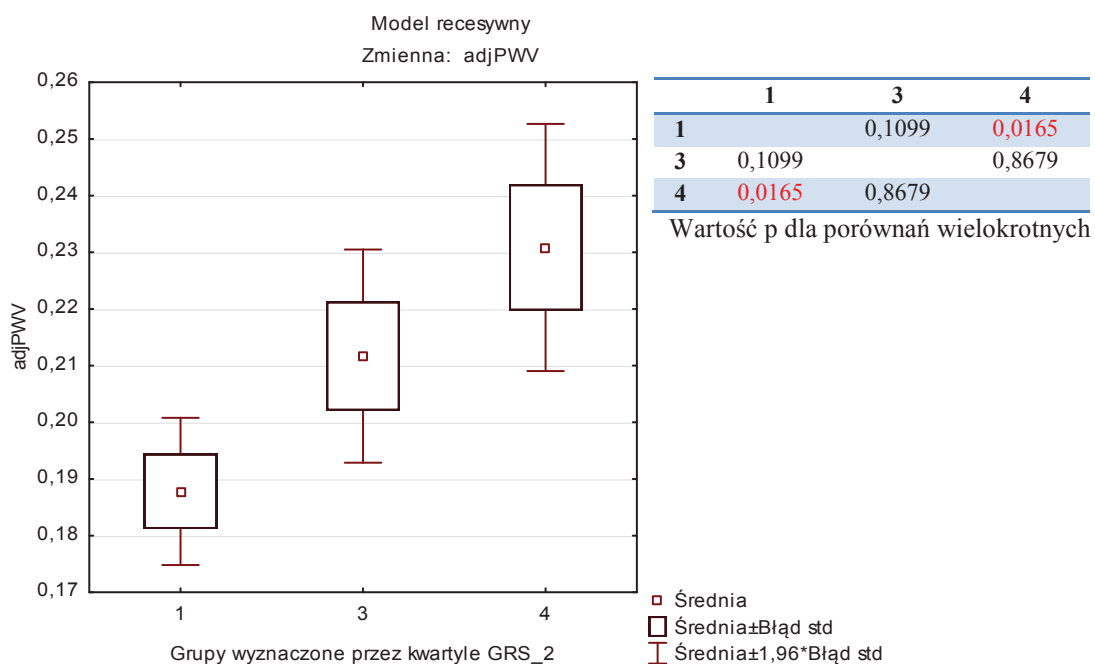
Model skorygowany – zmienna adjPWV

Kwartyle zmiennej GRS_1 wyznaczyły trzy grupy. Do grupy 1, 3 i 4 należą przypadki, odpowiednio, o co najwyżej 2 genotypach ryzyka, o 3 genotypach ryzyka i o co najmniej 4 genotypach ryzyka. Jedynie pomiędzy grupą 1 a grupą 2 zaobserwowano istotną różnicę średnich wartości zmiennej adjPWV (0,19 vs. 0,22, $p=0,0272$) (Rys. 12).

W przypadku grup wyznaczonych przez kwartyle GRS_2, obserwowano wzrost średniej wartości zmiennej adjPWV w grupie 1, grupie 3 oraz grupie 4. Wykazano istotną różnicę w średniej wartości pomiędzy grupą 1 (co najwyżej 6 genotypów ryzyka) a grupą 4 (co najmniej 8 genotypów ryzyka) (0,19 vs. 0,21, $p=0,0165$). Średnia w grupie 3 (7 genotypów ryzyka) jest wyższa od średniej w grupie 1, jednak różnica ta nie osiągnęła zadanej poziomu istotności (Rys. 13).



Rys. 12. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model recesywny.



Rys. 13. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model recesywny.

7.3.4. Punktacje ryzyka genetycznego jako zmienne ciągłe. Wyjaśniona zmienność PWV w modelu surowym i skorygowanym.

Stosując technikę regresji liniowej, sprawdzono jaką część zmienności PWV w modelu surowym (zmienna PWV) i skorygowanym (zmienna adjPWV) wyjaśniają zaproponowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego (GRS) potraktowane jako zmienne ciągłe. Zarówno w modelu surowym i skorygowanym największą część zmienności PWV wyjaśniła zliczona punktacja ryzyka genetycznego GRS_2 w modelu addytywnym, odpowiednio 8,42% oraz 6,83% zmienności.

W modelu surowym, zliczona punktacja ryzyka genetycznego GRS_1 i GRS_2 wyjaśniła odpowiednio 6,54% i 8,42% zmienności PWV. Pojedynczy polimorfizm SNP, włączony do zliczonej punktacji ryzyka genetycznego GRS, wyjaśnił co najwyżej 0,78% zmienności PWV w modelu addytywnym.

W modelu skorygowanym, zliczona punktacja ryzyka genetycznego GRS_1 i GRS_2 wyjaśniła odpowiednio 3,21% i 6,83% zmienności PWV. Pojedynczy polimorfizm SNP, włączony do zliczonej punktacji ryzyka genetycznego GRS, wyjaśnił co najwyżej 0,89% zmienności PWV w modelu addytywnym (Tab. 30).

Niezależnie jednak od modelu genetycznego, zmienna GRS_1 i GRS_2 sumująca efekt wybranych polimorfizmów SNP, wyjaśniła większą część zmienności PWV niż każdy z polimorfizmów SNP osobno (Tab. 29).

Tab. 29. Podsumowanie procentu wyjaśnionej zmienności PWV w modelu surowym i skorygowanym przez zliczoną punktację ryzyka genetycznego GRS oraz pojedyncze polimorfizmy SNP.

Zmienna	GRS_1	GRS_2	SNP min	SNP max
Model addytywny				
PWV	6,54%	8,42%	0,24%	0,78%
adjPWV	3,21%	6,83%	0,24%	0,89%
Model dominujący				
PWV	5,45%	7,65%	0,24%	0,67%
adjPWV	4,63%	6,73%	0,23%	1,14%
Model recesywny				
PWV	1,92%	5,48%	0,24%	0,85%
adjPWV	1,93%	2,59%	0,24%	0,84%

GRS – zliczona punktacja ryzyka genetycznego, SNP min i SNP max – minimalny i maksymalny procent wyjaśnionej zmienności przez pojedynczy polimorfizm SNP włączony do GRS.

Tab. 30. Podsumowanie wyników regresji dla zliczonych punktacji ryzyka genetycznego GRS_1 i GRS_2 jako zmiennych ciągłych.

Zmienna	Model	B	SE	BETA	t	p	CI dla B		N	R ² _{adj}	Q ² _{cv}	RMSEC	RMSECV
Model surowy (PWV)													
							-95%	+95%					
GRS_1	A	0,2626	0,0359	0,2581	7,31	$6,75 \cdot 10^{-13}$	0,1921	0,3331	751	0,0654	0,0642	2,0356	2,0396
GRS_2	A	0,2443	0,0295	0,2922	8,29	$5,36 \cdot 10^{-16}$	0,1864	0,3021	738	0,0842	0,0830	2,0204	2,0244
GRS_1	D	0,3283	0,0488	0,2391	6,73	$3,39 \cdot 10^{-11}$	0,2325	0,4240	749	0,0559	0,0545	2,0480	2,0522
GRS_2	D	0,3069	0,0388	0,2809	7,92	$8,95 \cdot 10^{-15}$	0,2308	0,3830	734	0,0776	0,0765	2,0325	2,0365
GRS_1	R	0,6067	0,1528	0,1431	3,97	$7,87 \cdot 10^{-5}$	0,3067	0,9067	756	0,0192	0,0177	2,0822	2,0865
GRS_2	R	0,4525	0,0683	0,2368	6,62	$6,88 \cdot 10^{-11}$	0,3183	0,5867	740	0,0548	0,0534	2,0471	2,0513
Model skorygowany (adjPWV)													
GRS_1	A	0,0178	0,0035	0,1827	5,07	$5 \cdot 10^{-7}$	0,0109	0,0247	747	0,0321	0,0309	0,1325	0,1327
GRS_2	A	0,0137	0,0019	0,2638	7,31	$7,08 \cdot 10^{-13}$	0,0100	0,0174	717	0,0683	0,0666	0,1291	0,1294
GRS_1	D	0,0219	0,0036	0,2181	6,14	$1,32 \cdot 10^{-9}$	0,0149	0,0289	757	0,0463	0,0447	0,1323	0,1326
GRS_2	D	0,0200	0,0027	0,2620	7,33	$6,18 \cdot 10^{-13}$	0,0147	0,0254	731	0,0673	0,0658	0,1296	0,1299
GRS_1	R	0,0274	0,0067	0,1484	4,12	$4,24 \cdot 10^{-5}$	0,0144	0,0405	755	0,0207	0,0193	0,1341	0,1344
GRS_2	R	0,0195	0,0041	0,1693	4,71	$2,89 \cdot 10^{-6}$	0,0114	0,0277	755	0,0274	0,0259	0,1336	0,1339

A – model addytywny, D – model dominujący, R – model recesywny, B – niestandardyzowany współczynnik równania regresji, SE – błąd standardowy współczynnika równania regresji, BETA – standardyzowany współczynnik regresji, t – wartość statystyki t, p – poziom istotności, 95% CI – 95% przedział ufności dla B, N – liczebność zbioru, R²_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji, Q²_{cv} – współczynnik walidacji krzyżowej, RMSEC – średni kwadratowy błąd kalibracji, RMSECV – średni kwadratowy błąd kalibracji.

6.4. Zaproponowane modele predykcyjne

1. **Model szacujący ryzyko syndromu przedwczesnego starzenia naczyniowego** na podstawie szyjno-udowej prędkości fali tętna PWV:
 - Prosty model zawierający jedynie skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS
 - Model złożony zawierający skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS i skorygowany (ang. *adjusted*) dodatkowo o zmienne kliniczne wykazujące związek z paramterem PWV tj. głównie wiek i wysokość ciśnienia tętniczego.

2. **Model szacujący ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych:**
 - Prosty model zawierający jedynie skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS
 - Model złożony zawierającego skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS i skorygowany (ang. *adjusted*) dodatkowo o klasyczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego tj. płeć, wiek, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej, ciśnienie krwi, palenie papierosów itp.

Zaproponowane modele mogą pomóc w optymalizacji oceny ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych, uwzględniając potencjalny nieklasyczny czynnik ryzyka, jakim jest zliczona punktacja ryzyka genetycznego. Replikacja i walidacja zaproponowanych modeli predykcyjnych pozwoli potwierdzić czy zliczone punktacje ryzyka genetycznego wiążą się niezależnie z ryzykiem syndromu przedwczesnego starzenia naczyń oraz ryzykiem sercowo-naczyniowym, i jeśli tak, to czy zmieniają klasyfikację chorego pod względem ryzyka i rokowania w kilkuletniej perspektywie.

VIII. DYSKUSJA

Ocena powikłań narządowych jest kluczowa dla dalszego postępowania z chorym z nadciśnieniem tętniczym. Decyduje o dalszej diagnostyce, leczeniu i działaniach profilaktycznych, mających na celu zmniejszenie ryzyka przyszłych powikłań sercowo-naczyniowych. Jednym z wczesnych powikłań naczyniowych w przebiegu nadciśnienia tętniczego jest zmiana właściwości ścian dużych tętnic, która prowadzi do przedwczesnego ich starzenia (syndrom EVA). Pomiar prędkości fali tętna (PWV) jest uważany za złoty standard w ocenie sztywności naczyń, gdyż stanowi niezależny od innych czynników predyktor zdarzeń sercowo-naczyniowych (Adji et al., 2011; Amar et al., 2001; Boutouyrie et al., 2002; Cecelja i Chowienczyk, 2012; Franklin, 2008; Gąsecki et al., 2012; Laurent et al., 2001, 2003a).

Sztywność naczyń jest wypadkową działania złożonych i nie do końca jeszcze poznanych i wyjaśnionych czynników o charakterze środowiskowym i genetycznym. Najnowsze kierunki i trendy w nauce, wskazują potrzebę wnikliwej analizy fenotypów pośrednich, w miejsce oceny fenotypu końcowego, jakim jest np. zdarzenie sercowo-naczyniowe (Khaleghi i Kullo, 2007; Lacolley et al., 2009; Varik et al., 2012). Fenotypem pośrednim w tym kontekście jest sztywność naczyń oraz zbiór czynników ryzyka, które mają udowodniony związek ze sztywnieniem naczyń. Do takich czynników zaliczamy m.in. zaburzenia gospodarki lipidowej i węglowodanowej, otyłość czy wysokość ciśnienia tętniczego krwi (Bastard et al., 2006; Cecelja i Chowienczyk, 2012; Franklin, 2008; Nilsson, 2011). Takie fenotypy pośrednie mogą w znaczący sposób ułatwić wyodrębnienie poszczególnych zespołów warunkujących proces sztywnienia naczyń, nie tłumaczą jednak całkowicie tego zjawiska. Często mogą one występować jednocześnie u jednego chorego. Co więcej, nie są one często jednorodnie przyczynowo i mogą stanowić efekt oddziaływania zarówno określonych czynników środowiskowych, jak i genetycznych, co w znacznym stopniu modyfikuje stopień ujawnienia się fenotypu sztywności naczyń.

Genomowe DNA zawiera unikalny wzór polimorfizmów SNP, który składa się z wielu różnych wariantów genetycznych. Stwierdzono, że większość polimorfizmów SNP w istocie nie jest bezpośrednio odpowiedzialna za rozwój choroby. Zamiast tego polimorfizmy SNP służą jako markery biologiczne identyfikujące predyspozycję zachorowania na mapie ludzkiego genomu, ponieważ zwykle są one zlokalizowane w pobliżu genów uznanych za związane z niektórymi chorobami (Bancroft, 2013; Becker, 2004; Davies, 2013). Dlatego też w myśl hipotezy „częsty wariant genetyczny – częsta choroba” (ang. *common variant – common disease hypothesis*) polimorfizmy SNP wydają się być kluczem dla zrozumienia ryzyka zachorowania i być może patogenezą złożonych chorób cywilizacyjnych, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego, nadciśnienia tętniczego oraz przedwczesnego starzenia naczyniowego.

Podjęmowane są analizy zarówno pojedynczych polimorfizmów SNP, jak i układów kilku-kilkunastu polimorfizmów SNP w celu opisanie kombinacji alleli i genotypów, które warunkują predyspozycję do rozwinięcia danego fenotypu. Analizy takie utrudniają występowanie skomplikowanych, wielopoziomowych interakcji między

polimorfizmami SNP a czynnikami środowiskowymi oraz fakt, że wzrastająca liczba polimorfizmów SNP wykazuje związek z więcej niż jednym fenotypem (plejotropia) (Borzyszkowska et al., 2012; Hunter, 2005; Kraft i Hunter, 2005; Talmud, 2007; Yang et al., 2010b; Zintzaras i Lau, 2008). W znaczący sposób utrudnia to ocenę ogólnego wpływu czynników genetycznych na ryzyko zachorowania, czy bardziej ogólnie, ryzyko rozwinięcia danego fenotypu.

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że najważniejszym celem tego typu analiz nie powinna być jedynie odpowiedź na pytanie czy związek pomiędzy polimorfizmami SNP i ich poszczególnymi układami a ryzykiem choroby jest istotny statystycznie. Nadrzędnym celem powinno być praktyczne kliniczne znaczenie wykrytego związku, to znaczy potwierdzenie, że poprawią obecne metody szacowania ryzyka sercowo-naczyniowego, a tym samym zmienią wytyczne postępowania z chorym. Potwierdzenie takiej użyteczności klinicznej wymaga wieloletniej obserwacji kohorty chorych w celu oceny jakości predykcji opracowanych narzędzi oceniających globalne ryzyko genetyczne (tzw. proces replikacji i walidacji wyników badań) (Ashley et al., 2010; Backer et al., 2012; Kessler i Schunkert, 2012).

Oznaczenia polimorfizmów genetycznych SNP nie są obecnie ani technicznie trudne, ani czasochłonne czy bardzo drogie. Przykładowo, wykorzystane w tym projekcie urządzenie Sequenom wraz z system iPLEX® pozwala oznaczyć jednorazowo do 15350 polimorfizmów SNP na 384-dołkowej formie płytki (<http://www.sequenom.com/>, data dostępu: 13.04.2014). Wykazanie klinicznej użyteczności tych analiz stanowi jednak jak dotąd duże wyzwanie badawcze.

Niemniej poznanie i opisanie swoistych układów alleli i genotypów predysponujących do przedwczesnego starzenia naczyniowego, wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych czy też wystąpienia innego określonego fenotypu pośredniego może stać się silną podstawą do opracowania prostych testów diagnostycznych i algorytmów postępowania z chorym, pozwalających na określenie indywidualnego ryzyka zachorowania lub wyboru optymalnej metody leczenia.

8.1. Równowaga Hardy'ego – Weinberga

W 1908 roku, niezależnie od siebie, matematyk G.H. Hardy i lekarz W. Weinberg sformułowali prawo dotyczące częstości występowania alleli i genotypów w populacji. Populacja, w której rozkład genotypów jest potwierdzony przez zależność: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (gdzie p i q oznaczają odpowiednio frekwencję rzadszego i częstszego allelu), znajduje się w stanie równowagi genetycznej zwanej również równowagą Hardy'ego-Weinberga. Taki stan informuje, że proporcja alleli w kolejnych pokoleniach nie zmienia się, a badana populacja nie podlega ewolucji. Aby taka sytuacja miała miejsce, konieczne jest spełnienie m.in. następujących warunków: 1) brak selekcji (żaden z alleli nie jest uprzywilejowany tzn. nosiciel allelu p czy q nie ma zmniejszonych szans przeżycia), 2) brak mutacji, 3) brak migracji, 4) osobniki krzyżują się losowo, 5) frekwencja alleli jest taka sama u kobiet i mężczyzn, 6) nie występują odchylenia od prawa niezależnej segregacji alleli. Mimo że założenia wydają się być

bardzo restrykcyjne, w praktyce niewielkie odstępstwa nie wpływają znacząco na model, a stan równowagi Hardy'ego-Weinberga występuje w praktyce dość często.

Analizę zgodności rozkładu częstości genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga wykonuje się najczęściej za pomocą testu χ^2 Pearsona (Ledwina i Gnot, 1980). W przypadku wystąpienia w tabelach kontyngencji o rozmiarach innych niż 2x2 liczebności mniejszych od 5, zalecany jest dokładny test Fishera z poprawką Freemana-Haltona (Freeman i Halton, 1951).

W niniejszej pracy dla 5 polimorfizmów SNP wystąpiła opisana powyżej sytuacja. Nie zastosowano jednak dokładnego testu Fishera z poprawką Freemana-Haltona ze względu na ograniczenia obliczeniowe programu matematycznego (MATLAB). W posiadanej wersji programu MATLAB maksymalna wartość liczby to $2 \cdot 10^{308}$, czyli ok. 170!, podczas gdy posiadane dane według wzoru Freemana-Haltona wymagają obliczeń dla wartości rzędu 900!. Z tego powodu do wyników zgodności rozkładu częstości genotypów dla tych 5 polimorfizmów SNP należy podejść z ostrożnością.

Testowanie równowagi Hardy'ego-Weinberga jest często wykorzystywaną techniką sprawdzającą jakość wyników genotypowania (Xu et al., 2002). Wittke-Thompson et al., (2005) wskazują jednak, że obserwowane odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga w grupie tzw. przypadków (ang. *cases*), niekoniecznie muszą oznaczać błędy w procesie genotypowania. Zamiast bezkrytycznego usunięcia takich danych, sugerują dogłębnie przyjrzeć się potencjalnemu związkowi pomiędzy danym polimorfizmem genetycznym a analizowaną cechą fenotypową.

Dla 21 spośród 168 polimorfizmów SNP, rozkłady genotypów nie wykazały zgodności z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga ($p < 0,05$). W takim przypadku uprawione jest stawianie ostrożnych hipotez co do przyczyny zaobserwowanego odchylenia. Ze względu na to, że grupa badana w niniejszej pracy jest populacją chorych na nadciśnienie tętnicze pierwotne, brak zgodności rozkładu genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga może wskazywać na potencjalne znaczenie tych polimorfizmów SNP jako biomarkerów zwiększonego ryzyka wystąpienia nadciśnienia tętniczego. Potwierdzenie tego wymagałoby porównania częstości genotypów tych polimorfizmów SNP w grupie kontrolnej bez stwierdzonego nadciśnienia tętniczego (Bochud, 2012; Lucchinetti i Zaugg, 2008; Wittke-Thompson et al., 2005).

W niniejszym badaniu nie dysponowano jednak grupą kontrolną bez stwierdzonego nadciśnienia tętniczego. Postanowiono zatem wykorzystać dane populacji europejskiej zgromadzone w projekcie „1000 Genomes”. Dla 12 spośród 21 polimorfizmów SNP, które nie były w stanie równowagi genetycznej Hardy'ego-Weinberga, wykazano istotną różnicę między frekwencją występowania danego allelu w grupie badanej a frekwencją w generalnej populacji europejskiej. Spośród tych 12 polimorfizmów SNP, 4 w sposób istotny (poziom istotności $p < 0,1$) wyjaśniły zmienność parametru PWV i zostały włączone do konstrukcji zliczonego ryzyka genetycznego GRS. Są to polimorfizmy SNP o następujących sygnaturach: rs198358, rs2234693, rs3025343 oraz rs633185.

W pracy Newton-Cheh et al. (2009a) wykazano związek polimorfizmu rs198358 z poziomem krążącego w osoczu przedsionkowego ($p = 8 \cdot 10^{-30}$) i mózgowego ($p = 1 \cdot 10^{-25}$) peptydu natriuretycznego (NPPA i NPPB). Allel G związany z wyższym

stężeniem NPPA i NPPB wykazał również związek z niższym ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym krwi (odpowiednio $p=6 \cdot 10^{-5}$ oraz $p=5 \cdot 10^{-5}$) oraz mniejszym ryzykiem szansy wystąpienia nadciśnienia tętniczego ($OR=0,90$, $p=2 \cdot 10^{-4}$). W niniejszej pracy zaobserwowano natomiast związek genotypu GG z podwyższoną wartością parametru PWV w modelu skorygowanym recesywnym ($p=0,06$). Jest to nieoczekiwany wynik. Rozbieżność może wynikać z samych różnic w analizowanych populacjach lub może być rezultatem błędu statystycznego (wynik na granicy istotności statystycznej). Newton-Cheh et al. (2009a) wykonał analizę w populacji generalnej, natomiast tutaj badaniu została poddana populacja chorych z nadciśnieniem tętniczym.

Polimorfizm rs2234693, zlokalizowany w obrębie genu receptora estrogenów *ESR2*, został powiązany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego, dysfunkcją śródbłonna oraz zdarzeniami sercowo-naczyniowymi (Delling et al., 2008). W pracy tej stwierdzono związek genotypu CC ze zwiększoną wartością parametru PWV w modelu skorygowanym recesywnym ($p=0,0481$). Potwierdziły to również wcześniejsze badania Peter et al. (2009) wskazujące na związek genotypu CC ze zwiększonym współczynnikiem wzmocnienia, co sugeruje zwiększoną sztywność naczyń.

Tobacco and Genetics Consortium (2010) stwierdziło związek polimorfizmu rs3025343 ze statusem palenia tytoniu. Wśród byłych palaczy tytoniu stwierdzono istotnie większą frekwencję allelu G ($OR=1,12$, $p=3,6 \cdot 10^{-8}$). Polimorfizm ten jest zlokalizowany w okolicy genu *DBH*, kodującego beta hydroksylazę dopaminową i może wpływać na jej aktywność, a tym samym na poziom syntezy noradrenaliny z dopaminy (McKinney et al., 2000). W niniejszej pracy stwierdzono związek allelu G z podwyższonymi wartościami parametru PWV, zarówno w modelu addytywnym surowym i skorygowanym (odpowiednio, $p=0,02$ i $p=0,0082$), jak i modelu dominującym surowym i skorygowanym (odpowiednio, $p=0,0414$ i $p=0,0081$).

Ehret et al. (2011) i Wain et al. (2011) wykazali związek allelu G polimorfizmu rs633185 z niższymi wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia oraz ciśnieniem tętna. Obecnie powszechnie uważa się, że zjawisko sztywnienia naczyń powiązane jest ze wzrostem wartości powyższych parametrów. W tej pracy również wykazano, że nosiciele allelu G charakteryzują się istotnie niższymi wartościami parametru PWV w modelu addytywnym ($p=0,0294$).

Podsumowując, wykazano że 12 polimorfizmów SNP może mieć znaczenie jako biomarkery zwiększonego ryzyka wystąpienia nadciśnienia tętniczego. Jednocześnie 4 polimorfizmy SNP wykazały związek z wartością parametru PWV, opisującego sztywność naczyń. W świetle nawet najnowszych doniesień naukowych można jedynie ostrożnie spekulować o potencjalnych mechanizmach przyczynowo-skutkowych łączących te polimorfizmy z nadciśnieniem tętniczym oraz ze zwiększoną sztywnością naczyń. Wykazanie takiego związku oraz potwierdzenie użyteczności tych wyselekcjonowanych polimorfizmów SNP jako biomarkerów zwiększonego ryzyka nadciśnienia tętniczego czy przedwczesnego sztywnienia naczyń będzie wymagało dodatkowych badań oraz wieloletniej prospektywnej obserwacji populacji chorych.

8.2. Model surowy a model skorygowany

Wyniki badań nad sztywnością naczyń wskazują, że jest to złożona cecha fenotypowa, na którą wpływa wiele czynników środowiskowych np. wiek (Wojciechowska et al., 2012). Jedną z metod, która uwzględnia wpływ takich zmiennych zakłócających jest budowanie tzw. modeli skorygowanych (ang. *adjusted models*). W modelu skorygowanym jako zmienną zależną wprowadza się reszty regresyjne odciążone z wpływu zmiennych zakłócających (najczęściej poprzez technikę regresji liniowej). Zabieg taki umożliwia porównanie efektów analizowanych polimorfizmów SNP przy jednoczesnej eliminacji wpływu innych czynników skorelowanych z wyjściową zmienną (Naylor et al., 2009). Dlatego też w modelach skorygowanych i surowych otrzymane wyniki często nie są tożsame, choć niektóre polimorfizmy SNP mogą w takich modelach współwystępować, co może mieć pewne znaczenie.

Również w niniejszej pracy zaobserwowano współwystępowanie tych samych polimorfizmów SNP niezależnie od zastosowanego modelu tj. surowego czy skorygowanego w danym modelu genetycznym. W modelu surowym i skorygowanym addytywnym, dominującym i recesywnym współwystępowało odpowiednio 6, 6 i 5 polimorfizmów SNP. W modelu addytywnym polimorfizmy SNP były związane głównie ze stężeniem cholesterolu LDL i trójglicerydów oraz ciśnieniem tętniczym krwi. W modelu dominującym ze stężeniem trójglicerydów, cholesterolu LDL i HDL oraz ciśnieniem krwi, zaś w modelu recesywnym z ciśnieniem tętniczym krwi oraz ryzykiem zawału serca lub choroby niedokrwiennej serca. Może to być bardzo cenna informacja, która pozwoli skonstruować na dalszym etapie badań punktację ryzyka genetycznego przewidującą wartość PWV niezależnie od wpływu zmiennych zakłócających np. wieku, ciśnienia tętniczego krwi czy funkcji nerek.

Dodatkowo w niniejszej pracy obserwowano, że w modelach skorygowanych różnice średnich wartości PWV w grupach wyznaczonych przez kwartyle zliczonych punktacji ryzyka genetycznego są słabiej zaznaczone, chociaż nadal istotnie statystycznie. Jest to jak najbardziej oczekiwana obserwacja. Wynika ona z tego, że większą część zmienności analizowanej zmiennej PWV wyjaśniono czynnikami środowiskowymi i klinicznymi. W konsekwencji o wiele trudniej jest wykazać wysoki istotny statystycznie związek polimorfizmów SNP i zliczonych punktacji ryzyka genetycznego z daną cechą fenotypową (Cordell i Clayton, 2005).

Bardzo częstym zwyczajem w pracach badawczych dotyczących związku polimorfizmów SNP z daną cechą fenotypową, jest prezentowanie wyników analiz zarówno w modelach surowych, jak i skorygowanych, które uwzględniają różne zestawy zmiennych zakłócających. Niestety rzadko zdarza się, że w publikacji prezentowane są szczegółowe informacje dotyczące jakości modelu po włączeniu wybranych zmiennych zakłócających, co utrudnia porównanie uzyskanych wyników analiz. W niniejszej pracy przedstawiono szczegółowe informacje dla wszystkich zaproponowanych modeli skorygowanych dla parametru PWV. Zawiera ona szereg parametrów m.in. dotyczących zmienności PWV wyjaśnionej przez poszczególne zestawy zmiennych zakłócających, wartości współczynników równania regresji, ich

błędy oszacowania oraz poziom istotności statystycznej, a także parametry opisujące jakość przewidywania modelu. Taka szczegółowa informacja dotycząca skonstruowanych modeli pozwoli innym badaczom na porównanie i zreplikowanie wyników analiz w innych populacjach.

Już w roku 1981, Siemiatycki i Thomas (1981) zwrócili uwagę, że analizując dane, zwłaszcza o charakterze biologicznym, należy rozróżnić modelowanie statystyczne (ang. *statistical modelling*) i modelowanie biologiczne (ang. *biological modelling*). Oba podejścia wykorzystują takie same lub podobne narzędzia statystyczne do rozwiązania różnych problemów badawczych. Badając i modelując złożone zjawiska i procesy biologiczne wydaje się być jednak nieuzasadnione kierowanie się sztywno kryteriami czysto statystycznymi np. poziomem istotności współczynników równania regresji. Gomez-Ramirez i Sanz (2013) zwracają uwagę, że w ten sposób skonstruowany model będzie doskonały pod względem statystycznym, ale jednocześnie istnieje ryzyko utraty cennej informacji „biologicznej”, która często wymyka się regułom statystycznym, rządząc się własnymi regułami – nieliniowymi lub takimi, których do tej pory nie opisano. Dlatego modele opisujące złożone procesy i zjawiska biologiczne nie mogą być jedynie tworem statystycznym, ale powinny odzwierciedlać rzeczywistość, uwzględniając wiedzę ekspercką badacza, często nawet kosztem istotności parametrów statystycznych (Gomez-Ramirez i Sanz, 2013; Siemiatycki i Thomas, 1981).

Biorąc powyższe pod uwagę, budując model skorygowany dla parametru PWV, zdecydowano o wyborze modelu, który będzie kompromisem pomiędzy modelowaniem statystycznym i biologicznym. Taki model uwzględnił zmienne, których współczynniki równania regresji nie osiągnęły zadanego poziomu istotności statystycznej (za to pozwala na kontrolowanie ich wpływu na zmienną zależną), eliminując jednocześnie te zmienne, które w znaczący sposób pogarszają jakość opracowanego modelu. Ostatecznie zmienna PWV została skorygowana o wpływ następujących zmiennych: wiek ($p=1,7 \cdot 10^{-27}$), ciśnienia tętna z całodobowego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi ($p=2,8 \cdot 10^{-9}$), wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR ($p=0,007$), płeć ($p=0,19$) oraz stosunek obwodu pasa do obwodu bioder WHR ($p=0,158$). Wszystkie wymienione zmienne według dostępnych danych literaturowych wykazują silny związek ze sztywnością naczyń (Briet et al., 2012; Cavalcante et al., 2011; Chue et al., 2010; Perlini et al., 2012; Safar et al., 2004; Scuteri et al., 2012). Zgodnie z oczekiwaniami największy wpływ na sztywność naczyń wywierał wiek (naturalne starzenie naczynia) (Lee i Oh, 2010; Greenwald, 2007; McEniery et al., 2007) oraz wartości ciśnienia tętniczego krwi, które w znaczący sposób mogą przyspieszyć proces starzenia naczynia (AlGhatrif et al., 2013; Scuteri et al., 2012; Palatini et al., 2011; Payne et al., 2010).

8.3. Model genetyczny (model dziedziczenia)

W badaniach nad związkiem danego markera genetycznego (np. polimorfizmu SNP) z daną cechą fenotypową w badaniach populacyjnych rzadko dostępne są dowody sugerujące sposób dziedziczenia tzw. allelu ryzyka. Dlatego często w pracach

badawczych prezentowane są wyniki badań dla jednego wybranego modelu lub kilku modeli genetycznych.

Najczęściej stosowane są trzy modele dziedziczenia tj. addytywne, dominujące i recesywne. Jeśli ryzyko rozwinięcia danego fenotypu dla heterozygoty będącej nosicielem jednej kopii ryzyka i dla jednej z homozygot jest takie samo, sugerowany model genetyczny jest dominujący, i przypadki są dzielone na „nosicieli” vs. „nie-nosicieli” allelu ryzyka. Jeśli do rozwinięcia pełnego fenotypu ryzyka potrzebne są dwie kopie allelu, model genetyczny jest recesywny. Model addytywny zakłada natomiast, że nosiciele dwóch alleli ryzyka mają dwa razy większe ryzyko (wyrażone na skali log) w porównaniu do heterozygoty. Zazwyczaj przeprowadzenie analizy danych tylko w jednym wybranym modelu genetycznym nie jest uzasadnione naukowo (Attia et al., 2003; Lettre et al., 2007; Salanti et al., 2009).

Wybór modelu genetycznego jest często dyktowany przez pewną wygodę analizy danych lub jest zwyczajowo przejęty w danej dziedzinie nauki. Przykładowo, analiza związku dla rzadkiego allelu ryzyka o MAF <10%, bardzo często wykonywana jest w modelu dominującym w celu zwiększenia mocy statystycznej testu. Wyniki badań GWAS są natomiast zazwyczaj prezentowane jako ryzyko przypadające na jeden allel (ang. *per-allele risk*), czyli w modelu addytywnym (Manolio et al., 2008). Bardzo często jednak przesłanki skłaniające do wyboru danego modelu genetycznego nie są w publikowanych pracach przedstawione.

Ze względu na to, że również w niniejszej pracy nie posiadano wiedzy *a priori* odnośnie modelu dziedziczenia analizowanych polimorfizmów SNP, zdecydowano o wykonaniu analizy w trzech modelach genetycznych: addytywnym, dominującym oraz recesywnym. W przypadku analizy związku pojedynczych polimorfizmów SNP z parametrem PWV każdy z modeli wykazał podobne dopasowanie do danych. W modelu addytywnym procent wyjaśnionej wariancji PWV wahał się w granicach 0,24–0,89%, w modelu dominującym 0,23%–1,14%, a w modelu recesywnym 0,24%–0,85%. Jedyne polimorfizmy genetyczne SNP, zwracający szczególną uwagę to rs6725887 (zlokalizowany w pobliżu genu *WDR12*). Został on pierwotnie powiązany z ryzykiem wystąpienia zawału serca bądź choroby niedokrwiennej serca (Kathiresan et al., 2009a). Polimorfizm ten wyjaśnił 1,14% zmienności parametru PWV w modelu skorygowanym dominującym. W literaturze nie odnaleziono żadnego doniesienia łączącego polimorfizm rs6725887 ze sztywnością naczyń.

W przypadku analizy dotyczącej wariancji wyjaśnionej przez skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS, najlepiej dopasowanymi modelami okazały się modele addytywne (6,54–8,42% wyjaśnionej wariancji w modelu surowym i 3,21–6,83% w modelu skorygowanym) oraz dominujące (5,45–7,65% wyjaśnionej wariancji w modelu surowym i 4,63–6,73% w modelu skorygowanym). GRS w modelu recesywnym wyjaśniły zaledwie 1,92–5,48% w modelu surowym i 1,93–2,59% w modelu skorygowanym.

Podsumowując, najbardziej dopasowanym modelem dziedziczenia dla analizowanych w pracy polimorfizmów SNP okazał się model addytywny i dominujący, najmniej zaś model recesywny. Dane literaturowe wskazują, że modele addytywne i dominujące często wykazują podobne dopasowanie do analizowanych danych, mają

jednak mniejszą moc w przypadku faktycznego recesywnego modelu dziedziczenia SNP zwłaszcza o MAF <20% (Lettre et al., 2007). Lettre et al. (2007) wskazują również na możliwość analizy w modelach mieszanych, łączących np. model addytywny i/lub dominujący z modelem recesywnym. Symulacja danych wykazała, że zastosowanie takich mieszanych modeli dziedziczenia pozwala na zwiększenie mocy statystycznej podczas wykonywania wielokrotnych analiz na tym samym zbiorze danych. W kontynuacji niniejszych badań planowane jest zastosowanie zaproponowanych modeli mieszanych i porównanie z uzyskanymi wynikami w modelu addytywnym, dominującym i recesywnym.

Wybór najlepiej dopasowanego modelu dziedziczenia może być istotny dla późniejszej optymalizacji i walidacji wyników dla predykcji ryzyka zachorowania. Niemniej do wyników analiz trzeba podchodzić z ostrożnością. Jeśli nie ma wcześniej potwierdzonego związku pomiędzy polimorfizmem SNP a danym fenotypem, dopasowanie danego modelu genetycznego może nastąpić bardziej do szumu i błędu danych niż prawdziwego mechanizmu dziedziczenia, zwłaszcza przy tak mało licznej grupie. Ze statystycznego punktu widzenia budowane modele jedynie odzwierciedlają sposób dziedziczenia allelu ryzyka i dlatego mogą być obciążone pewnym błędem.

8.4. Analiza pojedynczych polimorfizmów SNP oraz ich układów

Ważnym kierunkiem genetyki chorób układu krążenia jest przywidywanie indywidualnego ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych. Badania GWAS mają szansę stać się pomostem łączącym badania nad genetyką chorób układu krążenia a codzienną praktyką kliniczną chorych (Khoury et al., 2009a). Kolejne replikacje i walidacje uzyskanych wyników badań pozwolą w najbliższych latach ocenić użyteczność kliniczną informacji genetycznej w szacowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego i być może włączyć ocenę ryzyka genetycznego do wytycznych postępowania z chorym jako narzędzia uzupełniającego praktykę kliniczną (Dzida, 2004; Khoury et al., 2009b; Lee et al., 2012).

Publikowane przez ostatnie lata wyniki badań GWAS wskazały na związek częstych wariantów polimorficznych SNP z m.in. ryzykiem zawału serca czy choroby niedokrwiennej serca. Najsilniejszy jak dotąd sygnał pochodzi z okolic genu *CDKN2A/CDKN2B* zlokalizowanego w chromosomie 9p21. Występowanie allelu ryzyka w populacji szacuje się na blisko 50%. Iloraz szans (OR) wystąpienia zawału serca u nosicieli allelu ryzyka wynosi ok. 1,2-1,3. Wartość ta jest jednak znacznie mniejsza niż iloraz szans związany z tradycyjnymi czynnikami ryzyka jak np. nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów czy hipercholesterolemia (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Samani et al., 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Dlatego wydaje się, że wartość predykcyjna indywidualnego ryzyka zachorowania za pomocą jedynie jednego polimorfizmu SNP zlokalizowanego w pobliżu genu *CDKN2A/CDKN2B* jest zbyt mała, aby kazała się przydatna klinicznie.

Tę obserwację potwierdzają inne doniesienia naukowe, które wskazują, że w przypadku szacowania indywidualnego ryzyka zachorowania, efekt wywierany przez pojedynczy polimorfizm genetyczny SNP jest zbyt mały, aby mogło to

zrewolucjonizować codzienną praktykę kliniczną. Z drugiej jednak strony, wyniki kolejnych metaanaliz badań GWAS, ich replikacje oraz walidacje, wskazują jednak na rosnącą liczbę polimorfizmów genetycznych SNP, które pomimo niewielkiego efektu, wciąż są związane z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych (Ehret i Caulfield, 2013; Faergeman, 2013; Melander, 2008). Zaproponowano więc narzędzie, które sumuje łączny efekt wywierany przez polimorfizmy SNP, czyli tzw. zliczoną punktację ryzyka genetycznego (GRS, ang. *genetic risk scores*). Wydaje się, że taka zliczona punktacja ryzyka genetycznego może znacząco poprawić precyzję szacowania indywidualnego ryzyka zachorowania, niezależnie lub, co bardziej prawdopodobne, łącznie z tradycyjnymi czynnikami ryzyka (Horne et al., 2005; Liu i Song, 2010). Potwierdziła to m.in. praca Lluís-Ganella et al. (2012), w której wykazano, że zliczona punktacja ryzyka genetycznego GRS, oparta na 7 polimorfizmach SNP, była liniowo związana z ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej. Zastosowanie punktacji ryzyka genetycznego pozwoliło na efektywną reklasyfikację ryzyka zachorowania zwłaszcza w grupie średniego ryzyka, w porównaniu z ryzykiem szacowanym na podstawie tradycyjnych czynników ryzyka (skala *Framingham* i *Score*).

Dodatkową zaletą GRS jest jej odporność na wpływ frekwencji rzadszego allelu (MAF) danego polimorfizmu genetycznego SNP, wchodzącego w jej skład. Wraz ze wzrastającą liczbą polimorfizmów SNP włączonych do GRS, rozkład GRS (a więc i ryzyko genetyczne) dąży do rozkładu normalnego, nawet jeśli frekwencja danego allelu ryzyka jest stosunkowo mała (Fisher, 1919).

W niniejszej pracy wykazano niewielki efekt analizowanych pojedynczych polimorfizmów SNP na wartość parametru PWV. W modelu addytywnym surowym i skorygowanym, zakładającym wzrost ryzyka z każdym niekorzystnym allelem, jedynie 13 polimorfizmów SNP wyjaśniło zmienność PWV na poziomie istotności $p < 0,05$. Procent wyjaśnionej zmienności PWV wahał się w granicach 0,24–0,89%. Podobne wyniki uzyskano również dla modelu dominującego i recesywnego, zarówno surowego jak i skorygowanego. Jest to zgodne m.in. z wynikami badań Park et al. (2011), które wykazały, że pojedyncze polimorfizmy SNP wyjaśniają średnio 0,2% zmienności danej ilościowej cechy fenotypowej np. stężenia cholesterolu LDL.

Skonstruowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego w modelu addytywnym surowym i skorygowanym wyjaśniły odpowiednio 8,42% i 6,83% zmienności parametru PWV. Składały się one odpowiednio z 15 i 16 polimorfizmów SNP. Jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy, którym udawało się wyjaśnić zaledwie 10-15% zmienności ilościowych i jakościowych cech fenotypowych (takich jak wzrost, ciśnienie tętnicze krwi czy choroba Leśniowskiego-Crohna), włączając do analizy od kilkunastu do ponad 200 polimorfizmów SNP (Franke et al., 2010; Lango Allen et al., 2010; Teslovich et al., 2010). Symulacja danych przeprowadzona przez Yang et al. (2010a) wykazała, że do wyjaśnienia 45% zmienności cechy ilościowej np. wzrostu potrzebnych byłoby ok. 1485 polimorfizmów SNP. Pozostałą część niewyjaśnionej wariacji często nazywa się „zaginioną odziedziczalnością” (ang. *missing heritability*), co prawdopodobnie może wynikać z m.in. nie uwzględnienia oddziaływań pomiędzy polimorfizmami SNP a czynnikami środowiskowymi (Manolio et al., 2009; Marian, 2012).

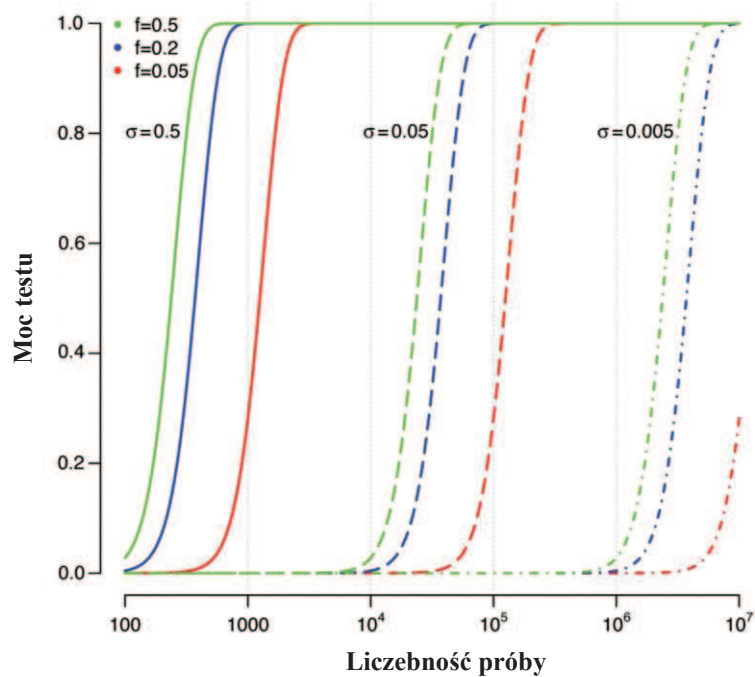
Prezentowane tutaj wyniki pracy własnej oraz wyniki publikowanych już badań innych autorów wskazują na duży potencjał zliczonych punktacji ryzyka genetycznego GRS jako bardzo skutecznego narzędzia do oceny globalnego ryzyka genetycznego rozwinięcia danego fenotypu. Daje to nadzieję, że GRS mają szansę stać się użytecznym narzędziem wspomagającym i uzupełniającym codzienną praktykę kliniczną chorych.

8.5. Moc statystyczna analiz

W pierwszym etapie analiz objętych pracą doktorską przeprowadzono analizę związku polimorfizmów SNP z parametrem PWV w każdym modelu dziedziczenia, zarówno w modelu skorygowanym i surowym. Ze względu na liczbę wykonywanych testów statystycznych na tym samym zbiorze danych powinna zostać zastosowane odpowiednie poprawki (np. poprawka Bonferroniego) w celu uniknięcia wyników fałszywie pozytywnych (Curran-Everett, 2000). Dla analizowanego zbioru danych graniczna wartość prawdopodobieństwa testowego p , oznaczająca istotnie statystyczny związek pomiędzy polimorfizmem SNP a parametrem PWV, powinna wynosić $p=0,05/(155 \text{ SNP} \cdot 3 \text{ modele genetyczne} \cdot 2 \text{ zmienne}) = 5,38 \cdot 10^{-5}$.

Żaden z analizowanych w pracy polimorfizmów SNP nie osiągnął takiego poziomu istotności statystycznej w żadnym modelu genetycznym. Najmniejszą wartość poziomu istotności osiągnął polimorfizm rs6725887 w modelu skorygowanym dominującym i addytywnym, odpowiednio $p=0,0021$ oraz $p=0,006$. Nie zarzucono jednak dalszych analiz, mając na uwadze prawdopodobną małą moc testu do wykrycia takiego związku.

Moc testu statystycznego jest proporcjonalna do liczebności próby, frekwencji rzadszego allelu (MAF) oraz wielkości efektu polimorfizmu SNP na analizowaną cechę fenotypową oraz odwrotnie proporcjonalna do ilości wykonanych testów statystycznych (Visscher et al., 2014; Watanabe, 2011). Rys. 14 przedstawia moc testu jako funkcję liczebności próby dla 3 różnych wartości MAF i 3 różnych wielkości efektu wywieranego przez polimorfizm SNP. Na przykładzie najnowszych wyników badań GWAS dotyczących ciśnienia tętniczego krwi, wielkość efektu polimorfizmów SNP wynosi ok. 1mmHg dla ciśnienia skurczowego krwi oraz ok. 0,5 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego krwi, co odpowiada 0,05 odchylenia standardowego (SD) dla rozkładu cechy fenotypowej. Z Rys. 14 wynika również, że nawet w przypadku dużej grupy badanej składającej się z ok. 70 000 przypadków, moc testu dla polimorfizmu SNP o MAF ~5% jest mała i wynosi ok. 0,3 (Ehret et al., 2011; Wain et al., 2011). Dla polimorfizmu SNP o większej wartości MAF przy tej samej wielkości próby, moc testu wzrasta. Z Rys. 14 wynika też, że im większy efekt polimorfizmu SNP (np. 0,5 SD) tym większa moc testu nawet przy mniej licznej próbie badanej (Ehret i Caulfield, 2013).



Rys. 14. Moc statystyczna testu analizującego związek polimorfizmu SNP z ciągłą cechą fenotypową. Moc testu została przedstawiona jako funkcja liczebności próby dla 3 wartości frekwencji rzadszego allelu (MAF): MAF 50% (kolor zielony), MAF 20% (kolor niebieski), MAF 5% (kolor czerwony) oraz 3 wartości wielkości efektu wyrażonych jako odchylenie standardowe (SD) ciągłej cechy fenotypowe: 0,5 SD (linia ciągła), 0,05 SD (linia przerywana) i 0,005 SD (linia przerywana z kropkami). Założony poziom $\alpha=5 \cdot 10^{-8}$. Na podstawie **Ehret i Caulfield, 2013**.

Z przedstawionych powyżej informacji wynika, że dysponując próbą o liczebności ok. 700 przypadków, moc testu pozwalająca wykryć związek polimorfizmów SNP z daną cechą fenotypową na poziomie istotności $p=1 \cdot 10^{-8}$, jest możliwa dla polimorfizmów SNP o MAF >20% i wielkości 0,5 SD. W badanej populacji natomiast wartość MAF zawierały się w przedziale od 0,05% do blisko 50%, a wielkość efektu analizowanych SNP nie była znana, co utrudniło osiągnięcie poziomu istotności uwzględniającą poprawkę Bonferroniego.

Mając na uwadze małą moc testu, zdecydowano o uznaniu wartości poziomu prawdopodobieństwa testowego $p=0,05$ jako istotnej statystycznie i wartości $p<0,01$ jako sugerującej związek danego polimorfizmu SNP z parametrem PWV.

W przypadku porównania średnich wartości PWV w grupach wyznaczonych przez kwartyle GRS, graniczna wartość prawdopodobieństwa testowego p uwzględniająca poprawkę Bonferroniego wyniosła $p=0,05/(3 \text{ modele} \cdot 2 \text{ zmienne} \cdot 2 \text{ GRS}) = 0,004$. W przedstawionych analiz nie osiągnięto zadanego poziomu istotności jedynie dla modelu skorygowanego recesywnego dla zliczonej punktacji ryzyka genetycznego skonstruowanego na podstawie polimorfizmów z $p>0,1$ (GRS₂). W pozostałych przypadkach osiągnięty poziom istotności wyniósł od $1,46 \cdot 10^{-11}$ do 0,0007.

W analizie regresji liniowej, w której sprawdzono jaką część zmienności PWV wyjaśniają zaproponowane zliczone punktacje ryzyka genetycznego (GRS) jako zmienne ciągłe, wszystkie wyniki analiz osiągnęły zadany poziom istotności tj. $p=0,004$. Wskazuje to, że zliczone punktacje ryzyka wyjaśniają w sposób istotny

większą część zmienności PWV w modelu surowym, jak i skorygowanym, niezależnie od zastosowanego modelu genetycznego, niż pojedyncze polimorfizmy SNP.

8.6. Fenotypy pośrednie i końcowe, polimorfizmy SNP i zliczone punktacje ryzyka genetycznego

Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) w fenotypach sercowo-naczyniowych i ich czynników ryzyka wskazały na istotne asocjacje na poziomie genomu. Potwierdziły ponadto, że polimorfizmy SNP związane m.in. z wysokością ciśnienia krwi, okazały się również związane z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. Sugeruje to, że różne fenotypy sercowo-naczyniowe mogą być manifestacją kliniczną częściowo wspólnego podłoża genetycznego.

Do tej pory nie opublikowano żadnych badań GWAS dotyczących związku częstych wariantów genetycznych z parametrem PWV. Prawdopodobnie wynika to z faktu niedostatecznej liczby populacji scharakteryzowanych szczegółowo pod kątem naczyniowym, a szczególnie pod kątem parametru PWV. W 2011 roku konsorcjum „*International Consortium of Blood Pressure Genome-Wide Association Studies (ICBP-GWAS)*” jako pierwsze opublikowało wyniki badań GWAS dotyczące ciśnienia tętna (PP, ang. *pulse pressure*) oraz średniego ciśnienia tętniczego (MAP, ang. *mean arterial pressure*) (Wain et al., 2011). Ciśnienie tętna i średnie ciśnienie tętnicze są uznane jako parametry mówiące pośrednio o sztywności naczyń i zjawisku przedwczesnego ich starzenia (Nilsson, 2014; Nilsson et al., 2014). Badanie GWAS ujawniło odpowiednio, 5 i 3 nowych *loci* mających związek z PP i MAP. Żaden z genów zlokalizowanych w pobliżu tych miejsc, nie był genem kandydatem dla ciśnienia krwi, niemniej autorzy sugerują mechanizmy związane z regulacją ciśnienia krwi. Dodatkowo, odpowiednio 5 i 19 polimorfizmów SNP, wykazujących wcześniej związek z ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym krwi, wykazało istotny związek z PP i MAP. Niestety żaden z tych polimorfizmów SNP nie został uwzględniony w panelu genotypowanych polimorfizmów SNP w ramach niniejszego projektu (publikacja ukazała się już po ustaleniu listy oznaczanych polimorfizmów SNP). Zatem, w tej chwili nie można porównać czy wyniki tych badań udałoby się zreplikować w badanej populacji chorych.

Niemniej wyniki tych badań potwierdzają tzw. zasadę mendlowskiej randomizacji. Mówi ona m.in. o tym, że warianty genetyczne mające związek z ryzykiem wystąpienia danego fenotypu końcowego, powinny również wykazać związek z fenotypami pośrednimi zwiększającymi ryzyko wystąpienia tego fenotypu końcowego (Burgess i Thompson, 2013; Burgess et al., 2013; Smith i Ebrahim, 2004). Obserwowane zależności prawdopodobnie mogą wynikać ze zjawiska plejotropii, czyli wpływu jednego genu na kilka cech fenotypowych (Freimer i Sabatti, 2007).

Obserwacje te wspierają badania Andreassen et al. (2014), które wykazały wspólne podłoża genetyczne (ang. *genetic overlap*) skurczowego ciśnienia krwi i wskaźnika masy ciała (BMI), stężenia cholesterolu LDL, stosunku obwodu pasa do obwodu bioder (WHR) oraz cukrzycy. Podobnie Olden et al. (2013) wykazali, że polimorfizmy SNP związane z ryzykiem choroby nerek, wykazują również związek z innymi fenotypami

naczyniowymi np. ciśnieniem krwi. Inne wcześniejsze wyniki badań wskazały również na te same rejony chromosomów, które wiążą się z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2, otyłością i chorobą wieńcową. Wszystkie te elementy stanowią elementy zespołu metabolicznego: może to sugerować wspólną genetyczną predyspozycję do rozwinięcia tego fenotypu (Wu et al., 2012).

Sztywność naczyń uznawana jest za złożoną cechę fenotypową, podobnie jak nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca. Jest to cecha częściowo dziedziczna i niezależna od wysokości ciśnienia krwi czy innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. W przypadku parametru PWV dziedziczność tej cechy szacuje się od 26% do 40% (Mitchell et al., 2005; Sayed-Tabatabaei et al., 2005; Seidlerova et al., 2008). Badania populacyjne wskazały również na stosunkowo wysoką dziedziczność ciśnienia krwi (30-50%) (Ehret i Caulfield, 2013; Miall i Oldham, 1963), stężenie cholesterolu LDL (54%), cholesterolu HDL (46%) i stężenia glukozy na czczo (39%) (Asselbergs et al., 2013; Heller et al., 1993; Jermendy et al., 2011), czyli tych czynników, które wykazują związek ze sztywnością naczyń.

Sztywność naczyń można rozważyć zarówno jako fenotyp pośredni, jak i końcowy. Zwiększona sztywność naczyń, oceniana np. na podstawie parametru PWV, jest niezależnym od innych czynników predyktorem zdarzeń sercowo-naczyniowych (Adji et al., 2011; Ben-Shlomo et al., 2014). W tym kontekście sztywność naczyń jest fenotypem pośrednim dla ryzyka wystąpienia zawału serca, udaru czy przewlekłej niewydolności nerek (Laurent i Boutouyrie, 2007b). Jednocześnie wyniki badań wskazują na związek wysokości ciśnienia krwi, zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej, otyłości oraz palenia papierosów itp. na sztywność naczyń (Cavalcante et al., 2011; Laurent i Boutouyrie, 2007b; Nilsson, 2011). W tym kontekście te czynniki można rozpatrywać jako fenotypy pośrednie mające związek z sztywnością naczyń jako fenotypem końcowym.

Biorąc pod uwagę powyższe, wydawało się zasadne postawienie hipotezy, że część polimorfizmów SNP, które w badaniach GWAS wykazały związek z ryzykiem choroby niedokrwiennej serca, zawałem serca czy niewydolnością nerek powinna wykazać również związek ze sztywnością naczyń. Podobnie, te polimorfizmy SNP, które w badaniach GWAS wykazały związek z wysokością ciśnienia krwi, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i lipidowej powinny wykazać również związek ze sztywnością naczyń. Wyniki badań objętych niniejszą rozprawą doktorską okazały się potwierdzać tę hipotezę, co może sugerować na częściowo wspólne podłoże genetyczne sztywności naczyń, chorób sercowo naczyniowych i ich czynników ryzyka.

Polimorfizmy SNP, które zostały włączone do GRS, zarówno w modelu addytywnym surowym, jak i skorygowanym, we wcześniejszych badaniach GWAS wykazywały związek z wysokością ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi (6 SNP), stężeniem cholesterolu HDL (9 SNP) oraz trójglicerydów (3 SNP), ryzykiem choroby niedokrwiennej serca i/lub zawału serca (6 SNP), cukrzycą typu 2 (1 SNP), stężeniem kreatyniny w osoczu (1 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP). W modelu dominującym surowym i skorygowanym, włączone do GRS polimorfizmy SNP były związane z ciśnieniem krwi (6 SNP), ryzykiem choroby niedokrwiennej serca i/lub zawału serca (5 SNP), stężeniem cholesterolu LDL i HDL (odpowiednio 2 i 4 SNP),

stężeniem trójglicerydów (4 SNP), cukrzycą typu 2 i nieprawidłowym stężeniem glukozy na czczo (2 SNP) oraz paleniem tytoniu (1 SNP). W modelu recesywnym surowym i skorygowanym, włączone do GRS polimorfizmy SNP były związane z ciśnieniem krwi (8 SNP), stężeniem cholesterolu HDL i LDL (odpowiednio 5 i 1 SNP), stężeniem trójglicerydów (4 SNP), stężeniem kreatyniny w osoczu (2 SNP), ryzykiem choroby niedokrwiennej serca i/lub zawału serca (2 SNP), paleniem tytoniu oraz syndromem metabolicznym (po 1 SNP).

Analizując współwystępowanie polimorfizmów, można ostrożnie wnioskować, że sztywność naczyń oceniona na podstawie szyjno-udowej prędkości fali tętna PWV, może mieć wspólne podłoże genetyczne z chorobą niedokrwinną serca, zawałem serca oraz tradycyjnymi czynnikami ryzyka tj. ciśnieniem krwi czy zaburzeniami gospodarki lipidowej. Potwierdza to teorię, że tradycyjne czynniki zwiększają ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych poprzez wpływanie na sztywność naczyń.

Niewiele jest jak dotąd wyników badań dotyczących związku polimorfizmów SNP z parametrem PWV, zwłaszcza w populacjach nadciśnieniowych. Do nielicznych opublikowanych wyników należą m.in. Cesana et al. (2013), który w populacji 821 chorych z nadciśnieniem tętniczym, wykazał potencjalny związek 2 z 384 analizowanych SNP (rs300622 i rs2381640) z parametrem PWV. Żaden z tych polimorfizmów SNP nie był uwzględniony na liście oznaczanych polimorfizmów SNP w tej pracy. Z kolei Wang et al. (2013) wykazał związek 4 polimorfizmów SNP z parametrem PWV w chińskiej populacji nadciśnieniowej. Jeden z tych polimorfizmów, rs17249754, okazał się być również istotny w badanej populacji. Nie odnaleziono natomiast żadnych publikacji i doniesień naukowych dotyczących zliczonych punktacji ryzyka genetycznego dla sztywności naczyń i paramteru PWV.

Podsumowując, zaproponowane zliczone punktacje ryzyka wymagają replikacji w innych populacjach, zwłaszcza nadciśnieniowych. Dodatkowo jakość predykcji zaproponowanych modeli (GRS wraz z uwzględnieniem tradycyjnych uznanych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego) w przewidywaniu zjawiska przedwczesnego starzenia oraz zdarzeń sercowo-naczyniowych będzie wymagała długoletniej obserwacji zgromadzonej populacji oraz walidacji w innych populacjach europejskich. Dopiero wtedy będzie można jednoznacznie stwierdzić czy zaproponowane modele poprawiają klasyfikację chorych względem ryzyka oszacowanego za pomocą klasycznych metod takich jak np. skali *Framingham* czy *Score*, a tym samym poprawią skuteczność leczenia chorego.

IX. OGRANICZENIA I ZALETY PRACY

Populacja badana

- + szczególnie scharakteryzowana populacja chorych, zwłaszcza pod względem właściwości ścian dużych naczyń tętniczych
- populacja stosunkowo małoliczna i heterogenna klinicznie

Badanie, którym objęto chorych, jest badaniem prospektywnym (kohortowym), gdzie punktem wyjścia było rozpoznanie pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Badanie prospektywne jest uznane za złoty standard badań nad określonymi czynnikami w ustalonych grupach uczestników w celu sprawdzenia powiązań między tymi czynnikami i aspektami zdrowia lub choroby (Healy, 2006).

Pomimo niewielkiej liczebności populacji badanej (N=853), jej dokładne scharakteryzowanie ściśle według protokołu badania, szczególnie pod względem fenotypów pośrednich, może stanowić o jej sile i zwiększać moc wykonywanych analiz związku pomiędzy polimorfizmami SNP a danymi cechami fenotypowymi (Wong et al., 2003).

Niewątpliwą zaletą zgromadzonej populacji chorych z nadciśnieniem tętniczym jest jej bardzo szczegółowa fenotypizacja. Chorzy zostali poddani badaniom podstawowym i dodatkowym (rozszerzonym) zalecanym przez Polskie i Europejskie Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo dokładna ocena właściwości ścian dużych naczyń tętniczych. U wszystkich chorych, u których nie stwierdzono przeciwwskazań, wykonano badanie sztywności naczyń za pomocą urządzenia SphygmoCor i innowacyjnego systemu ART.LAB (*Esaote, Italy*), który umożliwia ocenę właściwości ścian tętnicy szyjnej w czasie rzeczywistym. Populacja tak szczególnie scharakteryzowana jest unikalna na skalę europejską.

Trudności w przeprowadzanych analizach statystycznych dostarczyła heterogenność badanej populacji chorych pod kątem klinicznym – głównym wspólnym mianownikiem chorych jest rozpoznane pierwotne nadciśnienie tętnicze. Chorzy należą do różnych grup wiekowych, charakteryzują się różnym przebiegiem choroby sercowo-naczyniowej czy zastosowanym leczeniem hipotensyjnym. To wszystko sprawia, że trudno jest porównywać grupy wewnątrz badanej populacji, a rozbieżności w uzyskiwanych wynikach mogą wynikać z szerokiego zakresu obserwowanych objawów. Być może jest to również powód, dla którego pewne zmienne, pomimo przewidywań, nie wykazały związku ze sztywnością naczyń przy budowie modelu skorygowanego. Przykładem może być informacja o zaburzeniach gospodarki węglowodanowej (cukrzyca typu 1 i 2), która okazała się nie mieć istotnego wpływu na parametr PWV, a dodatkowo znak współczynnika równania regresji wskazywał na przeciwną zależność tj. chorzy bez stwierdzonej cukrzycy mieli wyższe wartości PWV (większą sztywność naczyń) niż z cukrzycą. Takie obserwacje mogą wynikać z faktu zastosowanego intensywnego leczenia, które może modyfikować m.in. właściwości ścian tętnic. Może to być zjawisko podobnie do obserwowanego paradoksu, że chorzy z rozpoznanym i leczonym zespołem metabolicznym wykazują mniejszą śmiertelność z powodów sercowo-naczyniowych niż chorzy jedynie z jednym/dwoma składnikami

zespołu metabolicznego (Ghoorah et al., 2014; Carnethon et al., 2014). Podobnie zmienna niosąca informację o stężeniu cholesterolu LDL czy HDL nie okazała się być tak istotna jak zmienna jakościowa mówiąca o rozpoznaniu dyslipidemii. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że chorzy z dyslipidemią przyjmują leki hipolipemizujące np. statyny, a rejestrowane stężenia cholesterolu LDL są zaniżone. Dodatkowo, ponieważ statyny mają działanie plejotropowe, mogą wpływać również na właściwości ścian naczyń tętniczych, redukując ich sztywność (Kanaki et al., 2013).

Inną słabą stroną zgromadzonych danych jest jak dotąd obserwacja populacji w jednym punkcie czasowym (ang. *baseline*). Uniemożliwia to weryfikację zdolności predykcyjnych skonstruowanych zliczonych punktacji ryzyka genetycznego GRS w tej populacji chorych. Niemniej replikacja i walidacja zaproponowanych GRS jest możliwa i planowana na podstawie danych populacyjnych zgromadzonych przez naszych partnerów skandynawskich. Niezależnie jednak od tego po uzyskaniu środków finansowych Zakład Nadciśnienia Tętniczego planuje rozszerzyć liczebność obserwowanej populacji chorych oraz wykonać powtórny obserwację już włączonych chorych w drugim punkcie czasowym.

Zastosowane techniki analizy statystycznej

- + techniki liniowe – łatwość i wygoda budowy, interpretacji oraz wykorzystania modeli
- brak uwzględnienia interakcji pomiędzy polimorfizmami SNP i czynnikami środowiskowymi

Sztywność naczyń można uznać za chorobę złożoną, dla której można przyjąć poligeniczny model choroby. W takim modelu zakłada się wpływ na daną cechę dużej liczby genów o małym efekcie działania oraz interakcję pomiędzy nimi. Dodatkowo należy uwzględnić wpływ czynników środowiskowych, które mogą modulować ekspresję genów i ich wzajemne oddziaływania. Badaniach nad chorobami złożonymi są szczególnie trudne metodologicznie, gdyż trudno jest zaobserwować prosty związek pomiędzy fenotypem a genotypem. W niniejszym badaniu zastosowano jedną z prostszych technik łącznej analizy związku polimorfizmów SNP z parametrem PWV, konstruując zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS. Uwzględniono również wpływ niektórych czynników zakłócających. Nie wzięto jednak pod uwagę interakcji pomiędzy polimorfizmami SNP, modyfikacji ich efektu działania przez czynniki środowiskowe oraz wpływu stosowanego leczenia farmakologicznego. Doniesienia naukowe ostatnich lat dowodzą, że związki takie na pewno istnieją. Udowodniono np. że regularny wysiłek fizyczny i nawyki żywieniowe (niskie spożycie alkoholu i soli) wiąże się z redukcją sztywności naczyń (Laurent et al., 2006). Guessous et al. (2012) wykazał z kolei, że związek polimorfizmu SNP zlokalizowanego w genie *CYP1A2* z ciśnieniem krwi jest modyfikowany przez ilość spożywanej kofeiny zawartej w kawie. Podobnie, Iemitsu et al. (2008) wykazał, że polimorfizm SNP w genie *ANP* wpływa na stopień redukcji sztywności naczyń w odpowiedzi na regularny wysiłek fizyczny w populacji osób w średnim i starszym wieku.

Zastosowanie liniowych technik analizy jest jednocześnie wadą i zaletą. Wszystkie złożone zjawiska biologiczne, których modele chcemy budować, są w rzeczywistości w mniejszym lub większym stopniu nieliniowe. Często jednak do ich opisu stosowane są techniki liniowe, ponieważ ich budowa, interpretacja i wykorzystanie jest szczególnie łatwe i wygodne. Model ma dobrze reprezentować generalną tendencję w zbiorze danych, chociaż dopasowanie liniowe jest trudne ze względu na subtelności danych medycznych.

Biorąc powyższe pod uwagę, w dalszych analizach należałoby uwzględnić inne techniki analiz, uwzględniające interakcje pomiędzy polimorfizmami SNP oraz czynnikami środowiskowymi czy klinicznymi oraz biorące pod uwagę możliwość nieliniowych zależności pomiędzy analizowanymi zmiennymi. Bardzo obiecującym kierunkiem wydaje się być zastosowanie metod wywodzących się z uczenia maszynowego (ang. *machine learning*) i eksploracji danych (ang. *data mining*), które poszukują w zgromadzonych danych pewnych struktur i prawidłowości. Metody te również mogą okazać się bardzo przydatne przy rozwiązaniu tzw. „*large p small n problem*” tj. zmniejszeniu wielowymiarowości macierzy danych i selekcji najbardziej istotnych predyktorów do opisu modelowanej zmiennej (Johnstone i Titterington, 2009; Zhang et al., 2008).

Jakość zgromadzonych danych

- + stosunkowo niewiele brakujących danych w macierzy
- prawdopodobna niepełnowartościowość danych

Analiza związku polimorfizmów SNP z parametrami opisującymi właściwości ścian dużych tętnic (np. parametr PWV) może być utrudniona ze względu na potencjalną niepełnowartościowość danych tworzących zbiór danych. Niepełnowartościowość może przejawiać się tym, że odpowiednie dane są w odpowiednim zbiorze (tj. uczącym i testowym), ale nie wnoszą tak wiele informacji, jak powinny np. wartości zmiennych mogą być zniekształcone przez występujące szумы. Jest to dość typowe zjawisko przy gromadzeniu danych medycznych dla dużych kohort chorych, gdzie do pracy zaangażowanych jest wiele osób personelu badawczego. Dodatkowo wszystkie możliwe istotne zdarzenia mogą nie być wystarczająco licznie reprezentowane w zbiorze uczącym i testowym. Przykładowo stosunkowo mała liczebność grupy chorych z rozpoznaną cukrzycą oraz palących może powodować obciążoną estymację współczynników równania regresji (co prawdopodobnie obserwowano w analizach objętych niniejszą rozprawą doktorską). Potencjalnym problemem może być także brak równowagi w zbiorze danych, czyli niezapewnienie odpowiedniej proporcji poszczególnych typów danych w zbiorze uczącym. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę możliwość występowania błędów w gromadzeniu danych, będących skutkiem „czynnika ludzkiego”. Badanie prowadzone w jednym ośrodku jest podatne na zniekształcenia informacji o gromadzonej kohorcie chorych ze względu na np. nawyki i umiejętności personelu, powtarzalne błędy np. laboratoryjne (Mattingly i Ponsonby, 2014). Nie zastosowano również szczegółowego i walidowanego kwestionariusza wywiadu dotyczącego stylu życia np. palenia papierosów czy aktywności fizycznej, co

znacznie utrudni ocenę interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi a środowiskowymi.

X. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena związku polimorfizmów SNP z właściwościami ścian dużych tętnic ocenianymi na podstawie pomiaru udowo-szyjnej prędkości fali tętna (PWV) oraz zaproponowanie modeli przewidujących ryzyko przedwczesnego starzenia naczyń tętniczych i ryzyka sercowo-naczyniowego. Cel ten osiągnięto poprzez realizację celów szczegółowych:

1. Zidentyfikowano polimorfizmy SNP, które wyjaśniły w sposób istotny zmienność parametru PWV. Polimorfizmy te wyjaśniły od 0,24% do 1,14% zmienności PWV. Dodatkowo wyselekcjonowano 4 polimorfizmy SNP, które mogą być potencjalnymi biomarkerami zwiększonego ryzyka wystąpienia pierwotnego nadciśnienia tętniczego.
2. Na podstawie wyselekcjonowanych polimorfizmów SNP skonstruowano zliczone punktacje ryzyka genetycznego GRS, które sumują efekt pojedynczych polimorfizmów SNP. Potwierdzono, że wraz ze wzrostem liczby punktacji ryzyka genetycznego, wzrasta średnia wartość parametru PWV. W większości przypadków zależność taka przypomina liniową.
3. Potwierdzono, że zliczone punktacje ryzyka genetycznego wyjaśniają większą część zmienności parametru PWV niż każdy z polimorfizmów SNP osobno. Procent wyjaśnionej zmienności wahał się w granicach od 1,92% (dla modelu surowego w dziedziczeniu recesywnym) do 8,42% (dla modelu surowego w dziedziczeniu addytywnym).
4. Na podstawie skonstruowanych zliczonych punktacji ryzyka genetycznego i/lub klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego zaproponowano model szacujący ryzyko syndromu przedwczesnego starzenia naczyniowego ocenianego na podstawie parametru PWV oraz model szacujący ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych

Wnioski końcowe:

1. Największą część zmienności cech fenotypowych wyjaśniają czynniki środowiskowe, niemniej polimorfizmy SNP mogą pomóc w wyjaśnieniu pozostałej zmienności. W pracy tej czynniki środowiskowe wyjaśniły ok. 41,41% zmienności parametru PWV: wiek (ok. 33,08%), całodobowe ciśnienie tętna PPdn (ok. 2,63%) oraz szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR, stosunek obwodu pasa do obwodu bioder WHR oraz płeć (łącznie ok. 5,73%).
2. Polimorfizmy SNP, które wykazały istotny ($p < 0,05$) lub sugestywny ($p < 0,1$) związek z parametrem PWV, są związane zarówno z tradycyjnymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, jak i samym ryzykiem zdarzenia sercowo-naczyniowego (tj. choroby niedokrwiennej serca i/lub zawału serca). Potwierdza

to hipotezę, że różne fenotypy sercowo-naczyniowe mogą być manifestacją kliniczną częściowo wspólnego podłoża genetycznego, a sztywność naczyń można traktować zarówno jako fenotyp pośredni dla zdarzeń sercowo-naczyniowych, jak i fenotyp końcowy będący konsekwencją związku z tradycyjnymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego.

3. Najlepiej dopasowanym modelem dziedziczenia dla analizowanych polimorfizmów SNP był model addytywny i dominujący. W kontynuacji badań należy rozważyć analizę głównie w tych dwóch modelach dziedziczenia, lub wziąć pod uwagę możliwość zastosowania modeli mieszanych (np. model łączący dziedziczenie addytywne i dominujące), co może zwiększyć moc statystyczną testu.
4. Niezależnie od postaci modelu tj. surowego czy skorygowanego w danym modelu genetycznym współwystępowały te same polimorfizmy SNP. Może to być bardzo cenna informacja, która pozwoli skonstruować na dalszym etapie badań punktację ryzyka genetycznego (GRS) przewidującą wartość PWV (a tym samym ryzyko syndromu przedwczesnego starzenia naczyniowego) niezależnie od wpływu zmiennych zakłócających np. wieku, ciśnienia tętniczego krwi czy funkcji nerek.
5. Zliczone punktacje ryzyka genetycznego (GRS) okazały się przydatnym narzędziem sumującym łączny efekt polimorfizmów SNP na cechę fenotypową jaką jest sztywność naczyń oceniona na podstawie parametru PWV. Wraz ze wzrostem zliczonej punktacji ryzyka genetycznego obserwowano wzrost średniej wartości parametru PWV. Wspiera to hipotezę, że wraz z kumulacją niekorzystnych alleli, wzrasta ryzyko rozwinięcia danego fenotypu np. ryzyko syndromu przedwczesnego starzenia naczyniowego.
6. Replikacja i walidacja zaproponowanych modeli predykcyjnych pozwoli potwierdzić czy zliczone punktacje ryzyka genetycznego wiążą się niezależnie z ryzykiem przedwczesnego starzenia naczyń ocenianego na podstawie parametru PWV oraz ryzykiem sercowo-naczyniowym. I jeśli tak, to czy zmieniają klasyfikację chorego pod względem ryzyka i rokowania w kilkuletniej perspektywie.

XI. PIŚMIENNICTWO

1. Abraham, D., and Dashwood, M. (2008). Endothelin--role in vascular disease. *Rheumatology (Oxford)* 47 *Suppl* 5, v23–24.
2. Adji, A., O'Rourke, M.F., and Namasivayam, M. (2011). Arterial stiffness, its assessment, prognostic value, and implications for treatment. *Am. J. Hypertens.* 24, 5–17.
3. AlGhatrif, M., Strait, J.B., Morrell, C.H., Canepa, M., Wright, J., Elango, P., Scuteri, A., Najjar, S.S., Ferrucci, L., and Lakatta, E.G. (2013). Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension* 62, 934–941.
4. Amar, J., Ruidavets, J.B., Chamontin, B., Drouet, L., and Ferrières, J. (2001). Arterial stiffness and cardiovascular risk factors in a population-based study. *J. Hypertens.* 19, 381–387.
5. Andersson, N., Strandberg, L., Nilsson, S., Adamovic, S., Karlsson, M.K., Ljunggren, O., Mellstrom, D., Lane, N.E., Zmuda, J.M., Nielsen, C., et al. (2010). A Variant near the Interleukin-6 Gene Is Associated with Fat Mass in Caucasian Men. *Int J Obes (Lond)* 34, 1011–1019.
6. Andreassen, O.A., McEvoy, L.K., Thompson, W.K., Wang, Y., Reppe, S., Schork, A.J., Zuber, V., Barrett-Connor, E., Gautvik, K., Aukrust, P., et al. (2014). Identifying common genetic variants in blood pressure due to polygenic pleiotropy with associated phenotypes. *Hypertension* 63, 819–826.
7. Ashley, E.A., Butte, A.J., Wheeler, M.T., Chen, R., Klein, T.E., Dewey, F.E., Dudley, J.T., Ormond, K.E., Pavlovic, A., Morgan, A.A., et al. (2010). Clinical assessment incorporating a personal genome. *Lancet* 375, 1525–1535.
8. Asselbergs, F.W., Lovering, R.C., and Drenos, F. (2013). Progress in genetic association studies of plasma lipids. [Miscellaneous Article]. *Current Opinion in Lipidology* April 2013 24, 123–128.
9. Attia, J., Thakkinstian, A., and D'Este, C. (2003). Meta-analyses of molecular association studies: methodologic lessons for genetic epidemiology. *J Clin Epidemiol* 56, 297–303.
10. Backer, G.D., Graham, I., and Cooney, M.-T. (2012). Do novel biomarkers add to existing scores of total cardiovascular risk? *European Journal of Preventive Cardiology* 19, 14–17.
11. Baker, M., Rahman, T., Hall, D., Avery, P.J., Mayosi, B.M., Connell, J.M.C., Farrall, M., Watkins, H., and Keavney, B. (2007). The C-532T polymorphism of the angiotensinogen gene is associated with pulse pressure: a possible explanation for heterogeneity in genetic association studies of AGT and hypertension. *Int J Epidemiol* 36, 1356–1362.

12. Baldwin, A.K., Simpson, A., Steer, R., Cain, S.A., and Kielty, C.M. (2013). Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med* 15, e8.
13. Balkestein, E.J., Wang, J.G., Struijker-Boudier, H.A.J., Barlassina, C., Bianchi, G., Birkenhager, W.H., Brand, E., Den Hond, E., Fagard, R., Herrmann, S.-M., et al. (2002). Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population. *Journal of Hypertension* August 2002 20, 1551–1561.
14. Bancroft, E.K. (2013). How advances in genomics are changing patient care. *Nurs. Clin. North Am.* 48, 557–569.
15. Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., and Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 4–12.
16. Becker, K.G. (2004). The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med. Hypotheses* 62, 309–317.
17. Beilby, J.P., Chapman, C.M.L., Palmer, L.J., McQuillan, B.M., Thompson, P.L., and Hung, J. (2005). Stromelysin-1 (MMP-3) gene 5A/6A promoter polymorphism is associated with blood pressure in a community population. *J. Hypertens.* 23, 537–542.
18. Benetos, A., Topouchian, J., Ricard, S., Gautier, S., Bonnardeaux, A., Asmar, R., Poirier, O., Soubrier, F., Safar, M., and Cambien, F. (1995). Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 26, 44–47.
19. Benetos, A., Gautier, S., Ricard, S., Topouchian, J., Asmar, R., Poirier, O., Larosa, E., Guize, L., Safar, M., Soubrier, F., et al. (1996). Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 94, 698–703.
20. Benetos, A., Giron, A., Joly, L., Temmar, M., Nzietchueng, R., Pannier, B., Bean, K., Thomas, F., Labat, C., and Lacolley, P. (2013). Influence of the AGTR1 A1166C genotype on the progression of arterial stiffness: A 16-year longitudinal study. *Am. J. Hypertens.* 26, 1421–1427.
21. Bhuiyan, A.R., Chen, W., Srinivasan, S.R., Rice, J.C., Mock, N.B., Tang, R., Gene Bond, M., Boerwinkle, E., and Berenson, G.S. (2008). Interaction of G-protein beta3 subunit and nitric oxide synthase gene polymorphisms on carotid artery intima-media thickness in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Am. J. Hypertens.* 21, 917–921.
22. Biery, N.J., Eldadah, Z.A., Moore, C.S., Stetten, G., Spencer, F., and Dietz, H.C. (1999). Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics* 56, 70–77.
23. Blacher, J., Kakou, A., Lacombe, J.-M., and Safar, M.E. (2010). Preferential association of aldosterone synthase gene polymorphism with central blood

- pressure and wave reflections in hypertensive individuals. *J Hum Hypertens* 24, 291–299.
24. Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Poirier, O., Bickel, C., Smieja, M., Hafner, G., Meyer, J., Cambien, F., Tiret, L., and AtheroGene Investigators (2003). Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107, 1579–1585.
 25. Bochud, M. (2012). Genetics for clinicians: from candidate genes to whole genome scans (technological advances). *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 119–132.
 26. Boutouyrie, P., Tropeano, A.I., Asmar, R., Gautier, I., Benetos, A., Lacolley, P., and Laurent, S. (2002). Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of Primary Coronary Events in Hypertensive Patients A Longitudinal Study. *Hypertension* 39, 10–15.
 27. Bozec, E., Lacolley, P., Bergaya, S., Boutouyrie, P., Meneton, P., Herissé-Légrand, M., Boulanger, C.M., Alhenc-Gelas, F., Kim, H.-S., Laurent, S., et al. (2004). Arterial stiffness and angiotensinogen gene in hypertensive patients and mutant mice. *J. Hypertens.* 22, 1299–1307.
 28. Briet, M., Boutouyrie, P., Laurent, S., and London, G.M. (2012). Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD. *Kidney Int.* 82, 388–400.
 29. Brull, D.J., Murray, L.J., Boreham, C.A., Ralston, S.H., Montgomery, H.E., Gallagher, A.M., McGuigan, F.E., Davey Smith, G., Savage, M., Humphries, S.E., et al. (2001). Effect of a COL1A1 Sp1 binding site polymorphism on arterial pulse wave velocity: an index of compliance. *Hypertension* 38, 444–448.
 30. Burgess, S., and Thompson, S.G. (2013). Use of allele scores as instrumental variables for Mendelian randomization. *Int J Epidemiol* 42, 1134–1144.
 31. Burgess, S., Butterworth, A., and Thompson, S.G. (2013). Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. *Genet. Epidemiol.* 37, 658–665.
 32. Busjahn, A., Aydin, A., Uhlmann, R., Krasko, C., Bähring, S., Szelestei, T., Feng, Y., Dahm, S., Sharma, A.M., Luft, F.C., et al. (2002). Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase (SGK1) Gene and Blood Pressure. *Hypertension* 40, 256–260.
 33. Carnethon, M.R., Rasmussen-Torvik, L.J., and Palaniappan, L. (2014). The obesity paradox in diabetes. *Curr Cardiol Rep* 16, 446.
 34. Cattan, V., Kakou, A., Louis, H., and Lacolley, P. (2006). Pathophysiology, genetic, and therapy of arterial stiffness. *Biomed Mater Eng* 16, S155–161.
 35. Cavalcante, J.L., Lima, J.A.C., Redheuil, A., and Al-Mallah, M.H. (2011). Aortic Stiffness: Current Understanding and Future Directions. *Journal of the American College of Cardiology* 57, 1511–1522.

36. Cecelja, M., and Chowienczyk, P. (2012). Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *J R Soc Med Cardiovasc Dis* 1.
37. Cesana, F., Nava, S., Menni, C., Boffi, L., Varrenti, M., Meani, P., Maloberti, A., Grassi, G., Giannattasio, C., and Mancia, G. (2013). Does the 9p region affect arterial stiffness? Results from a cohort of hypertensive individuals. *Blood Pressure* 22, 302–306.
38. Chambers, J.C., Zhang, W., Lord, G.M., van der Harst, P., Lawlor, D.A., Sehmi, J.S., Gale, D.P., Wass, M.N., Ahmadi, K.R., Bakker, S.J.L., et al. (2010). Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 42, 373–375.
39. Chambers, J.C., Zhang, W., Sehmi, J., Li, X., Wass, M.N., Van der Harst, P., Holm, H., Sanna, S., Kavousi, M., Baumeister, S.E., et al. (2011). Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat. Genet.* 43, 1131–1138.
40. Chen, W., Srinivasan, S.R., Bond, M.G., Tang, R., Urbina, E.M., Li, S., Boerwinkle, E., and Berenson, G.S. (2004). Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: The Bogalusa Heart Study. *Am. J. Hypertens.* 17, 553–559.
41. Chue, C.D., Townend, J.N., Steeds, R.P., and Ferro, C.J. (2010). Republished paper: Arterial stiffness in chronic kidney disease: causes and consequences. *Postgrad Med J* 86, 560–566.
42. Conen, D., Cheng, S., Steiner, L.L., Buring, J.E., Ridker, P.M., and Zee, R.Y.L. (2009). Association of 77 Polymorphisms in 52 Candidate Genes with Blood Pressure Progression and Incident Hypertension: The Women's Genome Health Study. *J Hypertens* 27, 476–483.
43. Conroy, R.M., Pyörälä, K., Fitzgerald, A.P., Sans, S., Menotti, A., Backer, G.D., Bacquer, D.D., Ducimetière, P., Jousilahti, P., Keil, U., et al. (2003). Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24, 987–1003.
44. Cordell, H.J., and Clayton, D.G. (2005). Genetic association studies. *The Lancet* 366, 1121–1131.
45. Curran-Everett, D. (2000). Multiple comparisons: philosophies and illustrations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1–8.
46. Davies, K. (2013). The era of genomic medicine. *Clin Med* 13, 594–601.
47. Dellings, L., Wahlstrand, B., Niklasson, A., Stenlof, K., Orho-Melander, M., Melander, O., Narkiewicz, and Hedner, T.L. (2008). Association between an estrogen receptor alpha polymorphism (ERA : rs2234693) and the metabolic syndrome and cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality. (Berlin: Journal of Hypertension), pp. S341–S341.

48. Dima, I., Vlachopoulos, C., Alexopoulos, N., Baou, K., Vasiliadou, C., Antoniadis, C., Aznaouridis, K., Stefanadi, E., Tousoulis, D., and Stefanadis, C. (2008). Association of arterial stiffness with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in healthy individuals. *Am. J. Hypertens.* 21, 1354–1358.
49. Dosenko, V.I., Zahoriĭ, V.I., Moĭbenko, O.O., and Parkhomenko, O.M. (2002). [Pathophysiologic aspects of endothelial NO-synthase genetic polymorphism]. *Fiziol Zh* 48, 86–102.
50. Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., et al. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 42, 105–116.
51. Dzida, G. (2004). [Pharmacogenetics--new perspectives in the treatment of cardiovascular diseases]. *Kardiol Pol* 60, 304–308.
52. Eeles, R.A., Kote-Jarai, Z., Giles, G.G., Olama, A.A.A., Guy, M., Jugurnauth, S.K., Mulholland, S., Leongamornlert, D.A., Edwards, S.M., Morrison, J., et al. (2008). Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 40, 316–321.
53. Ehret, G.B., and Caulfield, M.J. (2013). Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. *Eur Heart J* 34, 951–961.
54. Ehret, G.B., Munroe, P.B., Rice, K.M., Bochud, M., Johnson, A.D., Chasman, D.I., Smith, A.V., Tobin, M.D., Verwoert, G.C., Hwang, S.-J., et al. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478, 103–109.
55. Erdmann, J., Grosshennig, A., Braund, P.S., König, I.R., Hengstenberg, C., Hall, A.S., Linsel-Nitschke, P., Kathiresan, S., Wright, B., Trégouët, D.-A., et al. (2009). New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat. Genet.* 41, 280–282.
56. Faergeman, O. (2013). Genes and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 34, 949–950.
57. Farfel, Z., Bourne, H.R., and Iiri, T. (1999). The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J. Med.* 340, 1012–1020.
58. Fava, C., Danese, E., Montagnana, M., Sjögren, M., Almgren, P., Engström, G., Nilsson, P., Hedblad, B., Guidi, G.C., Minuz, P., et al. (2011). Serine/threonine kinase 39 is a candidate gene for primary hypertension especially in women: results from two cohort studies in Swedes. *J. Hypertens.* 29, 484–491.
59. Fisher, R.A. (1919). XV.—The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 52, 399–433.
60. Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010).

Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–1125.

61. Franklin, S.S. (2008). Beyond blood pressure: Arterial stiffness as a new biomarker of cardiovascular disease. *J Am Soc Hypertens* 2, 140–151.
62. Freeman, G.H., and Halton, J.H. (1951). Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance. *Biometrika* 38, 141–149.
63. Freimer, N.B., and Sabatti, C. (2007). Human genetics: variants in common diseases. *Nature* 445, 828–830.
64. Galis, Z.S., Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J.M., Senior, R.M., and Ivan, E. (2002). Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ. Res.* 91, 852–859.
65. Gardier, S., Vincent, M., Lantelme, P., Rial, M.-O., Bricca, G., and Milon, H. (2004). A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor, blood pressure and arterial stiffness in hypertension. *J. Hypertens.* 22, 2135–2142.
66. Gasecki, D., Rojek, A., Kwarciany, M., Kubach, M., Boutouyrie, P., Nyka, W., Laurent, S., and Narkiewicz, K. (2012). Aortic stiffness predicts functional outcome in patients after ischemic stroke. *Stroke* 43, 543–544.
67. Gąsecki, D., Rojek, A., Kwarciany, M., Kowalczyk, K., Boutouyrie, P., Nyka, W., Laurent, S., and Narkiewicz, K. (2012). Pulse wave velocity is associated with early clinical outcome after ischemic stroke. *Atherosclerosis* 225, 348–352.
68. Gerritsen, M.E. (2005). Genetic variations in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase and their contributions to human disease. *Microcirculation* 12, 129–140.
69. Ghoorah, K., Campbell, P., Kent, A., Maznyczka, A., and Kunadian, V. (2014). Obesity and cardiovascular outcomes: a review. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.*
70. Glagov, S., Zarins, C., Giddens, D.P., and Ku, D.N. (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 1018–1031.
71. Gomez-Ramirez, J., and Sanz, R. (2013). On the limitations of standard statistical modeling in biological systems: A full Bayesian approach for biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 113, 80–91.
72. Graham, I., Atar, D., Borch-Johnsen, K., Boysen, G., Burell, G., Cifkova, R., Dallongeville, J., De Backer, G., Ebrahim, S., Gjelsvik, B., et al. (2007). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in

- Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur. Heart J.* 28, 2375–2414.
73. Greenwald, S.E. (2007). Ageing of the conduit arteries. *J. Pathol.* 211, 157–172.
 74. Guessous, I., Dobrinas, M., Kutalik, Z., Pruijm, M., Ehret, G., Maillard, M., Bergmann, S., Beckmann, J.S., Cusi, D., Rizzi, F., et al. (2012). Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3283–3292.
 75. Hamacher, S., Matern, S., and Roeb, E. (2004). Extracellular matrix - from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 129, 1976–1980.
 76. Hanon, O., Luong, V., Mourad, J.J., Bortolotto, L.A., Jeunemaitre, X., and Girerd, X. (2001). Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. *Hypertension* 38, 1185–1189.
 77. Healy, D.G. (2006). Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *Lancet Neurol* 5, 701–707.
 78. Helgadóttir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdóttir, S., Blondal, T., Jonasdóttir, A., Jonasdóttir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., et al. (2007). A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316, 1491–1493.
 79. Heller, D.A., de Faire, U., Pedersen, N.L., Dahlén, G., and McClearn, G.E. (1993). Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N. Engl. J. Med.* 328, 1150–1156.
 80. Heltianu, C., Costache, G., Gafencu, A., Diaconu, M., Bodeanu, M., Cristea, C., Azibi, K., Poenaru, L., and Simionescu, M. (2005). Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 135–142.
 81. Hlubočká, Z., Jáchymová, M., Heller, S., Umnerová, V., Danzig, V., Lánská, V., Horký, K., and Linhart, A. (2009). Association of the -344T/C aldosterone synthase gene variant with essential hypertension. *Physiol Res* 58, 785–792.
 82. Horne, B.D., Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Muhlestein, J.B., Renlund, D.G., Bair, T.L., Pearson, R.R., and Camp, N.J. (2005). Generating genetic risk scores from intermediate phenotypes for use in association studies of clinically significant endpoints. *Ann. Hum. Genet.* 69, 176–186.
 83. Humphrey, R., Guazzi, M., and Niebauer, J. (2014). Cardiac rehabilitation in Europe. *Prog Cardiovasc Dis* 56, 551–556.
 84. Hunter, D.J. (2005). Gene-environment interactions in human diseases. *Nat. Rev. Genet.* 6, 287–298.

85. Iemitsu, M., Maeda, S., Otsuki, T., Sugawara, J., Kuno, S., Ajisaka, R., and Matsuda, M. (2008). Arterial Stiffness, Physical Activity, and Atrial Natriuretic Peptide Gene Polymorphism in Older Subjects. *Hypertens Res* 31, 767–774.
86. Ingelsson, E., Syvänen, A.-C., and Lind, L. (2008). Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and endothelial function in resistance and conduit arteries in the elderly. *Atherosclerosis* 199, 162–171.
87. Janssens, A.C.J.W., Ioannidis, J.P.A., van Duijn, C.M., Little, J., Khoury, M.J., and for the GRIPS Group (2011). Strengthening the Reporting of Genetic Risk Prediction Studies: The GRIPS Statement. *PLoS Med* 8, e1000420.
88. Jermendy, G., Littvay, L., Steinbach, R., Jermendy, A., Tárnoki, A., Tárnoki, D., Métneki, J., and Osztoivits, J. (2011). [Heritability of the risk factors characteristic for the metabolic syndrome: a twin study]. *Orv Hetil* 152, 1265–1271.
89. Jerrard-Dunne, P., Mahmud, A., Zhou, S., and Feely, J. (2007). Influence of the G-protein β -3 subunit gene C825 T polymorphism on the clinical phenotype of newly diagnosed essential hypertension. *J Hum Hypertens* 21, 421–423.
90. Jin, J.J., Nakura, J., Wu, Z., Yamamoto, M., Abe, M., Tabara, Y., Yamamoto, Y., Igase, M., Kohara, K., and Miki, T. (2003). Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 41, 163–167.
91. Johansson, L.E., Lindblad, U., Larsson, C.A., Råstam, L., and Ridderstråle, M. (2008). Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity. *Eur J Endocrinol* 159, 577–583.
92. Johnstone, I.M., and Titterton, D.M. (2009). Statistical challenges of high-dimensional data. *Phil. Trans. R. Soc. A* 367, 4237–4253.
93. Kanaki, A.I., Sarafidis, P.A., Georgianos, P.I., Kanavos, K., Tziolas, I.M., Zebekakis, P.E., and Lasaridis, A.N. (2013). Effects of low-dose atorvastatin on arterial stiffness and central aortic pressure augmentation in patients with hypertension and hypercholesterolemia. *Am. J. Hypertens.* 26, 608–616.
94. Kathiresan, S., Voight, B.F., Purcell, S., Musunuru, K., Ardissino, D., Mannucci, P.M., Anand, S., Engert, J.C., Samani, N.J., Schunkert, H., et al. (2009a). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat. Genet.* 41, 334–341.
95. Kathiresan, S., Willer, C.J., Peloso, G.M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E.E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y., Tanaka, T., et al. (2009b). Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* 41, 56–65.
96. Kessler, T., and Schunkert, H. (2012). Clinical validation of genetic markers for improved risk estimation. *European Journal of Preventive Cardiology* 19, 25–32.
97. Khaleghi, M., and Kullo, I.J. (2007). Genetic markers of vascular aging. *Biomark Med* 1, 453–465.

98. Khoury, M.J., McBride, C.M., Schully, S.D., Ioannidis, J.P.A., Feero, W.G., Janssens, A.C.J.W., Gwinn, M., Simons-Morton, D.G., Bernhardt, J.M., Cargill, M., et al. (2009a). The Scientific Foundation for personal genomics: recommendations from a National Institutes of Health-Centers for Disease Control and Prevention multidisciplinary workshop. *Genet. Med.* *11*, 559–567.
99. Khoury, M.J., Feero, W.G., Reyes, M., Citrin, T., Freedman, A., Leonard, D., Burke, W., Coates, R., Croyle, R.T., Edwards, K., et al. (2009b). The genomic applications in practice and prevention network. *Genet. Med.* *11*, 488–494.
100. Kielty, C.M., Wess, T.J., Haston, L., Ashworth, J.L., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *23*, 581–596.
101. Kielty, C.M., Sherratt, M.J., Marson, A., and Baldock, C. (2005). Fibrillin microfibrils. *Adv. Protein Chem.* *70*, 405–436.
102. Kingwell, B., and Boutouyrie, P. (2007). Genetic influences on the arterial wall. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *34*, 652–657.
103. Kong, A., Steinthorsdottir, V., Masson, G., Thorleifsson, G., Sulem, P., Besenbacher, S., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Kristinsson, K.T., Jonasdottir, A., et al. (2009). Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature* *462*, 868–874.
104. Korhonen, P.E., Kautiainen, H., Järvenpää, S., and Kantola, I. (2013). Target organ damage and cardiovascular risk factors among subjects with previously undiagnosed hypertension. *European Journal of Preventive Cardiology* 2047487312474530.
105. Köttgen, A., Glazer, N.L., Dehghan, A., Hwang, S.-J., Katz, R., Li, M., Yang, Q., Gudnason, V., Launer, L.J., Harris, T.B., et al. (2009). Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* *41*, 712–717.
106. Kraft, P., and Hunter, D. (2005). Integrating epidemiology and genetic association: the challenge of gene–environment interaction. *Phil. Trans. R. Soc. B* *360*, 1609–1616.
107. Lacolley, P., Gautier, S., Poirier, O., Pannier, B., Cambien, F., and Benetos, A. (1998). Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J. Hypertens.* *16*, 31–35.
108. Lacolley, P., Challande, P., Osborne-Pellegrin, M., and Regnault, V. (2009). Genetics and pathophysiology of arterial stiffness. *Cardiovasc Res* *81*, 637–648.
109. Lajemi, M., Labat, C., Gautier, S., Lacolley, P., Safar, M., Asmar, R., Cambien, F., and Benetos, A. (2001a). Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. *J. Hypertens.* *19*, 407–413.

110. Lajemi, M., Gautier, S., Poirier, O., Baguet, J.P., Mimran, A., Gosse, P., Hanon, O., Labat, C., Cambien, F., and Benetos, A. (2001b). Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives. *Am. J. Hypertens.* *14*, 755–760.
111. Lango Allen, H., Estrada, K., Lettre, G., Berndt, S.I., Weedon, M.N., Rivadeneira, F., Willer, C.J., Jackson, A.U., Vedantam, S., Raychaudhuri, S., et al. (2010). Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* *467*, 832–838.
112. Laurent, S., and Boutouyrie, P. (2007a). Recent Advances in Arterial Stiffness and Wave Reflection in Human. *Hypertension* *49*, 1202–1206.
113. Laurent, S., and Boutouyrie, P. (2007b). Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J. Nephrol.* *20 Suppl 12*, S45–50.
114. Laurent, S., Boutouyrie, P., Asmar, R., Gautier, I., Laloux, B., Guize, L., Ducimetiere, P., and Benetos, A. (2001). Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Hypertensive Patients. *Hypertension* *37*, 1236–1241.
115. Laurent, S., Katsahian, S., Fassot, C., Tropeano, A.-I., Gautier, I., Laloux, B., and Boutouyrie, P. (2003a). Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of Fatal Stroke in Essential Hypertension. *Stroke* *34*, 1203–1206.
116. Laurent, S., Katsahian, S., Fassot, C., Tropeano, A.-I., Gautier, I., Laloux, B., and Boutouyrie, P. (2003b). Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* *34*, 1203–1206.
117. Laurent, S., Cockcroft, J., Bortel, L.V., Boutouyrie, P., Giannattasio, C., Hayoz, D., Pannier, B., Vlachopoulos, C., Wilkinson, I., and Struijker-Boudier, H. (2006). Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* *27*, 2588–2605.
118. Laurent, S., Alivon, M., Beaussier, H., and Boutouyrie, P. (2012). Aortic stiffness as a tissue biomarker for predicting future cardiovascular events in asymptomatic hypertensive subjects. *Annals of Medicine* *44*, S93–S97.
119. Ledwina, T., and Gnot, S. (1980). Testing for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics* *36*, 161–165.
120. Lee, H.-Y., and Oh, B.-H. (2010). Aging and Arterial Stiffness. *Circulation Journal* *74*, 2257–2262.
121. Lee, M.-S., Flammer, A.J., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2012). Personalized medicine in cardiovascular diseases. *Korean Circ J* *42*, 583–591.
122. Lettre, G., Lange, C., and Hirschhorn, J.N. (2007). Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genet. Epidemiol.* *31*, 358–362.

123. Levy, D., Ehret, G.B., Rice, K., Verwoert, G.C., Launer, L.J., Dehghan, A., Glazer, N.L., Morrison, A.C., Johnson, A.D., Aspelund, T., et al. (2009). Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 41, 677–687.
124. Lewington, S., Bragg, F., and Clarke, R. (2012). A review on metaanalysis of biomarkers: promises and pitfalls. *Clin. Chem.* 58, 1192–1204.
125. Lindgren, C.M., Heid, I.M., Randall, J.C., Lamina, C., Steinthorsdottir, V., Qi, L., Speliotes, E.K., Thorleifsson, G., Willer, C.J., Herrera, B.M., et al. (2009). Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet.* 5, e1000508.
126. Liu, S., and Song, Y. (2010). Building Genetic Scores to Predict Risk of Complex Diseases in Humans: Is It Possible? *Diabetes* 59, 2729–2731.
127. Ljungberg, L.U., Östgren, C.J., Nyström, F.H., and Länne, T. (2014). Associations of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system with central aortic and ambulatory blood pressure in type 2 diabetic patients. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 15, 61–68.
128. Lluís-Ganella, C., Subirana, I., Lucas, G., Tomás, M., Muñoz, D., Sentí, M., Salas, E., Sala, J., Ramos, R., Ordovas, J.M., et al. (2012). Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis* 222, 456–463.
129. Lucchinetti, E., and Zaugg, M. (2008). Limitations of Genetic Findings That Are Not in Hardy-Weinberg Equilibrium: *Anesthesiology* 108, 338–339.
130. Malemud, C.J. (2006). Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front. Biosci.* 11, 1696–1701.
131. Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kjeldsen, S.E., Laurent, S., et al. (2007). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 25, 1105–1187.
132. Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., et al. (2014). 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press.* 23, 3–16.
133. Manolio, T.A., Brooks, L.D., and Collins, F.S. (2008). A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J. Clin. Invest.* 118, 1590–1605.
134. Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorf, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., et al. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.

135. Marian, A.J. (2012). Elements of “missing heritability.” *Curr. Opin. Cardiol.* 27, 197–201.
136. Martín-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L.M., Tuñón, J., Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J.A., de Céniga, M.V., and Egido, J. (2009). Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 62, 677–688.
137. Mattace-Raso, F.U.S., van der Cammen, T.J.M., Sayed-Tabatabaei, F.A., van Popele, N.M., Asmar, R., Schalekamp, M.A.D.H., Hofman, A., van Duijn, C.M., and Wittteman, J.C.M. (2004). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and common carotid stiffness. The Rotterdam study. *Atherosclerosis* 174, 121–126.
138. Mattace-Raso, F.U.S., Cammen, T.J.M. van der, Hofman, A., Popele, N.M. van, Bos, M.L., Schalekamp, M.A.D.H., Asmar, R., Reneman, R.S., Hoeks, A.P.G., Breteler, M.M.B., et al. (2006). Arterial Stiffness and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke The Rotterdam Study. *Circulation* 113, 657–663.
139. Mattingly, K., and Ponsonby, A.-L. (2014). A consideration of group work processes in modern epidemiology. *Ann Epidemiol* 24, 319–323.
140. Mayer, O., Jr, Filipovský, J., Pesta, M., Cífková, R., Dolejšová, M., and Simon, J. (2010). The interaction of endothelial nitric oxide synthase polymorphism and current smoking in terms of increased arterial stiffness. *Physiol Res* 59, 529–536.
141. McEniery, C.M., Wilkinson, I.B., and Avolio, A.P. (2007). Age, Hypertension and Arterial Function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34, 665–671.
142. McKinney, E.F., Walton, R.T., Yudkin, P., Fuller, A., Haldar, N.A., Mant, D., Murphy, M., Welsh, K.I., and Marshall, S.E. (2000). Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. *Pharmacogenetics* 10, 483–491.
143. McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D.R., Hinds, D.A., Pennacchio, L.A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A.R., et al. (2007). A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316, 1488–1491.
144. Medley, T.L., Cole, T.J., Gatzka, C.D., Wang, W.Y.S., Dart, A.M., and Kingwell, B.A. (2002). Fibrillin-1 genotype is associated with aortic stiffness and disease severity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 105, 810–815.
145. Medley, T.L., Kingwell, B.A., Gatzka, C.D., Pillay, P., and Cole, T.J. (2003). Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ. Res.* 92, 1254–1261.
146. Medley, T.L., Cole, T.J., Dart, A.M., Gatzka, C.D., and Kingwell, B.A. (2004). Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through

- effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1479–1484.
147. Melander, O. (2008). Genetics of cardiovascular disease: interplay between common and rare alleles. *J. Hypertens.* *26*, 394–395.
148. Meyre, D., Delplanque, J., Chèvre, J.-C., Lecoœur, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proença, C., et al. (2009). Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat. Genet.* *41*, 157–159.
149. Miall, W.E., and Oldham, P.D. (1963). The Hereditary Factor in Arterial Blood-pressure. *Br Med J* *1*, 75–80.
150. Mitchell, G.F., DeStefano, A.L., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Chen, M.-H., Vasani, R.S., Vita, J.A., and Levy, D. (2005). Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation* *112*, 194–199.
151. Mitchell, G.F., Verwoert, G.C., Tarasov, K.V., Isaacs, A., Smith, A.V., Yasmin, Rietzschel, E.R., Tanaka, T., Liu, Y., Parsa, A., et al. (2012). Common genetic variation in the 3'-BCL11B gene desert is associated with carotid-femoral pulse wave velocity and excess cardiovascular disease risk: the AortaGen Consortium. *Circ Cardiovasc Genet* *5*, 81–90.
152. Muiesan, M.L., Salvetti, M., Rizzoni, D., Painsi, A., Agabiti-Rosei, C., Aggiusti, C., and Agabiti Rosei, E. (2013). Resistant hypertension and target organ damage. *Hypertens Res* *36*, 485–491.
153. Naylor, M.G., Weiss, S.T., and Lange, C. (2009). Recommendations for using standardised phenotypes in genetic association studies. *Human Genomics* *3*, 308.
154. Neves, M.F., Viridis, A., and Oigman, W. (2012). Target Organ Damage in Hypertension. *International Journal of Hypertension* *2012*, e454508.
155. Newton-Cheh, C., Larson, M.G., Vasani, R.S., Levy, D., Bloch, K.D., Surti, A., Guiducci, C., Kathiresan, S., Benjamin, E.J., Struck, J., et al. (2009a). Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet* *41*, 348–353.
156. Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M.D., Bochud, M., Coin, L., Najjar, S.S., Zhao, J.H., Heath, S.C., Eyheramendy, S., et al. (2009b). Eight blood pressure loci identified by genome-wide association study of 34,433 people of European ancestry. *Nat Genet* *41*, 666–676.
157. Nicaud, V., Poirier, O., Behague, I., Herrmann, S.M., Mallet, C., Troesch, A., Bouyer, J., Evans, A., Luc, G., Ruidavets, J.B., et al. (1999). Polymorphisms of the endothelin-A and -B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction: the Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Am. J. Hypertens.* *12*, 304–310.

158. Nichols, W.W., and Edwards, D.G. (2001). Arterial elastance and wave reflection augmentation of systolic blood pressure: deleterious effects and implications for therapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 6, 5–21.
159. Nichols, W.W., and Singh, B.M. (2002). Augmentation index as a measure of peripheral vascular disease state. *Curr. Opin. Cardiol.* 17, 543–551.
160. Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., and Rayner, M. (2013). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J* eht356.
161. Nilsson, P. (2008a). The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: the EVA syndrome.[Review]. *Journal of Hypertension* 26, 1049–1057.
162. Nilsson, P. (2011). Early vascular aging syndrome: background and proposed definitions. *Clinical Investigation* 1, 1523–1531.
163. Nilsson, P.M. (2008b). Early vascular aging (EVA): consequences and prevention. *Vasc Health Risk Manag* 4, 547–552.
164. Nilsson, P.M. (2012). Genetic and environmental determinants of early vascular ageing (EVA). *Curr Vasc Pharmacol* 10, 700–701.
165. Nilsson, P.M. (2014). Hemodynamic Aging as the Consequence of Structural Changes Associated with Early Vascular Aging (EVA). *Aging Dis* 5, 109–113.
166. Nilsson, P.M., Boutouyrie, P., and Laurent, S. (2009). Vascular Aging A Tale of EVA and ADAM in Cardiovascular Risk Assessment and Prevention. *Hypertension* 54, 3–10.
167. Nilsson, P.M., Boutouyrie, P., Cunha, P., Kotsis, V., Narkiewicz, K., Parati, G., Rietzschel, E., Scuteri, A., and Laurent, S. (2013). Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention. *J. Hypertens.* 31, 1517–1526.
168. Nilsson, P.M., Khalili, P., and Franklin, S.S. (2014). Blood pressure and pulse wave velocity as metrics for evaluating pathologic ageing of the cardiovascular system. *Blood Press.* 23, 17–30.
169. Nürnberger, J., Opazo Saez, A., Mitchell, A., Bührmann, S., Wenzel, R.R., Siffert, W., Philipp, T., and Schäfers, R.F. (2004). The T-allele of the C825T polymorphism is associated with higher arterial stiffness in young healthy males. *J Hum Hypertens* 18, 267–271.
170. Olden, M., Teumer, A., Bochud, M., Pattaro, C., Köttgen, A., Turner, S.T., Rettig, R., Chen, M.-H., Dehghan, A., Bastardot, F., et al. (2013). Overlap between common genetic polymorphisms underpinning kidney traits and cardiovascular disease phenotypes: the CKDGen consortium. *Am. J. Kidney Dis.* 61, 889–898.
171. Olszanecka, A., Kawecka-Jaszcz, K., Stolarz, K., Lubaszewski, W., Wizner, B., Grodzicki, T., Kieć-Wilk, B., and Dembińska-Kieć, A. (2004). Polimorfizm

podjednostki B3 białka G a ciśnienie tętnicze i struktura i funkcja naczyń krwionośnych. *Nadciśnienie Tętnicze* 8, 119–131.

172. Palatini, P., Casiglia, E., Gąsowski, J., Głuszek, J., Jankowski, P., Narkiewicz, K., Saladini, F., Stolarz-Skrzypek, K., Tikhonoff, V., Van Bortel, L., et al. (2011). Arterial stiffness, central hemodynamics, and cardiovascular risk in hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 7, 725–739.
173. Pankow, J.S., Dunn, D.M., Hunt, S.C., Leppert, M.F., Miller, M.B., Rao, D.C., Heiss, G., Oberman, A., Lalouel, J.-M., and Weiss, R.B. (2005). Further evidence of a quantitative trait locus on chromosome 18 influencing postural change in systolic blood pressure: the Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) Study. *Am. J. Hypertens.* 18, 672–678.
174. Park, J.-H., Gail, M.H., Weinberg, C.R., Carroll, R.J., Chung, C.C., Wang, Z., Chanock, S.J., Fraumeni, J.F., Jr, and Chatterjee, N. (2011). Distribution of allele frequencies and effect sizes and their interrelationships for common genetic susceptibility variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18026–18031.
175. Pattaro, C., De Grandi, A., Vitart, V., Hayward, C., Franke, A., Aulchenko, Y.S., Johansson, A., Wild, S.H., Melville, S.A., Isaacs, A., et al. (2010). A meta-analysis of genome-wide data from five European isolates reveals an association of COL22A1, SYT1, and GABRR2 with serum creatinine level. *BMC Med Genet* 11, 41.
176. Payne, R.A., Wilkinson, I.B., and Webb, D.J. (2010). Arterial Stiffness and Hypertension Emerging Concepts. *Hypertension* 55, 9–14.
177. Penn, M.S., and Klemes, A.B. (2013). Multimarker approach for identifying and documenting mitigation of cardiovascular risk. *Future Cardiology* 9, 497–506.
178. Pereira, L., D'Alessio, M., Ramirez, F., Lynch, J.R., Sykes, B., Pangilinan, T., and Bonadio, J. (1993). Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1762.
179. Pereira, T., Maldonado, J., Pereira, L., and Conde, J. (2013). Aortic stiffness is an independent predictor of stroke in hypertensive patients. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 0–0.
180. Pereira, T.V., Rudnicki, M., Cheung, B.M.Y., Baum, L., Yamada, Y., Oliveira, P.S.L., Pereira, A.C., and Krieger, J.E. (2007). Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J. Hypertens.* 25, 1763–1774.
181. Perlini, S., Naditch-Brule, L., Farsang, C., Zidek, W., and Kjeldsen, S.E. (2012). Pulse pressure and heart rate in patients with metabolic syndrome across Europe: insights from the GOOD survey. *J Hum Hypertens.*
182. Peter, I., Kelley-Hedgpeeth, A., Huggins, G.S., Housman, D.E., Mendelsohn, M.E., Vita, J.A., Vasan, R.S., Levy, D., Benjamin, E.J., and Mitchell, G.F.

- (2009). Association between Arterial Stiffness and Variations in Estrogen-Related Genes. *J Hum Hypertens* 23, 636–644.
183. Pojoga, L., Gautier, S., Blanc, H., Guyene, T.T., Poirier, O., Cambien, F., and Benetos, A. (1998). Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 11, 856–860.
184. Polonis, K., Hoffmann, M., and Narkiewicz, K. (2011). Wpływ wybranych czynników genetycznych na wczesne powikłania nadciśnienia tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* 15, 125–142.
185. Powell, J.T., Turner, R.J., Sian, M., Debasso, R., and Länne, T. (2005). Influence of fibrillin-1 genotype on the aortic stiffness in men. *J. Appl. Physiol.* 99, 1036–1040.
186. Qi, L., Cornelis, M.C., Kraft, P., Stanya, K.J., Linda Kao, W.H., Pankow, J.S., Dupuis, J., Florez, J.C., Fox, C.S., Paré, G., et al. (2010). Genetic variants at 2q24 are associated with susceptibility to type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2706–2715.
187. Rizzoni, D., Muiesan, M.L., Porteri, E., De Ciuceis, C., Boari, G.E.M., Salvetti, M., Paini, A., and Rosei, E.A. (2009). Vascular remodeling, macro- and microvessels: therapeutic implications. *Blood Press.* 18, 242–246.
188. Saeki, A., Recchia, F., and Kass, D.A. (1995). Systolic Flow Augmentation in Hearts Ejecting Into a Model of Stiff Aging Vasculature Influence on Myocardial Perfusion-Demand Balance. *Circulation Research* 76, 132–141.
189. Safar, M.E., London, G.M., and Plante, G.E. (2004). Arterial stiffness and kidney function. *Hypertension* 43, 163–168.
190. Safar, M.E., Cattan, V., Lacolley, P., Nzietchueng, R., Labat, C., Lajemi, M., de Luca, N., and Bénétos, A. (2005). Aldosterone synthase gene polymorphism, stroke volume and age-related changes in aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension. *J. Hypertens.* 23, 1159–1166.
191. Salanti, G., Southam, L., Altshuler, D., Ardlie, K., Barroso, I., Boehnke, M., Cornelis, M.C., Frayling, T.M., Grallert, H., Grarup, N., et al. (2009). Underlying genetic models of inheritance in established type 2 diabetes associations. *Am. J. Epidemiol.* 170, 537–545.
192. Salvi, E., Kuznetsova, T., Thijs, L., Lupoli, S., Stolarz-Skrzypek, K., D'Avila, F., Tikhonoff, V., De Astis, S., Barcella, M., Seidlerová, J., et al. (2013). Target sequencing, cell experiments, and a population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension* 62, 844–852.
193. Samani, N.J., Erdmann, J., Hall, A.S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R.J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.-E., et al. (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 357, 443–453.

194. Sartori, M., Parotto, E., Ceolotto, G., Papparella, I., Lenzini, L., Calò, L.A., and Semplicini, A. (2004). [C825T polymorphism of the GNB3 gene codifying the G-protein beta3-subunit and cardiovascular risk]. *Ann. Ital. Med. Int.* *19*, 240–248.
195. Saxena, R., Hivert, M.-F., Langenberg, C., Tanaka, T., Pankow, J.S., Vollenweider, P., Lyssenko, V., Bouatia-Naji, N., Dupuis, J., Jackson, A.U., et al. (2010). Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat Genet* *42*, 142–148.
196. Sayed-Tabatabaei, F.A., van Rijn, M.J.E., Schut, A.F.C., Aulchenko, Y.S., Croes, E.A., Zillikens, M.C., Pols, H.A.P., Witteman, J.C.M., Oostra, B.A., and van Duijn, C.M. (2005). Heritability of the function and structure of the arterial wall: findings of the Erasmus Rucphen Family (ERF) study. *Stroke* *36*, 2351–2356.
197. Schiffrin, E.L. (2011). Vascular Remodeling in Hypertension: Mechanisms and Treatment. *Hypertension* *59*, 367–374.
198. Schunkert, H., König, I.R., Kathiresan, S., Reilly, M.P., Assimes, T.L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A.F.R., Barbalic, M., Gieger, C., et al. (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* *43*, 333–338.
199. Scuteri, A., Orru', M., Morrell, C.H., Tarasov, K., Schlessinger, D., Uda, M., and Lakatta, E.G. (2012). Associations of large artery structure and function with adiposity: effects of age, gender, and hypertension. The SardiNIA Study. *Atherosclerosis* *221*, 189–197.
200. Seidlerova, J., Bochud, M., Staessen, J.A., Cwynar, M., Dolejsova, M., Kuznetsova, T., Nawrot, T., Olszanecka, A., Stolarz, K., Thijs, L., et al. (2008). Heritability and intrafamilial aggregation of arterial characteristics. *J Hypertens* *26*, 721–728.
201. Shlomain, G., Grassi, G., Grossman, E., and Mancia, G. (2013). Assessment of Target Organ Damage in the Evaluation and Follow-Up of Hypertensive Patients: Where Do We Stand? *J Clin Hypertens* *15*, 742–747.
202. Ben-Shlomo, Y., Spears, M., Boustred, C., May, M., Anderson, S.G., Benjamin, E.J., Boutouyrie, P., Cameron, J., Chen, C.-H., Cruickshank, J.K., et al. (2014). Aortic Pulse Wave Velocity Improves Cardiovascular Event Prediction: An Individual Participant Meta-Analysis of Prospective Observational Data From 17,635 Subjects. *J Am Coll Cardiol* *63*, 636–646.
203. Sie, M.P.S., Yazdanpanah, M., Mattace-Raso, F.U.S., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Hoeks, A.P.G., Reneman, R.S., Asmar, R., Van Duijn, C.M., and Witteman, J.C.M. (2009). Genetic variation in the renin-angiotensin system and arterial stiffness. The Rotterdam Study. *Clin. Exp. Hypertens.* *31*, 389–399.
204. Siemiatycki, J., and Thomas, D.C. (1981). Biological models and statistical interactions: an example from multistage carcinogenesis. *Int J Epidemiol* *10*, 383–387.

205. Siffert, W. (2003). G-protein beta3 subunit 825T allele and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 5, 47–53.
206. Siffert, W. (2005). G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu. Rev. Med.* 56, 17–28.
207. Smith, G.D., and Ebrahim, S. (2004). Mendelian randomization: prospects, potentials, and limitations. *Int. J. Epidemiol.* 33, 30–42.
208. Sookoian, S., Gianotti, T.F., González, C.D., and Pirola, C.J. (2007). Association of the C-344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *J. Hypertens.* 25, 5–13.
209. Stoner, L., Lucero, A.A., Palmer, B.R., Jones, L.M., Young, J.M., and Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry* 46, 1353–1371.
210. Szyndler, A., Kucharska, W.A., Dubiela-D Browska, A.E., Olszanecka, A., Widecka, J., B Czkiwicz, M.A., Widecka, K., Galas, G.Y., Chlebi Ska, I., Sakiewicz, W., et al. (2011). SCORE model underestimates cardiovascular risk in hypertensive patients: results of the Polish Hypertension Registry. *Blood Press.* 20, 342–347.
211. Talmud, P.J. (2007). Gene-environment interaction and its impact on coronary heart disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17, 148–152.
212. Taniwaki, H., Kawagishi, T., Emoto, M., Shoji, T., Hosoi, M., Kogawa, K., Nishizawa, Y., and Morii, H. (1999). Association of ACE gene polymorphism with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22, 1858–1864.
213. Tarasov, K.V., Sanna, S., Scuteri, A., Strait, J.B., Orrù, M., Parsa, A., Lin, P.-I., Maschio, A., Lai, S., Piras, M.G., et al. (2009). COL4A1 is associated with arterial stiffness by genome-wide association scan. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 151–158.
214. Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J., et al. (2010). Biological, Clinical, and Population Relevance of 95 Loci for Blood Lipids. *Nature* 466, 707–713.
215. The Tobacco and Genetics Consortium (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 42, 441–447.
216. Thomas, G., Jacobs, K.B., Yeager, M., Kraft, P., Wacholder, S., Orr, N., Yu, K., Chatterjee, N., Welch, R., Hutchinson, A., et al. (2008). Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat. Genet.* 40, 310–315.
217. Tomiyama, H., and Yamashina, A. (2012). Arterial stiffness in prehypertension: a possible vicious cycle. *J Cardiovasc Transl Res* 5, 280–286.

218. Tomlinson, I., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S., Penegar, S., Chandler, I., Gorman, M., Wood, W., et al. (2007). A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 39, 984–988.
219. Varik, B.J. van, Rennenberg, R.J.M.W., Reutelingsperger, C.P., Kroon, A.A., Leeuw, P.W. de, and Schurgers, L.J. (2012). Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front. Gene* 3, 290.
220. Vasan, R.S., Glazer, N.L., Felix, J.F., Lieb, W., Wild, P.S., Felix, S.B., Watzinger, N., Larson, M.G., Smith, N.L., Dehghan, A., et al. (2009). Genetic Variants Associated With Cardiac Structure and Function. *JAMA* 302, 168–178.
221. Visscher, P.M., Hemani, G., Vinkhuyzen, A.A.E., Chen, G.-B., Lee, S.H., Wray, N.R., Goddard, M.E., and Yang, J. (2014). Statistical power to detect genetic (co)variance of complex traits using SNP data in unrelated samples. *PLoS Genet.* 10, e1004269.
222. Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Morris, A.P., Dina, C., Welch, R.P., Zeggini, E., Huth, C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., et al. (2010). Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 42, 579–589.
223. Volpe, M., and Tocci, G. (2009). 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of hypertension, from theory to practice: global cardiovascular risk concept. *J Hypertens Suppl* 27, S3–11.
224. Wain, L.V., Verwoert, G.C., O'Reilly, P.F., Shi, G., Johnson, T., Johnson, A.D., Bochud, M., Rice, K.M., Henneman, P., Smith, A.V., et al. (2011). Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nat Genet* 43, 1005–1011.
225. Wang, T.J., Gona, P., Larson, M.G., Tofler, G.H., Levy, D., Newton-Cheh, C., Jacques, P.F., Rifai, N., Selhub, J., Robins, S.J., et al. (2006). Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N. Engl. J. Med.* 355, 2631–2639.
226. Wang, X., Keith Jr, J.C., Struthers, A.D., and Feuerstein, G.Z. (2008). Assessment of Arterial Stiffness, A Translational Medicine Biomarker System for Evaluation of Vascular Risk. *Cardiovascular Therapeutics* 26, 214–223.
227. Wang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Zhou, X., Wang, X., Gao, P., Jin, L., Zhang, X., and Zhu, D. (2013). Common variants in the ATP2B1 gene are associated with hypertension and arterial stiffness in Chinese population. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1867–1873.
228. Watanabe, R.M. (2011). Statistical issues in gene association studies. *Methods Mol. Biol.* 700, 17–36.
229. Waterworth, D.M., Ricketts, S.L., Song, K., Chen, L., Zhao, J.H., Ripatti, S., Aulchenko, Y.S., Zhang, W., Yuan, X., Lim, N., et al. (2010). Genetic variants

- influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2264–2276.
230. Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661–678.
231. Widecka, K., Grodzicki, T., Narkiewicz, K., Tykarski, A., and Dziwiura, J. (2011). Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym - 2011 rok. *Nadciśnienie Tętnicze* 15, 55–82.
232. Willeum-Hansen, T., Staessen, J.A., Torp-Pedersen, C., Rasmussen, S., Thijs, L., Ibsen, H., and Jeppesen, J. (2006). Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 113, 664–670.
233. Wilson, P.W.F., D'Agostino, R.B., Levy, D., Belanger, A.M., Silbershatz, H., and Kannel, W.B. (1998). Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 97, 1837–1847.
234. Wittke-Thompson, J.K., Pluzhnikov, A., and Cox, N.J. (2005). Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 76, 967–986.
235. Wojciechowska, W., Staessen, J.A., Stolarz, K., Nawrot, T., Filipovský, J., Tichá, M., Bianchi, G., Brand, E., Cwynar, M., Grodzicki, T., et al. (2004). Association of peripheral and central arterial wave reflections with the CYP11B2 -344C allele and sodium excretion. *J. Hypertens.* 22, 2311–2319.
236. Wojciechowska, W., Cwynar, M., Stolarz-Skrzypek, K., Olszanecka, A., Staessen, J.A., Grodzicki, T., and Kawecka-Jaszcz, K. (2007). Związek polimorfizmu genów syntazy aldosteronu i a adducyny ze zmiennością ciśnienia tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* 11, 395–405.
237. Wojciechowska, W., Li, Y., Stolarz-Skrzypek, K., Kawecka-Jaszcz, K., Staessen, J.A., Wang, J.-G., and European Project on Genes in Hypertension and the JingNing Study Investigators (2012). Cross-sectional and longitudinal assessment of arterial stiffening with age in European and chinese populations. *Front Physiol* 3, 209.
238. Wojtyniak, B., Goryński, P., and Moskalewicz, B. (2012). Sytuacja zdrowotna ludności Polski i jej uwarunkowania (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny).
239. Wong, M.Y., Day, N.E., Luan, J.A., Chan, K.P., and Wareham, N.J. (2003). The detection of gene–environment interaction for continuous traits: should we deal with measurement error by bigger studies or better measurement? *Int. J. Epidemiol.* 32, 51–57.
240. Wootton, D.M., and Ku, D.N. (1999). Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annu Rev Biomed Eng* 1, 299–329.

241. Wu, C., Gong, Y., Yuan, J., Gong, H., Zou, Y., and Ge, J. (2012). Identification of shared genetic susceptibility locus for coronary artery disease, type 2 diabetes and obesity: a meta-analysis of genome-wide studies. *Cardiovasc Diabetol* *11*, 68.
242. Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E.R., and Meyers, D.A. (2002). Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum. Genet.* *111*, 573–574.
243. Yang, J., Benyamin, B., McEvoy, B.P., Gordon, S., Henders, A.K., Nyholt, D.R., Madden, P.A., Heath, A.C., Martin, N.G., Montgomery, G.W., et al. (2010a). Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat. Genet.* *42*, 565–569.
244. Yang, P., Ho, J.W.K., Zomaya, A.Y., and Zhou, B.B. (2010b). A genetic ensemble approach for gene-gene interaction identification. *BMC Bioinformatics* *11*, 524.
245. Yasmin, and O’Shaughnessy, K.M. (2008). Genetics of arterial structure and function: towards new biomarkers for aortic stiffness? *Clin. Sci.* *114*, 661–677.
246. Yasmin, McEniery, C.M., Wallace, S., Dakham, Z., Pulsalkar, P., Pusalkar, P., Maki-Petaja, K., Ashby, M.J., Cockcroft, J.R., and Wilkinson, I.B. (2005). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 372.
247. Yasmin, O’Shaughnessy, K.M., McEniery, C.M., Cockcroft, J.R., and Wilkinson, I.B. (2006a). Genetic variation in fibrillin-1 gene is not associated with arterial stiffness in apparently healthy individuals. *J. Hypertens.* *24*, 499–502.
248. Yasmin, McEniery, C.M., O’Shaughnessy, K.M., Harnett, P., Arshad, A., Wallace, S., Maki-Petaja, K., McDonnell, B., Ashby, M.J., Brown, J., et al. (2006b). Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1799–1805.
249. Ye, S. (2000). Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* *19*, 623–629.
250. Ye, S., Watts, G.F., Mandalia, S., Humphries, S.E., and Henney, A.M. (1995). Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J* *73*, 209–215.
251. Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* *364*, 937–952.

252. Zdrojewski, T., Rutkowski, M., Bandosz, P., Gaciong, Z., Jędrzejczyk, T., Solnica, B., Pencina, M., Drygas, W., Wojtyniak, B., Grodzicki, T., et al. (2013). Prevalence and control of cardiovascular risk factors in Poland. Assumptions and objectives of the NATPOL 2011 Survey. *Kardiol Pol* 71, 381–392.
253. Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S.M., Eriksson, P., de Maat, M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambien, F., Hamsten, A., et al. (1999). Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99, 1788–1794.
254. Zhang, M., Zhang, D., and Wells, M.T. (2008). Variable selection for large p small n regression models with incomplete data: Mapping QTL with epistases. *BMC Bioinformatics* 9, 251.
255. Zhu, H., Wang, X., Lu, Y., Poola, J., Momin, Z., Harshfield, G.A., Snieder, H., and Dong, Y. (2006). Update on G-protein polymorphisms in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 8, 23–29.
256. Ziemán, S.J., Melenovsky, V., and Kass, D.A. (2005). Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 932–943.
257. Zintzaras, E., and Lau, J. (2008). Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol* 61, 634–645.

Strony internetowe:

1. <http://www.nfz.gov.pl>, data dostępu: 21.04.2014
2. <http://www.1000genomes.org/>, data dostępu: 18.04.2014
3. <http://www.sequenom.com/>, data dostępu: 13.04.2014

XII. SPIS TABEL

Tab. 1. Charakterystyka badanej populacji chorych pod względem analizowanych zmiennych ciągłych (statystyki opisowe).....	24
Tab. 2. Charakterystyka badanej populacji pod względem analizowanych zmiennych o charakterze jakościowym.....	25
Tab. 3. Przykładowy sposób kodowania pierwotnych wyników genotypowania w zależności od rodzaju modelu genetycznego.....	29
Tab. 4. Wyszczególnione grupy polimorfizmów SNP.....	29
Tab. 5. Zaproponowane modele podstawowe wyjaśniające zmienności analizowanych zmiennych.....	30
Tab. 6. Charakterystyka badanej populacji według płci dla zmiennych ciągłych.....	37
Tab. 7. Charakterystyka badanej populacji pod względem zmiennych jakościowych w podziale na płeć.....	38
Tab. 8. Wyniki testu dla dwóch wskaźników struktury – porównanie frekwencji danego allelu w grupie badanej i populacji europejskiej (1000Genomes).....	40
Tab. 9. Wyniki analizy korelacji pomiędzy zmienną logPWV a zmiennymi niosącymi informację o wysokości ciśnienia krwi, otyłości oraz zaburzeniach lipidowych.....	41
Tab. 10. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model A.....	44
Tab. 11. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model A*.....	44
Tab. 12. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model B.....	45
Tab. 13. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model B*.....	45
Tab. 14. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model C.....	46
Tab. 15. Podsumowanie wyników regresji zmiennej zależnej logPWV – model D.....	46
Tab. 16. Porównanie parametrów zbudowanych modeli dla zmiennej zależnej PWV.....	47
Tab. 17. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu addytywnym.....	50
Tab. 18. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWV oraz polimorfizmów SNP w modelu addytywnym.....	51
Tab. 19. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu dominującym.....	52
Tab. 20. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWV oraz polimorfizmów SNP w modelu dominującym.....	53
Tab. 21. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej PWV oraz polimorfizmów SNP w modelu recesywnym.....	54
Tab. 22. Podsumowanie wyników regresji dla zmiennej zależnej adjPWV oraz polimorfizmów SNP w modelu recesywnym.....	55
Tab. 23. Porównanie współwystępowania danych polimorfizmów SNP w różnych modelach genetycznych.....	56
Tab. 24. Porównanie współwystępowania polimorfizmów SNP w danym modelu genetycznym.....	57
Tab. 25. Tabela licznosci wraz z średnią i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model addytywny.....	58

Tab. 26. Tabela liczności wraz z średnią i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model dominujący.....	58
Tab. 27. Tabela liczności wraz z średnią i odchyleniem standardowym zmiennej GRS w podziale na grupy wyznaczone kwartylami. Model recesywny.	59
Tab. 28. Wyniki testu Kruskala-Wallisa dla PWV w modelu surowym i skorygowanym. Grupy wyznaczone przez kwartyle zmiennej GRS_1 oraz GRS_2... ..	59
Tab. 29. Podsumowanie procentu wyjaśnionej zmienności PWV w modelu surowym i skorygowanym przez zliczoną punktację ryzyka genetycznego GRS oraz pojedyncze polimorfizmy SNP.	69
Tab. 30. Podsumowanie wyników regresji dla zliczonych punktacji ryzyka genetycznego GRS_1 i GRS_2 jako zmiennych ciągłych.....	70

XIII. SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Schemat modelu genetyczno-epidemiologicznego obrazującego sztywność naczyń jako fenotyp kumulujący wpływ wieku oraz długoterminowe oddziaływanie czynników ryzyka.....	19
Rys. 2. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model addytywny.....	60
Rys. 3. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model addytywny.....	61
Rys. 4. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model addytywny.....	62
Rys. 5. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model addytywny.....	62
Rys. 6. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model dominujący.....	63
Rys. 7. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model dominujący.....	64
Rys. 8. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model dominujący.....	65
Rys. 9. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model dominujący.....	65
Rys. 10. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model recesywny.....	66
Rys. 11. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej PWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model recesywny.....	67
Rys. 12. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_1. Model recesywny.....	68
Rys. 13. Wykres ramka-wąsy dla zmiennej adjPWV wraz z wynikami porównań wielokrotnych pomiędzy grupami wyznaczonymi przez kwartyle zmiennej GRS_2. Model recesywny.....	68
Rys. 14. Moc statystyczna testu analizującego związek polimorfizmu SNP z ciągłą cechą fenotypową.....	82

XIV. ZAŁĄCZNIKI

Zał. 1. Lista oznaczonych polimorfizmów SNP.....	118
Zał. 2. Sposób kodowania polimorfizmów SNP wraz podaną frekwencją poszczególnych genotypów i alleli oraz sukcesem genotypowania.	124
Zał. 3. Wyniki zgodności rozkładu genotypów poszczególnych polimorfizmów SNP z prawem Hardy'ego-Weinberga.....	133

Zal. 1. Lista oznaczonych polimorfizmów SNP.

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
1.	rs10195252	<i>COBLL1</i>	2	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
2.	rs10206899	<i>NAT8</i>	2	Stężenie kreatyniny w osoczu/CKD	Chambers et al., 2010	nerki-SNP
3.	rs10242595	<i>IL6</i>	7	Zawartość tkanki tłuszczowej	Andersson et al., 2010	masa ciała-SNP
4.	rs1042034	<i>APOB</i>	2	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
5.	rs10508503	?	37	Otyłość	Meyre et al., 2009	masa ciała-SNP
6.	rs1051730	<i>CHRNA3</i>	15	Palenie tytoniu (natężenie)	The Tobacco and Genetics Consortium, 2010	palenie-SNP
7.	rs1057293	<i>SGKI</i>	6	BP	Tomlinson et al., 2007	BP-SNP
8.	rs10761731	<i>JMJD1C</i>	10	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
9.	rs10850411	<i>TBX3</i>	12	BP	ICBP (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
10.	rs10993994	<i>MSMB</i>	10	Rak prostaty	Thomas et al., 2008	hormony-SNP
11.	rs11136341	<i>PLEC1</i>	8	LDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
12.	rs11153768	<i>C6orf204-PLN</i>	6	Poprzeczny wymiar lewej komory serca	Vasan et al., 2009	serce-SNP
13.	rs11191548	<i>NPPA</i>	10	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009b)	BP-SNP
14.	rs11206510	<i>PCSK9</i>	1	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
15.	rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	11	LDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
16.	rs1122608	<i>LDLR</i>	19	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
17.	rs11556924	<i>ZC3HC1</i>	7	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
18.	rs11613352	<i>LRP1</i>	12	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
19.	rs1173771	<i>C5orf174/NPR3</i>	5	BP	ICBP (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
20.	rs11776767	<i>PINX1</i>	8	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
21.	rs11869286	<i>STARD3</i>	17	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
22.	rs11953630	<i>EBF1</i>	5	BP	ICBP (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
23.	rs12190287	<i>TCF21</i>	6	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
24.	rs12328675	<i>COBLL1</i>	2	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
25.	rs12413409	<i>CNNM2</i>	10	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
26.	rs1260326	<i>GCKR</i>	2	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
27.	rs12678919	<i>LPL</i>	8	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
28.	rs12936587	<i>RALI</i>	17	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
29.	rs12940887	<i>ZNF652</i>	17	BP	Wain et al., 2011	BP-SNP

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
30.	rs12946454	<i>PLCD3</i>	17	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
31.	rs12967135	<i>MC4R</i>	18	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
32.	rs13038305	<i>CST3-CST9</i>	20	Stężenie kreatyniny w osoczu	Köttgen et al., 2009	nerki-SNP
33.	rs13082711	<i>SLC447</i>	3	BP	ICBP (Ehret et al, 2011)	BP-SNP
34.	rs13107325	<i>SLC39A8</i>	4	HDL/BP	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010) ICBP Consortium (Ehret et al, 2011)	lipidy-SNP
35.	rs13139571	<i>GUCY1A3</i>	4	BP	ICBP (Ehret et al, 2011)	BP-SNP
36.	rs1327235	<i>JAG1</i>	20	BP	ICBP (Ehret et al, 2011)	BP-SNP
37.	rs1329650	<i>LOC100188947</i>	10	Palenie tytoniu (natężenie)	The Tobacco and Genetics Consortium, 2010	palenie-SNP
38.	rs1367117	<i>APOB</i>	2	LDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
39.	rs1378942	<i>CYP11A1</i>	15	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
40.	rs1495741	<i>NAT2</i>	8	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
41.	rs1530440	<i>C10orf107</i>	10	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
42.	rs1532085	<i>LIPC</i>	15	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
43.	rs1564348	<i>LPA</i>	6	LDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
44.	rs1689800	<i>ZNF648</i>	1	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
45.	rs16942887	<i>LCAT</i>	16	HDL	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
46.	rs16948048	<i>ZNF652</i>	17	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
47.	rs16998073	<i>FGF5</i>	4	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
48.	rs1703492	<i>SNX29</i>	16	DM2/otyłość	Informacja ustna	cukrzyca-SNP
49.	rs17114036	<i>PPAP2B</i>	1	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
50.	rs17145738	<i>MLXIPL</i>	7	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
51.	rs17249754	<i>ATP2B1</i>	12	BP	CHARGE (Levy et al., 2009)	BP-SNP
52.	rs17271305	<i>VPSI3C</i>	15	Poziom glukozy w 2h po OGGT	Saxena et al., 2010	cukrzyca-SNP
53.	rs1731274	<i>STC1</i>	8	Stężenie kreatyniny w osoczu	Köttgen et al., 2009	nerki-SNP
54.	rs17319721	<i>SHROOM3</i>	4	Stężenie kreatyniny w osoczu	Köttgen et al., 2009	nerki-SNP
55.	rs17367504	<i>MTHFR</i>	1	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
56.	rs1743966	<i>SGK1</i>	6	BP	Busjahn et al., 2002	BP-SNP
57.	rs174546	<i>FADS1-2-3</i>	11	TG	GLGConsortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
58.	rs1746048	<i>CXCL12</i>	10	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
59.	rs17465637	<i>MIA3</i>	1	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
60.	rs17608766	<i>GOSR2</i>	17	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
61.	rs17609940	<i>ANKS1A</i>	6	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
62.	rs1799945	<i>HFE</i>	6	BP	Schunkert et al., 2011	BP-SNP
63.	rs1800961	<i>HNF4A</i>	20	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
64.	rs181362	<i>UBE2L3</i>	22	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
65.	rs1883025	<i>ABCA1</i>	9	HDL	Kathiresan et al., 2009b	lipidy-SNP
66.	rs1918974	<i>MDS1</i>	3	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
67.	rs198358	<i>NPPA</i>	1	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
68.	rs2068888	<i>CYP26A1</i>	10	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
69.	rs2131925	<i>ANGPTL3</i>	1	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
70.	rs216172	<i>SMG6</i>	17	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
71.	rs2228576	<i>SCNN1A</i>	12	BP	Conen et al., 2009	BP-SNP
72.	rs2234693	<i>ESR1</i>	6	Rak piersi/syndrom metaboliczny	Delling et al., 2008	hormony-SNP
73.	rs2247056	<i>HLA</i>	6	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
74.	rs2259816	<i>HNF1a</i>	12	MI/CAD	Erdmann et al., 2009	serce-SNP
75.	rs2288774	<i>NEDD4L</i>	18	BP	Pankow et al., 2005	BP-SNP
76.	rs2293889	<i>TRPS1</i>	8	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
77.	rs2334499	<i>HCCA2</i>	11	DM2	Kong et al., 2009	cukrzyca-SNP
78.	rs2412710	<i>CAPN3</i>	15	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
79.	rs243021	<i>BCL11A</i>	2	DM2	Voight et al., 2010	cukrzyca-SNP
80.	rs2467853	<i>SPATA5L1-GATM</i>	15	Stężenie kreatyniny w osoczu	Kotigen et al., 2009	nerki-SNP
81.	rs2479409	<i>PCSK9</i>	1	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
82.	rs2521501	<i>FES</i>	15	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
83.	rs2605100	<i>LYPLAL1</i>	1	Wskaźnik pas/biodra u kobiet	Lindgren et al., 2009	masa ciała-SNP
84.	rs2652834	<i>LACTB</i>	15	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
85.	rs2814944	<i>C6orf106</i>	6	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
86.	rs2895811	<i>KIAA1822</i>	14	CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
87.	rs2923084	<i>AMPD3</i>	11	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
88.	rs2925979	<i>CMIP</i>	16	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
89.	rs2929282	<i>FRMD5</i>	15	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
90.	rs2932538	<i>MOV10</i>	1	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
91.	rs2954029	<i>TRIB1</i>	8	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
92.	rs2972146	<i>IRSI</i>	2	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
93.	rs2987983	<i>ESR2</i>	14	Rak piersi/funkcja śródbłonna	Ingelsson et al., 2008	hormony-SNP
94.	rs3025343	<i>DBH</i>	9	Palenie tytoniu (skłonność do zaprzestania)	The Tobacco and Genetics Consortium, 2010	palenie-SNP
95.	rs3127573	<i>SLC22A2</i>	6	Stężenie kreatyniny w osoczu	Chambers et al., 2010	nerki-SNP
96.	rs3136441	<i>LRP4</i>	11	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
97.	rs3184504	<i>ATXN2</i>	12	BP	Global BPgen Consortium (Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
98.	rs35929607	<i>STK39</i>	2	BP	Fava et al., 2011	BP-SNP
99.	rs3733829	<i>EGLN2</i>	9	Palenie tytoniu (natężenie)	The Tobacco and Genetics Consortium, 2010	palenie-SNP
100.	rs3757354	<i>MYLIP</i>	6	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
101.	rs3764261	<i>CETP</i>	16	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
102.	rs3774372	<i>ULK4</i>	3	BP	Wain et al., 2011	BP-SNP
103.	rs3798220	<i>LPA</i>	6	MU/CAD	Schunkert et al., 2011	serce-SNP
104.	rs381815	<i>PLEKHA7</i>	11	BP	CHARGE (Levy et al., 2009)	BP-SNP
105.	rs3825807	<i>ADAMTS7</i>	15	CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
106.	rs386000	<i>LILRA3</i>	19	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
107.	rs4129767	<i>PGSI</i>	17	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
108.	rs4148008	<i>ABCA8</i>	17	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
109.	rs419076	<i>MDS1</i>	3	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
110.	rs4299376	<i>ABCG5/8</i>	2	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
111.	rs4373814	<i>CACNB2</i>	10	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
112.	rs439401	<i>APOE</i>	19	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
113.	rs4420638	<i>APOE</i>	19	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
114.	rs442177	<i>KLHL8</i>	4	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
115.	rs4457053	<i>ZBED3</i>	5	DM2	Voight et al., 2010	cukrzyca-SNP
116.	rs4607517	<i>GCK</i>	7	DM2/poziom glukozy na czczo	Dupuis et al., 2010	cukrzyca-SNP
117.	rs4660293	<i>PABPC4</i>	1	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
118.	rs4731702	<i>KLF14</i>	7	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
119.	rs4759377	<i>SBNO1</i>	12	Wzrost	Lango Allen et al., 2010	masa ciała-SNP
120.	rs4765127	<i>ZNF664</i>	12	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
121.	rs4805834	<i>SLC7A9</i>	19	Stężenie kreatyniny w osoczu	Chambers et al., 2010	nerki-SNP
122.	rs4846914	<i>GALNT2</i>	1	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
123.	rs4977574	?	9	MI/CAD	Informacja ustna	serce-SNP
124.	rs5068	<i>NPPA</i>		BP	(Newton-Cheh et al., 2009a)	BP-SNP
125.	rs5756931	<i>PLA2G6</i>	22	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
126.	rs579459	<i>ABO</i>	9	CAD	MIGen Consortium (Schunkert et al., 2011)	serce-SNP
127.	rs581080	<i>TTC39B</i>	9	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
128.	rs6029526	<i>TOP1</i>	20	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
129.	rs6040055	<i>JAG1</i>	20	Stężenie kreatyniny w osoczu	Pattaro et al., 2010	nerki-SNP
130.	rs605066	<i>CITED2</i>	6	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
131.	rs6065906	<i>PLTP</i>	20	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
132.	rs6265	<i>BDNF</i>	11	Palenie papierosów (skłonność do uzależnienia)	The Tobacco and Genetics Consortium, 2010	palenie-SNP
133.	rs629301	<i>SORT1</i>	1	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
134.	rs632793	<i>NPPB</i>	1	BP	Newton-Cheh et al., 2009b	BP-SNP
135.	rs633185	<i>TMEM133</i>	11	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
136.	rs645040	<i>MSL2L1</i>	3	TG	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
137.	rs646776	<i>SORT1</i>	1	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
138.	rs6511720	<i>LDLR</i>	19	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
139.	rs6725887	<i>WDR12</i>	2	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
140.	rs6983267	?	8	Rak jelita grubego	Tomlinson et al., 2007	hormony-SNP
141.	rs7034200	<i>GLIS3</i>	9	Glukoza na czczo	Dupuis et al., 2010	cukrzyca-SNP
142.	rs7129220	<i>ADM</i>	11	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
143.	rs7134375	<i>PDE3A</i>	12	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
144.	rs7134594	<i>MVK</i>	12	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
145.	rs7206971	<i>EFCAB13</i>	17	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
146.	rs7241918	<i>LIPG</i>	18	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
147.	rs7255436	<i>ANGPTL4</i>	19	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
148.	rs737337	<i>LOC55908</i>	19	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
149.	rs738409	<i>PNPLA3</i>	22	Sekrecja insuliny/otyłość	Chambers et al., 2011, Johansson et al., 2008	cukrzyca-SNP
150.	rs7578326	<i>KIAA1486/IRS1</i>	2	DM2	Voight et al., 2010	cukrzyca-SNP

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	Gen kandydat	Chr	Fenotyp	Źródło	Grupa-SNP
151.	rs7593730	<i>RBMS1/ITGB6</i>	2	DM2	Qi et al., 2010	cukrzyca-SNP
152.	rs7826222	<i>MSRA</i>	8	Obwód pasa	Lindgren et al., 2009	masa ciała-SNP
153.	rs7931342	?	11	Rak prostaty	Eeles et al., 2008	hormony-SNP
154.	rs8017377	<i>MYNR1N</i>	14	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
155.	rs8031633	?	15	LVMI	Vasan et al., 2009	serce-SNP
156.	rs805303	<i>BAT3</i>	6	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
157.	rs8068318	<i>TBX2</i>	17	Stężenie kreatyniny w osoczu	Chambers et al., 2010	nerki-SNP
158.	rs838880	<i>SCARBI</i>	12	HDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
159.	rs89107	<i>SLC35F1</i>	6	Wymiar wewnętrzny lewej komory serca	Vasan et al., 2009	serce-SNP
160.	rs932764	<i>PLCE1</i>	10	BP	ICBP Consortium (Ehret et al., 2011)	BP-SNP
161.	rs9349379	<i>PHACTR</i>	6	MI/CAD	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
162.	rs9411489	<i>ABO</i>	9	LDL	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
163.	rs964184	<i>APOA1/ZNF259</i>	11	TG/CAD	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	lipidy-SNP
164.	rs9686661	<i>MAP3K1</i>	5	TG	MIGen Consortium (Waterworth et al., 2010)	lipidy-SNP
165.	rs9818870	<i>MRAS</i>	3	MI/CAD	GLGC Consortium (Teslovich et al., 2010)	serce-SNP
166.	rs987237	<i>TFAP2B</i>	6	Obwód pasa	Erdmann et al., 2009	masa ciała-SNP
167.	rs9982601	<i>KCNE2</i>	21	MI/CAD	Lindgren et al., 2009	serce-SNP
168.	rs9987289	<i>LOC157273</i>	8	BP	MIGen Consortium (Kathiresan et al., 2009a)	serce-SNP
					Teslovich et al., 2010	BP-SNP

ZALĄCZNIKI

Zal. 2. Sposób kodowania polimorfizmów SNP wraz podaną frekwencją poszczególnych genotypów i alleli oraz sukcesem genotypowania (sukces %).

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
1.	rs10195252	823	TT	0,37	TC	0,48	CC	0,16	T	0,61	C	0,39	95,59
2.	rs10206899	808	TT	0,6	CT	0,34	CC	0,06	C	0,77	T	0,23	93,84
3.	rs10242595	847	GG	0,52	AG	0,4	AA	0,08	A	0,72	G	0,28	98,37
4.	rs1042034	825	AA	0,64	AG	0,31	GG	0,04	A	0,8	G	0,2	95,82
5.	rs10508503	842	CC	0,8	CT	0,19	TT	0,01	C	0,9	T	0,1	97,79
6.	rs1051730	820	CC	0,45	CT	0,42	TT	0,13	C	0,66	T	0,34	95,24
7.	rs1057293	856	CC	0,78	CT	0,21	TT	0,02	C	0,88	T	0,12	99,42
8.	rs10761731	311	GG	0,24	CG	0,55	CC	0,2	C	0,52	G	0,48	36,12
9.	rs10850411	829	TT	0,53	CT	0,38	CC	0,09	C	0,72	T	0,28	96,28
10.	rs10993994	858	CC	0,41	TC	0,48	TT	0,11	T	0,65	C	0,35	99,65
11.	rs11136341	690	AA	0,31	GA	0,55	GG	0,14	G	0,58	A	0,42	80,14
12.	rs11153768	840	CC	0,31	CT	0,46	TT	0,24	C	0,53	T	0,47	97,56
13.	rs11191548	673	TT	0,83	TC	0,16	CC	0	T	0,92	C	0,08	78,16
14.	rs11206510	844	TT	0,68	TC	0,3	CC	0,03	T	0,83	C	0,17	98,03
15.	rs11220462	853	CC	0,7	CT	0,28	TT	0,01	C	0,84	T	0,16	99,07
16.	rs1122608	832	GG	0,62	GT	0,34	TT	0,04	G	0,79	T	0,21	96,63
17.	rs11556924	858	CC	0,4	TC	0,44	TT	0,16	T	0,62	C	0,38	99,65
18.	rs11613352	840	CC	0,56	CT	0,39	TT	0,05	C	0,75	T	0,25	97,56
19.	rs1173771	853	CC	0,35	CT	0,49	TT	0,16	C	0,59	T	0,41	99,07
20.	rs11776767	860	GG	0,47	GC	0,42	CC	0,11	G	0,68	C	0,32	99,88

 polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%

 polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
21.	rs11869286	860	CC	0,43	CG	0,46	GG	0,11	C	0,66	G	0,34	99,88
22.	rs11953630	836	CC	0,41	CT	0,48	TT	0,11	C	0,65	T	0,35	97,10
23.	rs12190287	843	CC	0,44	GC	0,44	GG	0,12	G	0,66	C	0,34	97,91
24.	rs12328675	851	TT	0,75	CT	0,23	CC	0,02	C	0,87	T	0,13	98,84
25.	rs12413409	860	GG	0,82	GA	0,17	AA	0	G	0,91	A	0,09	99,88
26.	rs1260326	819	CC	0,34	TC	0,51	TT	0,16	T	0,59	C	0,41	95,12
27.	rs12678919	861	AA	0,85	AG	0,15	GG	0,01	A	0,92	G	0,08	100,00
28.	rs12936587	837	GG	0,36	AG	0,48	AA	0,17	A	0,59	G	0,41	97,21
29.	rs12940887	847	CC	0,36	CT	0,49	TT	0,15	C	0,6	T	0,4	98,37
30.	rs12946454	852	AA	0,52	AT	0,41	TT	0,08	A	0,72	T	0,28	98,95
31.	rs12967135	857	GG	0,59	GA	0,36	AA	0,05	G	0,77	A	0,23	99,54
32.	rs13038305	857	CC	0,57	CT	0,38	TT	0,05	C	0,76	T	0,24	99,54
33.	rs13082711	858	TT	0,59	CT	0,36	CC	0,05	C	0,77	T	0,23	99,65
34.	rs13107325	858	CC	0,87	TC	0,12	TT	0,01	T	0,93	C	0,07	99,65
35.	rs13139571	855	CC	0,58	CA	0,35	AA	0,06	C	0,76	A	0,24	99,30
36.	rs1327235	836	AA	0,29	GA	0,48	GG	0,23	G	0,53	A	0,47	97,10
37.	rs1329650	814	CC	0,44	CA	0,45	AA	0,1	C	0,67	A	0,33	94,54
38.	rs1367117	830	GG	0,47	AG	0,43	AA	0,1	A	0,68	G	0,32	96,40
39.	rs1378942	821	TT	0,39	GT	0,45	GG	0,16	G	0,62	T	0,38	95,35
40.	rs1495741	799	AA	0,54	GA	0,42	GG	0,04	G	0,75	A	0,25	92,80
41.	rs1530440	802	CC	0,72	CT	0,26	TT	0,02	C	0,85	T	0,15	93,15

polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%

polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
42.	rs1532085	857	GG	0,41	AG	0,49	AA	0,1	A	0,66	G	0,34	99,54
43.	rs1564348	857	AA	0,69	GA	0,28	GG	0,03	G	0,83	A	0,17	99,54
44.	rs1689800	855	TT	0,43	CT	0,45	CC	0,12	C	0,66	T	0,34	99,30
45.	rs16942887	841	GG	0,74	GA	0,24	AA	0,02	G	0,86	A	0,14	97,68
46.	rs16948048	838	AA	0,34	AG	0,51	GG	0,15	A	0,59	G	0,41	97,33
47.	rs16998073	846	AA	0,43	TA	0,46	TT	0,11	T	0,66	A	0,34	98,26
48.	rs1703492	842	GG	0,43	GT	0,45	TT	0,12	G	0,65	T	0,35	97,79
49.	rs17114036	857	AA	0,87	GA	0,12	GG	0	G	0,93	A	0,07	99,54
50.	rs17145738	859	CC	0,79	CT	0,2	TT	0,01	C	0,89	T	0,11	99,77
51.	rs17249754	858	GG	0,78	AG	0,2	AA	0,02	A	0,88	G	0,12	99,65
52.	rs17271305	803	AA	0,41	AG	0,43	GG	0,16	A	0,62	G	0,38	93,26
53.	rs1731274	841	AA	0,31	GA	0,46	GG	0,23	G	0,54	A	0,46	97,68
54.	rs17319721	843	GG	0,34	AG	0,5	AA	0,16	A	0,59	G	0,41	97,91
55.	rs17367504	856	AA	0,8	GA	0,19	GG	0,02	G	0,89	A	0,11	99,42
56.	rs1743966	845	TT	0,62	CT	0,33	CC	0,05	C	0,79	T	0,21	98,14
57.	rs174546	856	CC	0,48	CT	0,42	TT	0,1	C	0,69	T	0,31	99,42
58.	rs1746048	858	CC	0,75	TC	0,23	TT	0,02	T	0,87	C	0,13	99,65
59.	rs17465637	783	CC	0,54	CA	0,4	AA	0,06	C	0,74	A	0,26	90,94
60.	rs17608766	837	TT	0,8	CT	0,19	CC	0,01	C	0,89	T	0,11	97,21
61.	rs17609940	858	GG	0,68	CG	0,29	CC	0,03	C	0,83	G	0,17	99,65
62.	rs1799945	836	CC	0,68	CG	0,28	GG	0,04	C	0,82	G	0,18	97,10

polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%

polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
63.	rs1800961	842	CC	0,96	CT	0,04	TT	0	C	0,98	T	0,02	97,79
64.	rs181362	854	GG	0,67	GA	0,3	AA	0,03	G	0,82	A	0,18	99,19
65.	rs1883025	841	GG	0,59	GA	0,37	AA	0,05	G	0,77	A	0,23	97,68
66.	rs1918974	849	TT	0,28	CT	0,52	CC	0,2	C	0,54	T	0,46	98,61
67.	rs198358	860	AA	0,65	GA	0,3	GG	0,05	G	0,8	A	0,2	99,88
68.	rs2068888	819	AA	0,28	GA	0,46	GG	0,26	G	0,51	A	0,49	95,12
69.	rs2131925	855	TT	0,48	GT	0,42	GG	0,1	G	0,69	T	0,31	99,30
70.	rs216172	852	CC	0,44	CG	0,46	GG	0,1	C	0,67	G	0,33	98,95
71.	rs2228576	859	GG	0,53	GA	0,39	AA	0,08	G	0,73	A	0,27	99,77
72.	rs2234693	829	TT	0,26	TC	0,53	CC	0,21	T	0,53	C	0,47	96,28
73.	rs2247056	847	GG	0,64	AG	0,32	AA	0,04	A	0,8	G	0,2	98,37
74.	rs2259816	861	CC	0,42	CA	0,44	AA	0,14	C	0,64	A	0,36	100,00
75.	rs2288774	854	TT	0,33	TC	0,48	CC	0,19	T	0,57	C	0,43	99,19
76.	rs2293889	855	GG	0,37	GT	0,48	TT	0,15	G	0,61	T	0,39	99,30
77.	rs2334499	846	CC	0,37	TC	0,48	TT	0,16	T	0,6	C	0,4	98,26
78.	rs2412710	848	GG	0,97	GA	0,03	AA	0	G	0,98	A	0,02	98,49
79.	rs243021	832	CC	0,33	CT	0,47	TT	0,2	C	0,57	T	0,43	96,63
80.	rs2467853	793	TT	0,38	GT	0,48	GG	0,14	G	0,62	T	0,38	92,10
81.	rs2479409	855	AA	0,41	AG	0,47	GG	0,12	A	0,64	G	0,36	99,30
82.	rs2521501	852	TT	0,36	AT	0,49	AA	0,15	A	0,6	T	0,4	98,95
83.	rs2605100	837	GG	0,62	GA	0,34	AA	0,04	G	0,79	A	0,21	97,21



polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%



polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allelel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
84.	rs2652834	858	CC	0,61	TC	0,34	TT	0,05	T	0,78	C	0,22	99,65
85.	rs2814944	856	GG	0,68	GA	0,29	AA	0,03	G	0,82	A	0,18	99,42
86.	rs2895811	823	TT	0,3	TC	0,49	CC	0,2	T	0,55	C	0,45	95,59
87.	rs2923084	841	AA	0,67	GA	0,29	GG	0,04	G	0,82	A	0,18	97,68
88.	rs2925979	845	GG	0,51	AG	0,43	AA	0,06	A	0,73	G	0,27	98,14
89.	rs2929282	856	AA	0,89	TA	0,11	TT	0	T	0,94	A	0,06	99,42
90.	rs2932538	856	CC	0,55	CT	0,38	TT	0,07	C	0,74	T	0,26	99,42
91.	rs2954029	859	TT	0,25	AT	0,5	AA	0,25	A	0,5	T	0,5	99,77
92.	rs2972146	844	AA	0,39	CA	0,46	CC	0,15	C	0,62	A	0,38	98,03
93.	rs2987983	661	TT	0,53	TC	0,39	CC	0,08	T	0,73	C	0,27	76,77
94.	rs3025343	861	GG	0,78	GA	0,19	AA	0,02	G	0,88	A	0,12	100,00
95.	rs3127573	853	TT	0,84	TC	0,14	CC	0,02	T	0,91	C	0,09	99,07
96.	rs3136441	853	TT	0,72	TC	0,26	CC	0,02	T	0,85	C	0,15	99,07
97.	rs3184504	842	TT	0,27	CT	0,49	CC	0,24	C	0,52	T	0,48	97,79
98.	rs35929607	858	AA	0,67	GA	0,29	GG	0,04	G	0,81	A	0,19	99,65
99.	rs3733829	848	TT	0,43	CT	0,47	CC	0,1	C	0,66	T	0,34	98,49
100.	rs3757354	616	GG	0,54	GA	0,39	AA	0,07	G	0,74	A	0,26	71,54
101.	rs3764261	860	GG	0,48	GT	0,41	TT	0,11	G	0,68	T	0,32	99,88
102.	rs3774372	854	TT	0,66	CT	0,31	CC	0,03	C	0,82	T	0,18	99,19
103.	rs3798220	572	TT	0,96	TC	0,04	CC	0	T	0,98	C	0,02	66,43
104.	rs381815	841	CC	0,48	CT	0,43	TT	0,09	C	0,69	T	0,31	97,68

polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%



polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZALĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji (MAF)		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja	
105.	rs3825807	854	TT	0,35	TC	0,48	CC	0,18	T	0,58	C	0,42	99,19
106.	rs386000	854	CC	0,7	GC	0,27	GG	0,03	G	0,83	C	0,17	99,19
107.	rs4129767	857	TT	0,31	TC	0,51	CC	0,18	T	0,57	C	0,43	99,54
108.	rs4148008	780	GG	0,61	GC	0,35	CC	0,04	G	0,78	C	0,22	90,59
109.	rs419076	857	CC	0,27	CT	0,52	TT	0,21	C	0,53	T	0,47	99,54
110.	rs4299376	858	TT	0,48	GT	0,43	GG	0,09	G	0,69	T	0,31	99,65
111.	rs4373814	856	GG	0,25	CG	0,54	CC	0,21	C	0,52	G	0,48	99,42
112.	rs439401	841	CC	0,37	CT	0,47	TT	0,16	C	0,6	T	0,4	97,68
113.	rs4420638	860	AA	0,72	GA	0,27	GG	0,02	G	0,85	A	0,15	99,88
114.	rs442177	852	AA	0,32	CA	0,5	CC	0,18	C	0,57	A	0,43	98,95
115.	rs4457053	844	AA	0,56	AG	0,36	GG	0,08	A	0,74	G	0,26	98,03
116.	rs4607517	842	GG	0,78	GA	0,2	AA	0,02	G	0,88	A	0,12	97,79
117.	rs4660293	855	AA	0,56	GA	0,37	GG	0,07	G	0,75	A	0,25	99,30
118.	rs4731702	689	CC	0,41	CT	0,47	TT	0,12	C	0,65	T	0,35	80,02
119.	rs4759377	844	CC	0,79	CT	0,2	TT	0,01	C	0,89	T	0,11	98,03
120.	rs4765127	809	GG	0,46	GT	0,45	TT	0,09	G	0,68	T	0,32	93,96
121.	rs4805834	836	CC	0,75	TC	0,23	TT	0,02	T	0,86	C	0,14	97,10
122.	rs4846914	858	AA	0,39	GA	0,47	GG	0,14	G	0,62	A	0,38	99,65
123.	rs4977574	827	AA	0,33	AG	0,47	GG	0,19	A	0,57	G	0,43	96,05
124.	rs5068	854	TT	0,9	TC	0,09	CC	0	T	0,95	C	0,05	99,19
125.	rs5756931	817	TT	0,39	CT	0,44	CC	0,17	C	0,61	T	0,39	94,89

polimorficzny SNP o sukcesie genotypowania <90%

polimorficzny SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji (MAF)		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja	
126.	rs579459	861	TT	0,58	TC	0,36	CC	0,06	T	0,76	C	0,24	100,00
127.	rs581080	832	CC	0,6	CG	0,35	GG	0,05	C	0,77	G	0,23	96,63
128.	rs6029526	858	TT	0,26	TA	0,52	AA	0,22	T	0,52	A	0,48	99,65
129.	rs6040055	836	CC	0,39	CT	0,49	TT	0,11	C	0,64	T	0,36	97,10
130.	rs605066	846	TT	0,29	TC	0,5	CC	0,21	T	0,54	C	0,46	98,26
131.	rs6065906	584	TT	0,69	TC	0,29	CC	0,02	T	0,84	C	0,16	67,83
132.	rs6265	730	GG	0,67	GA	0,3	AA	0,03	G	0,82	A	0,18	84,79
133.	rs629301	855	AA	0,61	CA	0,34	CC	0,06	C	0,77	A	0,23	99,30
134.	rs632793	859	AA	0,38	GA	0,47	GG	0,15	G	0,61	A	0,39	99,77
135.	rs633185	835	GG	0,51	GC	0,28	CC	0,22	G	0,64	C	0,36	96,98
136.	rs645040	859	TT	0,71	GT	0,27	GG	0,03	G	0,84	T	0,16	99,77
137.	rs646776	693	AA	0,61	AG	0,33	GG	0,06	A	0,78	G	0,22	80,49
138.	rs6511720	849	GG	0,83	GT	0,16	TT	0	G	0,92	T	0,08	98,61
139.	rs6725887	835	TT	0,77	CT	0,22	CC	0,01	C	0,88	T	0,12	96,98
140.	rs6983267	861	TT	0,26	GT	0,52	GG	0,22	G	0,52	T	0,48	100,00
141.	rs7034200	806	AA	0,26	CA	0,49	CC	0,24	C	0,51	A	0,49	93,61
142.	rs7129220	847	GG	0,82	AG	0,17	AA	0,01	A	0,91	G	0,09	98,37
143.	rs7134375	824	CC	0,3	CA	0,52	AA	0,19	C	0,55	A	0,45	95,70
144.	rs7134594	844	TT	0,34	CT	0,48	CC	0,18	C	0,58	T	0,42	98,03
145.	rs7206971	280	AA	0,3	AG	0,45	GG	0,25	A	0,53	G	0,47	32,52
146.	rs7241918	811	TT	0,68	GT	0,3	GG	0,02	T	0,83	G	0,17	94,19

polimorficzny SNP o sukcesie genotypowania <90%

polimorficzny SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp homozygotyczny o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allele o większej frekwencji		Allele o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
147.	rs7255436	853	AA	0,29	CA	0,49	CC	0,22	C	0,53	A	0,47	99,07
148.	rs737337	840	TT	0,84	CT	0,15	CC	0,01	C	0,92	T	0,08	97,56
149.	rs738409	829	GG	0,59	GC	0,35	CC	0,06	G	0,77	C	0,23	96,28
150.	rs7578326	861	AA	0,37	AG	0,46	GG	0,17	A	0,6	G	0,4	100,00
151.	rs7593730	834	CC	0,74	CT	0,24	TT	0,02	C	0,86	T	0,14	96,86
152.	rs7826222	837	GG	0,73	GC	0,24	CC	0,03	G	0,85	C	0,15	97,21
153.	rs7931342	675	TT	0,32	GT	0,51	GG	0,17	G	0,58	T	0,42	78,40
154.	rs8017377	827	GG	0,25	AG	0,56	AA	0,18	A	0,54	G	0,46	96,05
155.	rs8031633	861	TT	0,99	TC	0,01	CC	0	T	0,99	C	0,01	100,00
156.	rs805303	829	GG	0,4	AG	0,47	AA	0,13	A	0,64	G	0,36	96,28
157.	rs8068318	730	TT	0,44	CT	0,54	CC	0,02	C	0,71	T	0,29	84,79
158.	rs838880	817	TT	0,5	CT	0,42	CC	0,08	C	0,71	T	0,29	94,89
159.	rs89107	860	GG	0,27	AG	0,47	AA	0,27	A	0,5	G	0,5	99,88
160.	rs932764	859	GG	0,28	GA	0,47	AA	0,25	G	0,52	A	0,48	99,77
161.	rs9349379	837	AA	0,37	GA	0,48	GG	0,16	G	0,61	A	0,39	97,21
162.	rs9411489	856	GG	0,63	GA	0,32	AA	0,05	G	0,79	A	0,21	99,42
163.	rs964184	858	CC	0,72	GC	0,26	GG	0,03	G	0,84	C	0,16	99,65
164.	rs9686661	844	CC	0,68	CT	0,29	TT	0,03	C	0,83	T	0,17	98,03
165.	rs9818870	857	CC	0,73	TC	0,25	TT	0,02	T	0,86	C	0,14	99,54
166.	rs987237	852	AA	0,55	AG	0,38	GG	0,07	A	0,74	G	0,26	98,95
167.	rs9982601	856	CC	0,73	CT	0,25	TT	0,02	C	0,85	T	0,15	99,42

polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%

polimorfizmy SNP o MAF <5%

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	SNP	N	Genotyp o większej frekwencji „0”		Genotyp heterozygotyczny „1”		Genotyp homozygotyczny o mniejszej frekwencji „2”		Allel o większej frekwencji		Allel o mniejszej frekwencji		Sukces %
			genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	genotyp	frekwencja	allel	frekwencja	allel	frekwencja (MAF)	
168.	rs9987289	846	GG	0,83	AG	0,17	AA	0,01	A	0,91	G	0,09	95,59

 polimorfizmy SNP o sukcesie genotypowania <90%

 polimorfizmy SNP o MAF <5%

Załącznik 3. Wyniki zgodności rozkładu genotypów poszczególnych polimorfizmów SNP z prawem Hardy'ego-Weinberga.

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ ²	p
		0	1	2	0	1	2			
1.	rs10195252	303	391	129	301,95	393,11	127,95	823	0,02	0,8778
2.	rs10206899	485	275	48	479,59	285,83	42,59	808	1,16	0,2816
3.	rs10242595	444	335	68	441,48	340,04	65,48	847	0,19	0,6660
4.	rs1042034	529	259	37	525,60	265,79	33,60	825	0,54	0,4628
5.	rs10508503	676	156	10	675,20	157,61	9,20	842	0,09	0,7675
6.	rs1051730	371	341	108	357,59	367,82	94,59	820	4,36	0,0368
7.	rs1057293	665	176	15	662,39	181,21	12,39	856	0,71	0,4000
8.	rs10850411	438	314	77	427,05	335,90	66,05	829	3,52	0,0605
9.	rs10993994	351	412	95	361,60	390,81	105,60	858	2,52	0,1122
10.	rs11153768	257	383	200	239,47	418,07	182,47	840	5,91	0,0151
11.	rs11206510	571	251	22	574,78	243,44	25,78	844	0,81	0,3673
12.	rs11220462	600	241	12	608,58	223,84	20,58	853	5,02	0,0251
13.	rs1122608	516	281	35	518,02	276,96	37,02	832	0,18	0,6740
14.	rs11556924	341	381	136	329,25	404,51	124,25	858	2,90	0,0887
15.	rs11613352	470	328	42	478,52	310,96	50,52	840	2,52	0,1123
16.	rs1173771	297	419	137	300,75	411,49	140,75	853	0,28	0,5942
17.	rs11776767	401	361	98	393,19	376,62	90,19	860	1,48	0,2238
18.	rs11869286	370	395	95	374,48	386,03	99,48	860	0,46	0,4957
19.	rs11953630	343	405	88	355,95	379,11	100,95	836	3,90	0,0483
20.	rs12190287	374	372	97	372,00	375,99	95,00	843	0,09	0,7580
21.	rs12328675	641	192	18	638,27	197,46	15,27	851	0,65	0,4201
22.	rs12413409	706	150	4	709,26	143,49	7,26	860	1,77	0,1831
23.	rs1260326	275	414	130	283,67	396,66	138,67	819	1,56	0,2110
24.	rs12678919	729	125	7	727,61	127,78	5,61	861	0,41	0,5232

polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ^2	p
		0	1	2	0	1	2			
25.	rs12936587	299	398	140	296,30	403,40	137,30	837	0,15	0,6987
26.	rs12940887	301	419	127	307,69	405,63	133,69	847	0,92	0,3373
27.	rs12946454	440	348	64	442,48	343,03	66,48	852	0,18	0,6725
28.	rs12967135	505	308	44	506,75	304,51	45,75	857	0,11	0,7371
29.	rs13038305	491	324	42	497,56	310,88	48,56	857	1,53	0,2166
30.	rs13082711	504	310	44	506,16	305,69	46,16	858	0,17	0,6796
31.	rs13107325	749	101	8	744,99	109,02	3,99	858	4,65	0,0311
32.	rs13139571	497	303	55	491,87	313,25	49,87	855	0,92	0,3386
33.	rs1327235	243	402	191	235,81	416,38	183,81	836	1,00	0,3179
34.	rs1329650	362	370	82	367,58	358,84	87,58	814	0,79	0,3750
35.	rs1367117	386	358	86	384,61	360,78	84,61	830	0,05	0,8241
36.	rs1378942	321	370	130	311,86	388,28	120,86	821	1,82	0,1773
37.	rs1495741	433	332	34	449,06	299,87	50,06	799	9,17	0,0025
38.	rs1530440	580	209	13	584,21	200,57	17,21	802	1,42	0,2340
39.	rs1532085	354	418	85	369,86	386,28	100,86	857	5,78	0,0162
40.	rs1564348	588	244	25	588,21	243,57	25,21	857	0,00	0,9588
41.	rs1689800	370	381	104	367,44	386,12	101,44	855	0,15	0,6981
42.	rs16942887	621	200	20	618,12	205,76	17,12	841	0,66	0,4173
43.	rs16948048	283	430	125	295,95	404,11	137,95	838	3,44	0,0636
44.	rs16998073	361	389	96	364,75	381,50	99,75	846	0,33	0,5672
45.	rs1703492	360	383	99	361,23	380,55	100,23	842	0,03	0,8517
46.	rs17114036	746	107	4	745,86	107,28	3,86	857	0,01	0,9382
47.	rs17145738	681	170	8	683,07	165,86	10,07	859	0,53	0,4647
48.	rs17249754	672	173	13	670,54	175,92	11,54	858	0,24	0,6265
49.	rs17271305	326	347	130	310,71	377,58	114,71	803	5,27	0,0217

polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ ²	p
		0	1	2	0	1	2			
50.	rs1731274	257	387	197	241,32	418,36	181,32	841	4,73	0,0297
51.	rs17319721	286	419	138	291,25	408,51	143,25	843	0,56	0,4559
52.	rs17367504	684	159	13	681,00	165,01	10,00	856	1,14	0,2867
53.	rs1743966	524	282	39	523,34	283,31	38,34	845	0,02	0,8928
54.	rs174546	411	359	86	407,35	366,30	82,35	856	0,34	0,5597
55.	rs1746048	644	199	15	644,28	198,44	15,28	858	0,01	0,9341
56.	rs17465637	426	310	47	431,11	299,78	52,11	783	0,91	0,3399
57.	rs17608766	666	161	10	665,79	161,43	9,79	837	0,01	0,9386
58.	rs17609940	587	248	23	589,19	243,63	25,19	858	0,28	0,5992
59.	rs1799945	571	235	30	567,02	242,95	26,02	836	0,90	0,3440
60.	rs181362	569	259	26	571,31	254,37	28,31	854	0,28	0,5949
61.	rs1883025	493	310	38	499,29	297,42	44,29	841	1,51	0,2199
62.	rs1918974	241	440	168	250,32	421,36	177,32	849	1,66	0,1974
63.	rs198358	556	258	46	545,61	278,78	35,61	860	4,78	0,0288
64.	rs2068888	226	378	215	210,29	409,43	199,29	819	4,83	0,0280
65.	rs2131925	414	358	83	411,29	363,43	80,29	855	0,19	0,6622
66.	rs216172	375	388	89	380,00	378,00	94,00	852	0,60	0,4399
67.	rs228576	458	336	65	456,20	339,60	63,20	859	0,10	0,7561
68.	rs2234693	216	443	170	230,89	413,22	184,89	829	4,30	0,0380
69.	rs2247056	541	274	32	542,72	270,56	33,72	847	0,14	0,7113
70.	rs2259816	362	379	120	353,25	396,49	111,25	861	1,68	0,1955
71.	rs2288774	280	410	164	275,44	419,12	159,44	854	0,40	0,5248
72.	rs2293889	318	411	126	320,53	405,94	128,53	855	0,13	0,7156
73.	rs2334499	309	403	134	308,05	404,90	133,05	846	0,02	0,8914
74.	rs243021	277	388	167	266,64	408,73	156,64	832	2,14	0,1435

polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ^2	p
		0	1	2	0	1	2			
75.	rs2467853	304	379	110	307,12	372,77	113,12	793	0,22	0,6379
76.	rs2479409	350	401	104	354,44	392,11	108,44	855	0,44	0,5074
77.	rs2521501	305	416	131	308,88	408,23	134,88	852	0,31	0,5786
78.	rs2605100	515	286	36	517,28	281,44	38,28	837	0,22	0,6391
79.	rs2652834	524	292	42	523,19	293,61	41,19	858	0,03	0,8722
80.	rs2814944	579	251	26	579,81	249,37	26,81	856	0,04	0,8486
81.	rs2895811	250	405	168	248,79	407,41	166,79	823	0,03	0,8650
82.	rs2923084	564	247	30	562,02	250,97	28,02	841	0,21	0,6467
83.	rs2925979	435	360	50	447,60	334,79	62,60	845	4,79	0,0286
84.	rs2929282	762	92	2	762,69	90,62	2,69	856	0,20	0,6552
85.	rs2932538	472	323	61	468,83	329,33	57,83	856	0,32	0,5738
86.	rs2954029	219	427	213	217,76	429,48	211,76	859	0,03	0,8657
87.	rs2972146	329	391	124	325,95	397,10	120,95	844	0,20	0,6552
88.	rs3025343	675	166	20	667,32	181,36	12,32	861	6,17	0,0130
89.	rs3127573	718	120	15	709,59	136,81	6,59	853	12,88	0,0003
90.	rs3136441	616	218	19	616,21	217,58	19,21	853	0,00	0,9556
91.	rs3184504	227	416	199	224,73	420,53	196,73	842	0,10	0,7544
92.	rs35929607	573	252	33	569,47	259,07	29,47	858	0,64	0,4241
93.	rs3733829	366	395	87	374,45	378,10	95,45	848	1,69	0,1931
94.	rs3764261	411	352	97	400,66	372,68	86,66	860	2,65	0,1037
95.	rs3774372	563	267	24	568,05	256,91	29,05	854	1,32	0,2509
96.	rs381815	404	358	79	404,15	357,70	79,15	841	0,00	0,9808
97.	rs3825807	295	408	151	291,57	414,86	147,57	854	0,23	0,6290
98.	rs386000	596	233	25	594,45	236,11	23,45	854	0,15	0,7003
99.	rs4129767	264	441	152	273,91	421,18	161,91	857	1,90	0,1684

polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ^2	p
		0	1	2	0	1	2			
100.	rs4148008	476	272	32	480,18	263,63	36,18	780	0,79	0,3753
101.	rs419076	235	445	177	244,23	426,54	186,23	857	1,61	0,2051
102.	rs4299376	413	365	80	413,31	364,38	80,31	858	0,00	0,9602
103.	rs4373814	210	465	181	228,75	427,51	199,75	856	6,58	0,0103
104.	rs439401	312	393	136	307,46	402,08	131,46	841	0,43	0,5124
105.	rs4420638	615	228	17	617,95	222,09	19,95	860	0,61	0,4352
106.	rs442177	274	427	151	278,94	417,12	155,94	852	0,48	0,4894
107.	rs4457053	473	305	66	463,57	323,87	56,57	844	2,86	0,0906
108.	rs4607517	655	168	19	648,60	180,80	12,60	842	4,22	0,0399
109.	rs4660293	480	317	58	476,82	323,36	54,82	855	0,33	0,5654
110.	rs4759377	669	165	10	669,14	164,72	10,14	844	0,00	0,9613
111.	rs4765127	369	365	75	375,96	351,08	81,96	809	1,27	0,2594
112.	rs4805834	624	196	16	623,55	196,91	15,55	836	0,02	0,8938
113.	rs4846914	332	407	119	334,22	402,56	121,22	858	0,10	0,7467
114.	rs4977574	275	391	161	267,68	405,64	153,68	827	1,08	0,2992
115.	rs5068	772	79	3	771,12	80,77	2,12	854	0,41	0,5219
116.	rs5756931	321	357	139	305,39	388,23	123,39	817	5,29	0,0215
117.	rs579459	498	313	50	497,53	313,95	49,53	861	0,01	0,9295
118.	rs581080	499	289	44	497,71	291,59	42,71	832	0,07	0,7981
119.	rs6029526	225	445	188	233,40	428,20	196,40	858	1,32	0,2505
120.	rs6040055	327	413	96	340,46	386,09	109,46	836	4,06	0,0438
121.	rs605066	242	424	180	243,64	420,73	181,64	846	0,05	0,8211
122.	rs629301	518	288	49	512,57	298,87	43,57	855	1,13	0,2877
123.	rs632793	326	400	133	322,09	407,82	129,09	859	0,32	0,5742
124.	rs633185	422	233	180	347,28	382,43	105,28	835	127,49	0,0000


polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane			Liczebności oczekiwane			N	χ ²	p
		0	1	2	0	1	2			
125.	rs645040	607	229	23	606,01	230,98	22,01	859	0,06	0,8016
126.	rs6511720	708	138	3	711,11	131,79	6,11	849	1,89	0,1696
127.	rs6725887	642	181	12	642,58	179,84	12,58	835	0,04	0,8515
128.	rs6983267	224	449	188	233,63	429,75	197,63	861	1,73	0,1887
129.	rs7034200	213	396	197	209,58	402,84	193,58	806	0,23	0,6297
130.	rs7129220	697	141	9	695,46	144,08	7,46	847	0,39	0,5343
131.	rs7134375	244	425	155	252,90	407,19	163,90	824	1,58	0,2094
132.	rs7134594	283	408	153	281,01	411,99	151,01	844	0,08	0,7785
133.	rs7241918	554	240	17	560,14	227,71	23,14	811	2,36	0,1244
134.	rs7255436	248	415	190	243,24	424,53	185,24	853	0,43	0,5121
135.	rs737337	705	128	7	704,00	130,00	6,00	840	0,20	0,6561
136.	rs738409	492	288	49	487,93	296,14	44,93	829	0,63	0,4290
137.	rs7578326	317	398	146	309,24	413,52	138,24	861	1,21	0,2708
138.	rs7593730	614	200	20	611,27	205,47	17,27	834	0,59	0,4422
139.	rs7826222	612	201	24	606,52	211,96	18,52	837	2,24	0,1346
140.	rs8017377	209	467	151	236,77	411,47	178,77	827	15,06	0,0001
141.	rs805303	333	388	108	335,02	383,97	110,02	829	0,09	0,7623
142.	rs838880	411	343	63	415,31	334,38	67,31	817	0,54	0,4615
143.	rs89107	229	403	228	215,50	430,00	214,50	860	3,39	0,0656
144.	rs932764	243	402	214	229,49	429,01	200,49	859	3,41	0,0650
145.	rs9349379	307	399	131	306,50	400,00	130,50	837	0,01	0,9426
146.	rs9411489	543	272	41	538,60	280,80	36,60	856	0,84	0,3591
147.	rs964184	614	219	25	610,08	226,83	21,08	858	1,02	0,3119
148.	rs9686661	577	245	22	579,74	239,52	24,74	844	0,44	0,5063
149.	rs9818870	628	214	15	630,37	209,26	17,37	857	0,44	0,5077

polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga

ZAŁĄCZNIKI

L.p.	rsSNP	Liczebności obserwowane		Liczebności oczekiwane			N	χ ²	p
		0	1	2	0	1			
150.	rs987237	471	324	57	470,29	325,42	852	0,02	0,8990
151.	rs9982601	624	214	18	624,25	213,49	856	0,00	0,9446
152.	rs9987289	698	142	6	699,01	139,98	846	0,18	0,6752

 polimorfizmy SNP, które nie znajdują się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga