

Joanna Borzyszkowska

**Związek wariantów polimorficznych wybranych genów
układu renina - angiotensyna - aldosteron ze stopniem
zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik i promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

Praca sfinansowana z grantu naukowego nr 2P05B 127 27

Gdańsk 2015

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi pracy Profesorowi **Januszowi Limonowi** oraz całemu kierowanemu przez niego zespołowi Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki, w szczególności Doktor Annie Stanisławskiej - Sachadyn.*

Pracę tę dedykuję moim rodzicom.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1.1. Jednostki miary i przedrostki	5
1.2. Substancje chemiczne i roztwory	5
1.3. Symbole aminokwasów	5
1.4. Geny i białka RAAS	6
1.5. Pozostałe skróty	6
2. STRESZCZENIE	8
2.1. Abstract	9
3. WSTĘP	10
3.1. Zachorowalność na CAD	10
3.2. Miażdżycza tętnic wieńcowych	11
3.3. Koronarografia	12
3.4. Czynniki ryzyka rozwoju CAD	13
3.5. Szlaki metaboliczne zaangażowane w rozwój CAD	16
3.6. Układ renina - angiotensyna - aldosteron	17
3.7. Polimorfizm genu <i>AGT</i>	24
3.8. Polimorfizm genu <i>ACE</i>	25
3.9. Polimorfizm genu <i>AGTR1</i>	26
3.10. Polimorfizm genu <i>CYP11B2</i>	26
4. CEL PRACY	29
5. MATERIAŁY I METODY	30
5.1. Materiały	30
5.1.1. Pacjenci	30
5.1.1.1. Ocena stopnia zaawansowania CAD	32
5.1.2. Aparatura	33
5.1.3. Odczynniki	35
5.1.4. Roztwory	36
5.2. Metody	37
5.2.1. Izolacja materiału genetycznego	37
5.2.2. Elektroforeza agarozowa	38
5.2.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	38
5.2.3.1. Oznaczenie polimorfizmu genu <i>AGT</i>	39

5.2.4.	Reakcja sekwencjonowania	41
5.2.5.	Reakcja PCR.....	43
5.2.5.1.	Oznaczenie polimorfizmu genu <i>ACE</i>	43
5.2.6.	Reakcja PCR - RFLP.....	45
5.2.6.1.	Oznaczenie polimorfizmu genu <i>AGTR1</i>	45
5.2.6.2.	Oznaczenie polimorfizmu genu <i>CYP11B2</i>	47
5.2.7.	Analizy statystyczne	50
6.	WYNIKI	51
6.1.	Polimorfizm genu <i>AGT</i>	53
6.2.	Polimorfizm genu <i>ACE</i>	55
6.3.	Polimorfizm genu <i>AGTR1</i>	56
6.4.	Polimorfizm genu <i>CYP11B2</i>	58
7.	DYSKUSJA	60
8.	WNIOSKI	87
9.	PIŚMIENNICTWO	88

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1.1. Jednostki miary i przedrostki

cm	– centymetr
g	– gram
k	– kilo, 10^3
l	– litr [dm^3]
m	– mili, 10^{-3}
M	– stężenie molowe [mol/dm^3]
min.	– minuta
mm Hg	– milimetr słupa rtęci
n	– nano, 10^{-9}
°C	– stopień Celsjusza
sek.	– sekunda
temp.	– temperatura
U	– jednostka enzymu (<i>enzyme unit</i>)
V	– wolt
x g	– wielokrotność przyspieszenia ziemskiego
μ	– mikro, 10^{-6}

1.2. Substancje chemiczne i roztwory

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	– siarczan amonu
A	– adenina (<i>Adenine</i>)
BSA	– albumina bydlęca (<i>bovine albumin</i>)
C	– cytozyna (<i>Cytosine</i>)
ddH ₂ O	– podwójnie destylowana woda (<i>double - distilled water</i>)
DMSO	– dimetylosulfotlenek (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
dNTPs	– dezoksyrybonukleotydy (<i>deoxyribonucleotides</i>): adeninowy dATP, guaninowy dGTP, tyminowy dTTP, cytozynowy dCTP
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
G	– guanina (<i>Guanine</i>)
KHCO ₃	– wodorowęglan potasu
MgCl ₂	– chlorek magnezu
NaCl	– chlorek sodu
NaOH	– wodorotlenek sodu
NH ₄ Cl	– chlorek amonu
SDS	– dodecylosiarczan sodu (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
T	– tymina (<i>Thymine</i>)
TBE	– bufor do elektroforezy z kwasem bornym (<i>Tris - Borate - EDTA</i>)
Tris	– 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol

1.3. Symbole aminokwasów

Ala	– alanina (<i>alanine</i>)
Cys	– cysteina (<i>cysteine</i>)

Asp	– kwas asparaginowy (<i>aspartic acid</i>)
Glu	– kwas glutaminowy (<i>glutamic acid</i>)
Phe	– fenyloalanina (<i>phenylalanine</i>)
Gly	– glicyna (<i>glycine</i>)
His	– histydyna (<i>histidine</i>)
Ile	– izoleucyna (<i>isoleucine</i>)
Lys	– lizyna (<i>lysine</i>)
Leu	– leucyna (<i>leucine</i>)
Met	– metionina (<i>methionine</i>)
Asn	– asparagina (<i>asparagine</i>)
Pro	– prolina (<i>proline</i>)
Gln	– glutamina (<i>glutamine</i>)
Arg	– arginina (<i>arginine</i>)
Ser	– seryna (<i>serine</i>)
Thr	– treonina (<i>threonine</i>)
Val	– walina (<i>valine</i>)
Trp	– tryptofan (<i>tryptophan</i>)
Tyr	– tyrozyna (<i>tyrosine</i>)

1.4. Geny i białka RAAS

ACE	– enzym konwertujący angiotensynę I (<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ACE	– gen kodujący enzym konwertujący angiotensynę I (<i>angiotensin converting enzyme gene</i>)
AGT	– angiotensynogen (<i>angiotensinogen</i>)
AGT	– gen kodujący angiotensynogen (<i>angiotensinogen gene</i>)
AGTR1	– receptor angiotensyny II typu pierwszego (<i>angiotensin II type - 1 receptor</i>)
AGTR1	– gen kodujący receptor angiotensyny II typu pierwszego (<i>angiotensin II type - 1 receptor gene</i>)
AGTR2	– receptor angiotensyny II typu drugiego (<i>angiotensin II type - 2 receptor</i>)
Ang I	– angiotensyna I (<i>angiotensin I</i>)
Ang II	– angiotensyna II (<i>angiotensin II</i>)
CYP11B2	– syntaza aldosteronu (<i>aldosterone synthase</i>)
CYP11B2	– gen kodujący syntazę aldosteronu (<i>aldosterone synthase gene</i>)

1.5. Pozostałe skróty

AHA	– Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne (<i>American Heart Association</i>)
BMI	– wskaźnik masy ciała (<i>Body Mass Index</i>)
CAD	– miażdżyca tętnic wieńcowych (<i>Coronary Artery Disease</i>)
chi²	– test zgodności chi kwadrat
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
G1	– pierwsza gałąź diagonalna
G2	– druga gałąź diagonalna
Go	– gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej

GUMed	– Gdański Uniwersytet Medyczny
HDL	– lipoproteina wysokiej gęstości (<i>High Density Lipoprotein</i>)
IMT	– grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy (<i>Intima - Media Thickness</i>)
IVUS	– ultrasonografia wewnątrznaczyniowa (intravascular ultrasound)
LDL	– lipoproteina niskiej gęstości (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LTW	– lewa tętnica wieńcowa
miR - 155	– microRNA - 155
PCR	– łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pz	– par zasad
RAAS	– układ renina - angiotensyna - aldosteron (<i>Renin - Angiotensin - Aldosterone System</i>)
RFLP	– polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>)
RNA	– kwas rybonukleinowy (<i>ribonucleic acid</i>)
sDBPd	– średnie, dzienne, rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (<i>Diastole Blood Pressure</i>)
SF - 1	– czynnik steroidogenezy 1 (<i>Steroidogenic Factor - 1</i>)
sSBPd	– średnie, dzienne, skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (<i>Systole Blood Pressure</i>)
ssDNA	– jednoniciowy DNA (<i>single strand DNA</i>)
Taq	– termostabilna polimeraza DNA (<i>Thermus aquaticus</i>)
TC	– cholesterol całkowity (<i>Total Cholesterol</i>)
TG	– trójglicerydy (<i>triglyceride</i>)
UCK	– Uniwersyteckie Centrum Kliniczne
USG	– ultrasonografia (<i>ultrasonography</i>)
UTR	– regiony nieulegające translacji (<i>untranslated regions</i>)
UV	– promieniowanie ultrafioletowe (<i>ultraviolet</i>)
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)

2. STRESZCZENIE

Miażdżyca tętnic wieńcowych (CAD) stanowi główny problem zdrowotny uprzemysłowionych i rozwijających się krajów. Wyniki wielu badań wskazują, że aktywacja systemu renina - angiotensyna - aldosteron (RAAS), najważniejszego systemu utrzymującego prawidłowe wartości ciśnienia tętniczego krwi, może mieć istotne znaczenie w rozwoju CAD.

Celem pracy było określenie związku c.803T>C polimorfizmu genu kodującego angiotensynogen (*AGT*), c.2306-105_392ins288 polimorfizmu genu kodującego enzym konwertujący angiotensynę I (*ACE*), c.1080*86A>C polimorfizmu genu kodującego receptor dla angiotensyny II typu pierwszego (*AGTR1*) oraz c.-344C>T polimorfizmu genu kodującego syntazę aldosteronu (*CYP11B2*) ze stopniem klinicznego zaawansowania CAD.

Badanie przeprowadzono w grupie 647 pacjentów, u których wykonano elektywną koronarografię w I Klinice Kardiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Stopień zaawansowania CAD określono przy użyciu skali Gensiniego. Analizy polimorfizmów dokonano przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym, PCR oraz PCR - RFLP. Badaną populację podzielono w zależności od akumulacji wybranych czynników ryzyka rozwoju CAD, to jest: płci, wieku (dla kobiet $>$, \leq 65 lat; dla mężczyzn $>$, \leq 55 lat), zwyczaju palenia papierosów, zawału mięśnia sercowego w wywiadzie, wartości ciśnienia tętniczego krwi (sDBPd $>$, \leq 95 mm Hg; sSBPd $>$, \leq 160 mm Hg), zachorowalności na cukrzycę, wartości BMI ($>$, \leq 26), wartości obwodu pasa (otyłość brzuszna; dla kobiet $>$, \leq 80 cm; dla mężczyzn $>$, \leq 94 cm) oraz poziomu cholesterolu całkowitego ($>$, \leq 200 mg/dl), poziomu cholesterolu LDL ($>$, \leq 130 mg/dl), poziomu cholesterolu HDL ($>$, \leq 40 mg/dl) i poziomu trójglicerydów ($>$, \leq 150 mg/dl) w surowicy krwi.

Uzyskane wyniki wskazują, że mężczyźni o genotypie DD polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE*, mający wysoki poziom cholesterolu całkowitego, wysoki poziom cholesterolu LDL oraz niski poziom cholesterolu HDL, są narażeni na wystąpienie u nich zmian miażdżycowych tętnic wieńcowych o wysokim stopniu zaawansowania. Nie znaleziono istotnej statystycznie zależności między polimorfizmami: c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* a stopniem zaawansowania CAD.

2.1. Abstract

Coronary artery disease (CAD) is a major public health problem in industrialized and developing countries. A large number of studies have suggested that the activation of, the most important blood pressure regulation system, the renin - angiotensin - aldosterone system (RAAS) could be an important contributor to CAD.

The aim of this study was to examine whether c.803T>C polymorphism in angiotensinogen gene (*AGT*), c.2306-105_392ins288 polymorphism in angiotensin converting enzyme gene (*ACE*), c.1080*86A>C polymorphism in angiotensin II type - 1 receptor gene (*AGTR1*) and c.-344C>T polymorphism in aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) are associated with the severity of CAD.

The study was carried out in a population of 647 patients who underwent elective coronary angiography in the I Department of Cardiology University Clinical Centre in Gdansk. The extent of CAD was evaluated using the Gensini score. Polymorphisms were determined by real time PCR, PCR and PCR - RFLP assays. Populations has been divided into groups defined by: sex, age (for women >, ≤ 65 years old; for men >, ≤ 55 years old), smoking habit, past myocardial infarction, blood pressure (sDBPd >, ≤ 95 mm Hg; sSBPd >, ≤ 160 mm Hg), diabetes mellitus, BMI (>, ≤ 26), abdominal obesity measured as absolute waist circumference (for women >, ≤ 80 cm; for men >, ≤ 94 cm), level of total cholesterol (>, ≤ 200 mg/dl), LDL cholesterol (>, ≤ 130 mg/dl), HDL cholesterol (>, ≤ 40 mg/dl), triglycerides (>, ≤ 150 mg/dl).

The results suggest that men who carry *ACE* c.2306-105_392ins288 DD genotype and have high total cholesterol, high LDL cholesterol and low HDL cholesterol levels, may be more predisposed to the development of more severe CAD. No significant correlation between the c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344 C>T *CYP11B2* polymorphisms and the extent of CAD has been found.

3. WSTĘP

3.1. Zachorowalność na CAD

Mimo, iż w większości uprzemysłowionych państw w ciągu ostatnich dwóch, trzech dekad odnotowuje się spadek zachorowalności na schorzenia związane z układem sercowo - naczyniowym, to nadal pozostają one jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów. Na podstawie danych Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego (AHA) z 2008 roku oszacowano, że dziennie z powodu chorób układu sercowo - naczyniowego umiera ponad 2 tysiące Amerykanów, co daje jeden przypadek śmiertelny na każde 39 sekund, z czego ponad 150 tysięcy osób ma mniej niż 65 lat. Sama miażdżyca naczyń wieńcowych jest przyczyną jednej na sześć śmierci, szacuje się, że co około minutę jeden Amerykanin umiera z powodu zdarzenia wieńcowego [Roger i in., 2012]. Choroby sercowo - naczyniowe są również główną przyczyną śmierci prawie we wszystkich krajach europejskich. Każdego roku odnotowuje się ponad 4 miliony zgonów z przyczyn sercowych, co stanowi 47% wszystkich zgonów [Nichols i in., 2014]. Mimo, iż w Polsce na przełomie lat 1991 - 2005 umieralność z powodu chorób układu sercowo - naczyniowego zmniejszyła się o około 30%, to nadal zgony spowodowane miażdżycą naczyń wieńcowych pozostają jedną z głównych przyczyn śmierci [Bandosz i in., 2012].

Obok tak wysokiej umieralności, innymi ważnymi konsekwencjami pandemii chorób miażdżycowych są względy ekonomiczne. Znaczne pogorszenie jakości życia ogromnej grupy ludzi z chorobami sercowo - naczyniowymi, powoduje w konsekwencji utratę siły produkcyjnej i obniżenie zdolności do pracy dużej części społeczeństwa. Nie bez znaczenia pozostają również narastające koszty leczenia. Obliczenia z 2008 roku pokazują, że całkowity koszt związany z zachorowalnością na schorzenia układu krążenia w Stanach Zjednoczonych wyniósł prawie 3 biliony dolarów, więcej niż koszty związane z chorobami nowotworowymi [Roger i in., 2012]. Na terenie Unii Europejskiej całkowity koszt związany z leczeniem i opieką nad osobami chorymi na schorzenia układu sercowo - naczyniowego szacowany jest na około 196 miliardów euro rocznie [Nichols i in., 2014]. Tak duże koszty leczenia czynią choroby serca, w tym miażdżycę naczyń wieńcowych najbardziej

kosztownymi chorobami w porównaniu z jakimikolwiek innymi grupami diagnostycznymi.

3.2. Miażdżycy tętnic wieńcowych

Choroba wieńcowa serca to zespół objawów towarzyszących niedostatecznemu ukrwieniu serca, spowodowanym niewystarczającym zaopatrzeniem mięśnia sercowego w tlen i substancje odżywcze. Przyczyną tego stanu mogą być zwężenia światła tętnic wieńcowych, powstałe w wyniku nasilania się zmian miażdżycowych. W przebiegu miażdżycy tętnic wieńcowych (CAD) w ścianach naczyń wieńcowych dochodzi do akumulacji złogów lipidowych, głównie cholesterolu LDL oraz w późniejszym etapie tworzenia blaszek miażdżycowych, których obecność prowadzi do stopniowego zawężania, niekiedy nawet do całkowitego zamknięcia światła tętnicy.

Zainteresowanie patogenezą miażdżycy trwa od XIX wieku, początkowo opisywano pojedyncze mechanizmy wyjaśniające powstawanie zmian miażdżycowych. W teorii lipidowej zakładano, że hiperlipidemia (głównie wysokie wartości cholesterolu LDL) jest niezbędnym i wystarczającym czynnikiem powodującym rozwój miażdżycy. Teoria oksydacyjna zakładała natomiast, że modyfikacja tlenowa lipoprotein (głównie cholesterolu LDL) jest czynnikiem obligatoryjnym w powstawaniu zmian miażdżycowych. W teorii uszkodzenia śródbłonna, zakładano dominującą rolę destrukcji komórek śródbłonna w procesie aterogenezy. Obecnie, przy wzroście świadomości na temat złożoności procesu powstawania miażdżycy, okazuje się, iż teorie te nie wykluczają się wzajemnie, a wręcz przeciwnie, doskonale się uzupełniają. Nie ma więc wątpliwości, że w patogenezie miażdżycy najważniejsze są złożone interakcje zachodzące między komórkami śródbłonna, a komórkami krwi oraz osoczowymi lipoproteinami.

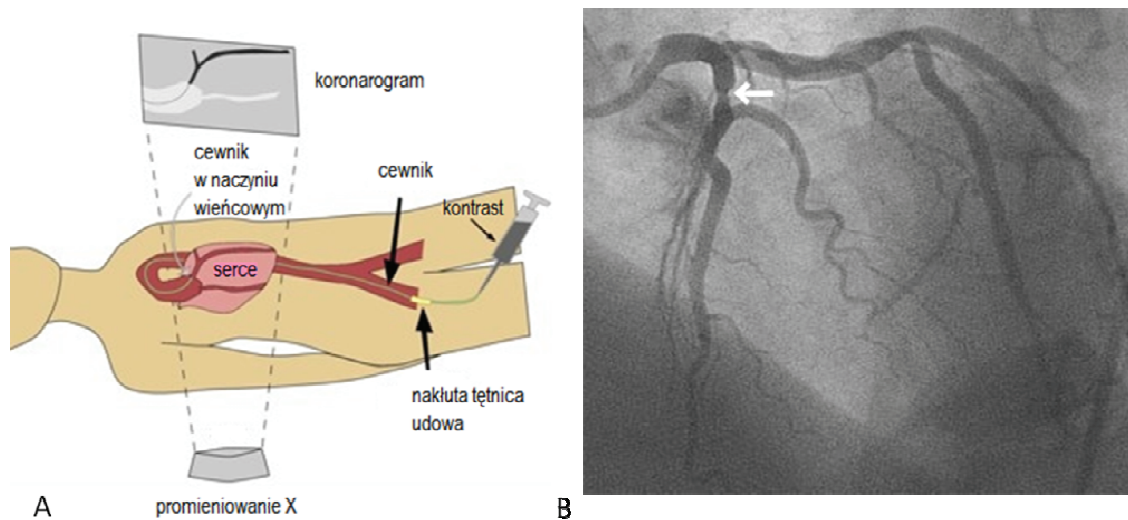
W jednym z początkowych etapów tworzenia się blaszki miażdżycowej, dochodzi do uszkodzenia komórek śródbłonna. Śródbłonek stanowi fizyczną i funkcjonalną barierę, między płynącą w naczyniu krwią, a ścianą tętnicy oraz determinuje wiele procesów takich jak napięcie i przepuszczalność naczynia. Przyczyną uszkodzenia mogą być czynniki mechaniczne (wzrost ciśnienia tętniczego, zaburzony przepływ krwi), chemiczne (składniki dymu tytoniowego,

wzrost stężenia wolnych rodników), biologiczne (bakterie, wirusy), biochemiczne (wzrost stężenia cholesterolu LDL, cytokiny). W miejscach uszkodzenia dochodzi do adhezji płytek krwi oraz gromadzenia się monocytów, makrofagów i limfocytów T, które wchodząc w kontakt ze ścianą tętnicy ulegają aktywacji i migrują do głębiej położonych warstw ściany naczynia. Zgromadzony w przestrzeni podśródbłonkowej cholesterol LDL ulega licznym modyfikacjom w tym oksydacji, uszkadza śródbłonek i zostaje wchłonięty przez makrofagi tworząc komórki piankowe. Wydzielane między innymi przez komórki piankowe mediatory zapalenia, dodatkowo uszkadzają śródbłonek a także pobudzają komórki mięśni gładkich naczyń do wzmożonych podziałów i migracji do wewnętrznych warstw ścian naczyń. Komórki mięśni gładkich ulegają proliferacji i zaczynają wytwarzać włókna tkanki łącznej, które usztywniają tworzącą się blaszkę miażdżycową. Z czasem, blaszka miażdżycowa może ulegać zwapnianiu przyczyniając się do stopniowego zamykania światła tętnicy. Natomiast jeśli procesy prozapalne w powstałej blaszce są intensywne, makrofagi wydzielają enzymy hydrolizujące włókniste białka tkanki łącznej, wówczas cała struktura staje się podatna na pęknięcie, co grozi przedostaniem się jej zawartości do krwiobiegu, a także natychmiastową aktywacją płytek krwi i wytworzeniem zakrzepu, czego konsekwencją mogą być groźne incydenty sercowo - naczyniowe w tym nagła śmierć sercowa [Bandosz i in., 2012; Rafieian - Kopaei i in., 2014; Sayols - Baixeras i in., 2014].

3.3. Koronarografia

Koronarografia została wprowadzona do praktyki klinicznej w 1959 roku i od tego czasu stawała się najszerzej stosowaną procedurą w kardiologii inwazyjnej. Badanie to do dzisiaj pozostaje złotym standardem w diagnostyce CAD i ocenie stopnia zaawansowania miażdżycy. Badanie koronarograficzne polega na wprowadzeniu do tętnicy udowej, promieniowej lub ramiennej, cewnika z kontrastem, dzięki czemu możliwe jest przedstawienie na ekranie aparatu rentgenowskiego przebiegu naczyń wieńcowych, określenie ich stanu i wielkości oraz ocena ewentualnych, charakterystycznych dla CAD zwężeń [Sones i Shirey, 1962]. Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie procedurę

badania oraz przykładowy wynik w postaci koronarogramu, ukazującego zwężoną tętnicę wieńcową.



Ryc. 1. Schemat przebiegu badania koronarograficznego (A). Koronarogram, ukazujący zwężoną tętnicę wieńcową (B) [Polewczyk i in., 2011].

Badanie to jest konieczne do ustalenia optymalnej dla danego pacjenta strategii postępowania terapeutycznego w przebiegu CAD. Ponadto jest podstawowym badaniem służącym do kwalifikacji pacjentów do wykonania przezskórnych zabiegów interwencyjnych takich jak angioplastyka wieńcowa, implantacja stentów czy pomostowanie aortalno - wieńcowe.

3.4. Czynniki ryzyka rozwoju CAD

Leczenie miażdżycy ogranicza się głównie do leczenia objawowego, dlatego niezwykle ważne, w zmniejszeniu zachorowalności na CAD, jest dokładne poznanie czynników, które mogą przyczyniać się do jej rozwoju. W związku ze skomplikowaną etiologią miażdżycy, wymienić można wiele różnych czynników ryzyka predysponujących do rozwoju CAD.

Jeden z najstarszych i powszechnych podziałów czynników ryzyka chorób sercowych, uwzględnia możliwość skutecznej interwencji, przez zmianę możliwych do modyfikacji czynników wpływających na rozwój choroby. W podziale tym wyróżnia się dwie grupy czynników ryzyka: modyfikowalne i niemodyfikowalne. Do modyfikowalnych zaliczamy między innymi:

nieprawidłową dietę, palenie tytoniu, małą aktywność fizyczną, dyslipidemię, obecność chorób współistniejących np. nadciśnienie tętnicze, cukrzyca czy otyłość. Wśród czynników niemodyfikowalnych wyróżniamy: płeć męska, wiek (dla mężczyzn > 45 lat, dla kobiet > 55 lat), wczesne występowanie chorób układu sercowo - naczyniowego w rodzinie (dla mężczyzn < 55 lat, dla kobiet < 65 lat), oraz markery genetyczne predysponujące do rozwoju choroby [Pyorala i in., 1994]. Na tej podstawie opracowano powszechnie stosowany podział czynników ryzyka, według europejskich wytycznych dotyczących prewencji chorób układu krążenia w praktyce klinicznej, podział ten został zaakceptowany przez Polskie Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia [Podolec i in., 2006]. Według tego podziału czynniki ryzyka rozdzielono na trzy grupy obejmujące: cechy osobnicze, które nie podlegają modyfikacją oraz cechy związane ze stylem życia, jak i cechy biochemiczne i fizjologiczne, które mogą podlegać modyfikacją (Tab. 1).

Tab. 1. Czynniki ryzyka rozwoju CAD.

Czynniki indywidualne
<ul style="list-style-type: none"> • wiek • płeć • wywiad rodzinny przedwczesnego występowania chorób układu krążenia • choroby układu krążenia w wywiadzie • markery genetyczne
Czynniki związane ze stylem życia
<ul style="list-style-type: none"> • nieprawidłowa dieta • palenie tytoniu • mała aktywność fizyczna
Czynniki biochemiczne i fizjologiczne
<ul style="list-style-type: none"> • nadciśnienie tętnicze • wysokie wartości TC oraz cholesterolu LDL • niskie wartości cholesterolu HDL • wysokie wartości TG

- cukrzyca
 - nadwaga i otyłość
 - czynniki prozakrzepowe
 - markery przewlekłego stanu zapalnego
-

Dane z lat 2005 - 2008 dotyczące akumulacji głównych czynników ryzyka rozwoju CAD nie są optymistyczne. Około 70% osób dorosłych w Stanach Zjednoczonych ma nadwagę a prawie 34% otyłość. Więcej niż połowa Amerykanów ma niewyrównany profil lipidowy - 27% ma wysokie wartości cholesterolu LDL, 23% ma niskie wartości cholesterolu HDL, 30% ma wysoki poziom TG. Około 34% cierpi na nadciśnienie i tylko z powodu samego nadciśnienia umiera około tysiąc osób dziennie. 12% społeczeństwa cierpi na cukrzycę, a u 35% osób powyżej 20 roku życia zdiagnozowano stan przedcukrzycowy [Kones i Rumana, 2014]. 21% mężczyzn i 17% kobiet powyżej 18 roku życia pali papierosy, a prawie 54% dzieci między 3 a 11 rokiem życia jest biernymi palaczami [Roger i in., 2012].

W latach dziewięćdziesiątych zaobserwowano w Polsce nagły, spadek umieralności z powodu choroby wieńcowej serca, z czego 54% tego obniżenia tłumaczyć można samymi zmianami w akumulacji czynników ryzyka CAD. Sytuacja ta związana była z przemianami społeczno - politycznymi oraz zmianą stylu życia Polaków, między innymi zmianą diety, ograniczeniem palenia papierosów, normalizacją ciśnienia tętniczego krwi, zwiększeniem aktywności fizycznej [Bandosz i in., 2012]. Obecnie, tym bardziej istotne wydaje się więc położenie jeszcze większego nacisku na konieczność ograniczenia możliwych do modyfikacji czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo - naczyniowego współczesnych społeczeństw.

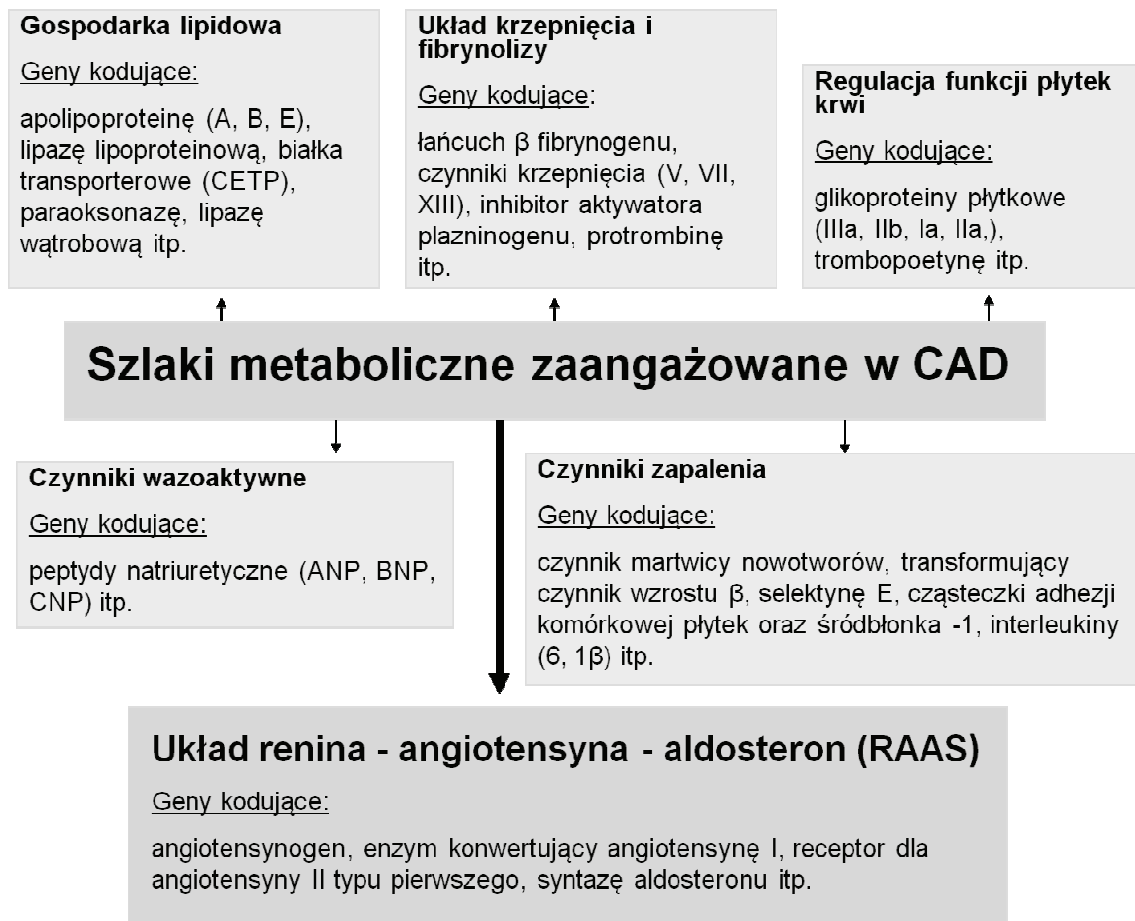
CAD jest chorobą wieloczynnikową, w której najczęściej do ujawnienia się patologii potrzebne jest współdziałanie wielu, różnych czynników jednocześnie, zarówno tych dyktowanych przez styl życia jak i tych niezmiennych, determinowanych przez konkretny profil genetyczny każdego organizmu. Wiadomym jest, że niektóre warianty polimorficzne genów mogą wpływać na rozwój choroby lub modyfikować jej przebieg. Wyniki licznych badań populacyjnych wskazują, że udział czynników genetycznych w

zachorowalności na CAD, waha się między 20 a 60% [Kraus, 2000]. Dane te wskazują, iż identyfikacja genetycznych markerów, które mogą predysponować daną osobę do wystąpienia u niej zmian miażdżycowych o wysokim stopniu zaawansowania, jest niezwykle istotna i wymaga prowadzenia badań w tym kierunku.

3.5. Szlaki metaboliczne zaangażowane w rozwój CAD

Rozwój miażdżycy jest procesem wieloetapowym, postępującym w czasie, obejmującym interakcję wielu złożonych szlaków biochemicznych. Do układów biologicznych, których patologiczna aktywność może przyczyniać się do rozwoju zmian miażdżycowych, zaliczyć można między innymi: gospodarkę lipidową, układ krzepnięcia i fibrynolizy, regulację funkcji płytek krwi, reakcję zapalną, działanie czynników wazoaktywnych, czy układ renina - angiotensyna - aldosteron. Markerami genetycznymi, będącymi potencjalnymi czynnikami rozwoju CAD, mogą być zatem geny kodujące białka układów mających największe znaczenie w rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych [Sayols - Baixeras i in., 2014]. Na rycinie 2 przedstawiono wybrane szlaki metaboliczne oraz przykłady genów, których polimorficzne warianty mogą być czynnikami ryzyka rozwoju CAD.

Czynniki genetyczne mają wpływ nie tylko na rozwój i stopień zaawansowanie zmian miażdżycowych, ale również na inne mechanizmy istotne w przebiegu choroby wieńcowej. Mogą wpływać na czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy (poziom cholesterolu, wartości ciśnienia tętniczego krwi), stan przedkliniczny choroby (dysfunkcja śródbłonna, zmiany krzepliwości krwi, przebudowa ścian naczyń krwionośnych, rozwój blaszki miażdżycowej), formę jej klinicznej manifestacji (zawał mięśnia sercowego, nagły zgon sercowy), wystąpienie powikłań (patologiczna przebudowa lewej komory po zawale mięśnia sercowego) oraz efekty leczenia zarówno farmakologicznego jak i inwazyjnego (odpowiedź organizmu na zastosowane leki, nawrót zwężenia po zabiegach przezskórnej rewaskularyzacji mięśnia sercowego) [Gruchała i Rynkiewicz, 2002].



Ryc. 2. Szlaki metaboliczne oraz przykłady genów, kodujących białka związane z rozwojem CAD.

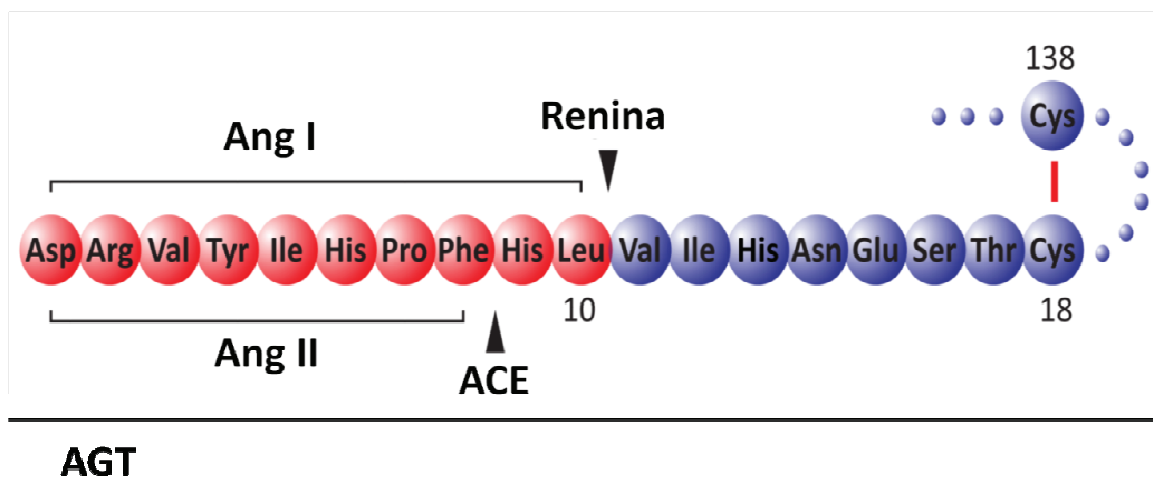
W niniejszej pracy skupiono się na poszukiwaniach czynników genetycznych, mających związek z rozwojem zmian miażdżycowych naczyń wieńcowych, wśród genów kodujących podstawowe białka układu renina - angiotensyna - aldosteron.

3.6. Układ renina - angiotensyna - aldosteron

Układ renina - angiotensyna - aldosteron (RAAS) jest hormonalno - enzymatycznym szlakiem, odgrywającym zasadniczą rolę w regulacji wysokości ciśnienia tętniczego krwi, objętości płynów wewnątrzustrojowych oraz równowagi elektrolitowej organizmu.

W pierwszym etapie ogólnoustrojowych przemian szlaku RAAS, enzym proteolityczny uwalniany głównie przez komórki aparatu przykłębuszkowego

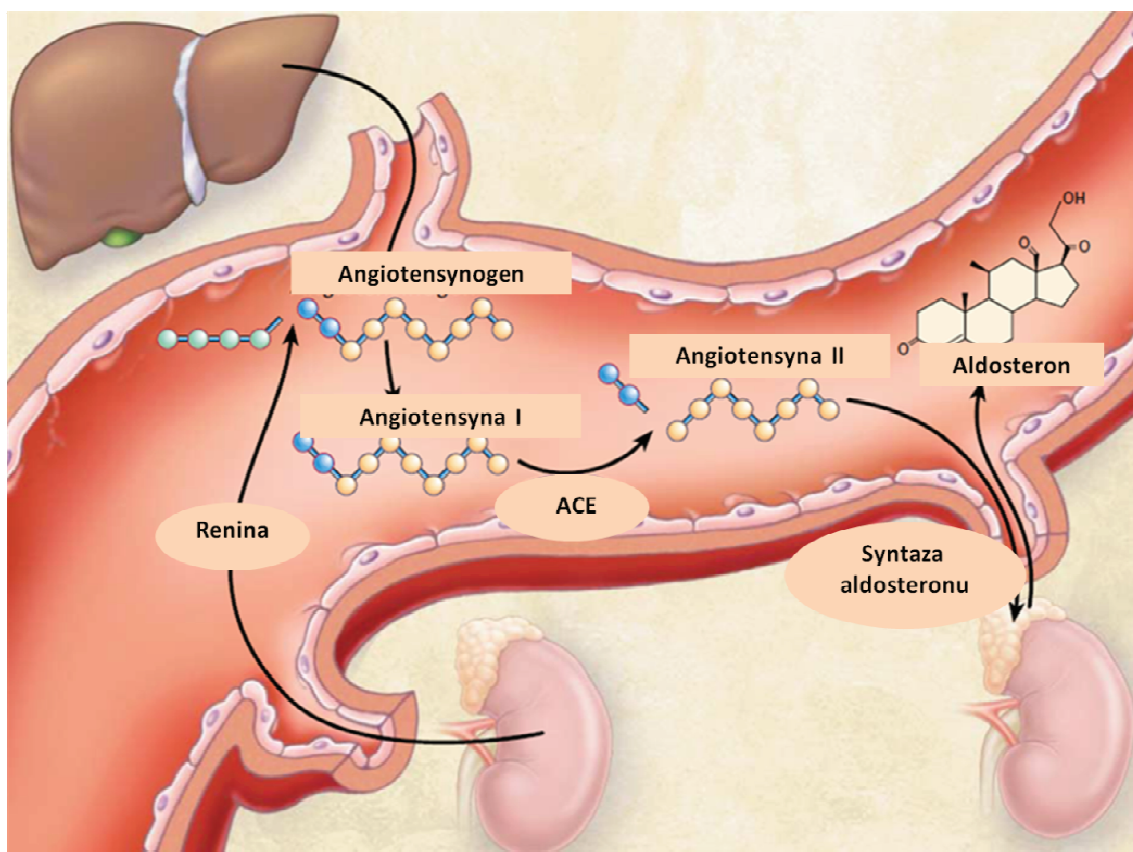
nerek - renina, odszczepia od angiotensynogenu (AGT), syntetyzowanego przez komórki wątroby, dziesięciopeptyd angiotensynę I (1 - 10) (Ang I). Ang I jest związkiem o słabych właściwościach biologicznych. Następnie w wyniku dalszej proteolizy syntetyzowany w płucach, enzym konwertujący angiotensynę I (ACE) odszczepia dwupeptyd od Ang I, w wyniku czego powstaje aktywna biologicznie angiotensyna II (1 - 8) (Ang II). Na rycinie 3 przedstawiono schematycznie strukturę AGT, Ang I, Ang II oraz zaznaczono miejsca enzymatycznego cięcia reniny i ACE.



Ryc. 3. Schematyczna struktura białek: AGT, Ang I, Ang II oraz zaznaczone miejsca cięcia enzymów: ACE i reniny [Wu i in., 2011].

ACE nie wykazuje selektywnych właściwości karboksydazowych w stosunku do peptydów angiotensynowych i uczestniczy również w metabolizmie innych związków działających na układ krążenia, między innymi powoduje on dwuetapową degradację bradykininy, wykazującej właściwości rozszerzające naczynia krwionośne. Ang II może być następnie przekształcana przez endopeptydazy, karboksypeptydazy i aminopeptydazy w inne, mniejsze fragmenty, takie jak angiotensyna (2 - 8), (3 - 8), (1 - 7). Niektóre z nich również odznaczają się silnymi właściwościami biologicznymi, synergistycznymi (angiotensyna 2 - 8 i 3 - 8) lub antagonistycznymi (angiotensyna 1 - 7) w stosunku do Ang II. Istnieją również alternatywne szlaki tworzenia angiotensyn. Ang II może powstawać w wyniku działania na AGT innych proteaz, natomiast

ich udział w tworzeniu Ang II jest znacznie mniejszy. Głównymi receptorami dla Ang II są: receptor angiotensyny II typu pierwszego (AGTR1) oraz receptor angiotensyny II typu drugiego (AGTR2). Bezpośrednie działanie Ang II na receptory AGTR1 w układzie krążenia powoduje, doraźny skurcz naczyń krwionośnych. W wyniku pobudzenia receptorów AGTR1 w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń, dochodzi do zwiększonego napływu jonów wapnia do cytoplazmy z siateczki śródplazmatycznej i z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wzrost stężenia jonów wapnia powoduje aktywację białek cytoszkieletu, co prowadzi do skurczu komórek. Innym bezpośrednim działaniem pobudzenia receptorów AGTR1 przez Ang II jest spotęgowanie siły skurczu mięśnia sercowego i wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Długotrwała aktywacja receptorów AGTR1 przyczynia się natomiast do hipertrofii mięśnia sercowego oraz naczyń krwionośnych. Większość działań sprzyjających rozwojowi miażdżycy Ang II wywiera właśnie przez aktywację receptora AGTR1. Natomiast w wyniku stymulacji AGTR2 dochodzi do zwiększonego wytwarzania związków naczyniorozszerzających, zmniejszenia opory naczyniowego, zwiększenia przepływu krwi, promocji mechanizmów antyproliferacyjnych i nasilenia apoptozy. W dalszym etapie przemian RAAS Ang II stymuluje aktywność mitochondrialnego enzymu cytochromu P450 zwanego syntazą aldosteronu (CYP11B2) do kilkuetapowej syntezy aldosteronu z deoksykortykosteronu. Synteza ta odbywa się głównie w warstwie kłębkowatej kory nadnerczy. W siateczce śródplazmatycznej powstaje 11-deoksykortykosteron, który jest następnie przekształcany w mitochondriach w kortykosteron, a później w 18-hydrokortykosteron i dalej w aldosteron [Szczepańska - Sadowska, 2000]. Aldosteron działa za pośrednictwem dwóch typów receptorów: genomowych i niegenomowych. W wyniku aktywacji receptorów genomowych przez aldosteron, możliwa jest regulacja syntezy białek i zmiana transportu sodu w kanalikach nerkowych. Konsekwencją działania aldosteronu jest zwiększone wchłanianie sodu oraz wzrost wydalania potasu i wodoru w dystalnej części nefronu [Szczepańska - Sadowska, 2000]. Na rycinie 4 przedstawiono schemat ogólnoustrojowego działania RASS.



Ryc. 4. Schemat układu renina - angiotensyna - aldosteron [Weber, 2001]. Opis w tekście.

Poszczególne białka RAAS są syntetyzowane w odrębnych strukturach organizmu pod wpływem specyficznych czynników lokalnych. Układ ten funkcjonuje jako całość dzięki wzajemnym związkom opartym na sprzężeniach zwrotnych między wydzielaniem reniny i działaniem peptydów angiotensynowych. Synteza i wydzielanie reniny regulowane jest między innymi przez zmiany ciśnienia w tętnicy nerkowej, zmiany stężenia jonów sodowych w komórkach plamki gęstej, zmiany aktywności współczulnych nerwów nerkowych oraz czynniki hormonalne i humoralne. Mechanizm sprzężenia zwrotnego sprawia, że jeśli ciśnienie tętnicze wzrasta lub gdy spożycie soli jest nadmierne, to w nerkach dochodzi do zmniejszonego uwalniania reniny, co umożliwia wydalanie większych ilości sodu i przywraca prawidłowe ciśnienie tętnicze krwi. Do hamowania wydzielania reniny dochodzi między innymi pod wpływem związków takich jak Ang II. Hamowanie wydzielania reniny przez Ang II zamyka pętlę sprzężenia zwrotnego ujemnego

w obrębie układu, zapobiegając nadmiernemu pobudzeniu komórek [Szczepańska - Sadowska, 2000].

Głównym fizjologicznym efektem funkcjonowania RAAS jest utrzymanie prawidłowego ciśnienia tętniczego krwi, zarówno poprzez bezpośredni wpływ Ang II na układ sercowo - naczyniowy, jak też poprzez długoterminowe działanie aldosteronu na gospodarkę wodno - elektrolitową organizmu. Ponadto Ang II i aldosteron, dwa główne, biologicznie aktywne białka wydzielane w wyniku aktywacji układu, wykazują szerokie promiażdżycowe działanie. W wielu pracach opisano, iż długoterminowa, wzmożona aktywacja RAAS i w konsekwencji nadprodukcja Ang II [Jacoby i Rader, 2003] i aldosteronu [Bodula i in., 2007; Filipiak i Opolski, 2000a; Namsolleck i Unger, 2014] powodują powstawanie i progresję zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. W tabeli 2 wymieniono główne, sprzyjające powstawaniu miażdżycy efekty jakie wywierają Ang II i aldosteron na serce i układ naczyniowy.

Tab. 2. Główne aterogenne działania Ang II i aldosteronu.

Angiotensyna II
<ul style="list-style-type: none">• działanie naczyniozężające• działanie antynatriuretyczne• aktywacja układu współczulnego (wzrost wydzielania wazopresyny)• hipertrofia mięśnia sercowego i naczyń krwionośnych• proliferacja i migracja komórek mięśni gładkich ścian naczyń z błony środkowej do wewnętrznej• aktywacja monocytów i makrofagów• agregacja i adhezja płytek krwi• modyfikacja układu krzepnięcia i fibrynolizy: synteza inhibitorów aktywatora plazminogenu typu I i II (hamują rozkład elementów macierzy zewnątrzkomórkowej)• uszkodzenie i dysfunkcja komórek śródbłonna w wyniku stresu oksydacyjnego: zmniejszenie syntezy tlenku azotu i prostacykliny (związki naczyniorozszerzające)• oksydacyjna modyfikacja lipoprotein• stymulacja wytwarzania aldosteronu

Aldosteron

- retencja sodu i wody (niekorzystne efekty hemodynamiczne)
 - zmniejszenie stężenia jonów potasu i magnezu (niestabilność elektryczna)
 - działanie hipertensyjne
 - hamowanie wychwytu zwrotnego noradrenaliny
 - wzmożona aktywność współczulna
 - dysfunkcja komórek śródbłónka
 - właściwości prooksydacyjne
 - stymulacja wytwarzania ACE
 - zwiększenie liczby receptorów AGTR1 w kardiomiocytach
 - wzmacnianie procesu włóknienia miokardium i naczyń krwionośnych
-

Oprócz szeroko poznanego, obwodowego RAAS opisano również istnienie lokalnych, tkankowych układów regulujących czynność poszczególnych narządów na drodze parakrynej. Funkcjonowanie lokalnych RAAS opisano głównie w mózgu, nerkach, sercu, ścianach dużych naczyń krwionośnych oraz gruczołach wydzielania wewnętrznego [Szczepańska - Sadowska, 2000]. W licznych badaniach opisano również obecność białek RAAS w blaszkach miażdżycowych tętnic wieńcowych pacjentów z chorobami układu krążenia [Diet i in., 1996; Gross i in., 2002; Ohishi i in., 1997; Schieffer i in., 2000]. Uważa się, że obwodowy RAAS aktywowany jest głównie w celu utrzymania homeostazy w organizmie, natomiast działanie układów tkankowych jest długoterminowe i może zaburzać funkcjonowanie niektórych narządów. Istnienie lokalnego RAAS w układzie naczyniowym przyczyniać się może do rozwoju poważnych powikłań takich jak choroby naczyniowe, w tym miażdżyca tętnic wieńcowych. Szacuje się, że aż 90% całej puli obecnego w organizmie ACE zlokalizowane jest w tkankach, a tylko 10% znajduje się w osoczu. Tkankowy ACE zlokalizowany jest głównie na zewnętrznej powierzchni oraz w zagłębieniach błon komórkowych śródbłónka naczyniowego [Dzau, 1993]. Podobnie stężenie aldosteronu jest wielokrotnie wyższe w komórkach mięśnia sercowego niż obwodowo w osoczu krwi [Filipiak i Opolski, 2000a].

Znaczenie aktywności RAAS w rozwoju miażdżycy podkreśla fakt, iż związki farmakologiczne antagonizujące ten układ stały się ważnymi i

powszechnie stosowanymi lekami w licznych schorzeniach kardiologicznych: nadciśnieniu tętniczym, niewydolności krążenia, czy zapobieganiu patologicznej przebudowie mięśnia sercowego po zawale [Gruchała i in., 2000]. Do leków tych zaliczamy zarówno inhibitory konwertazy angiotensyny (inhibitory ACE), jak i grupę antagonistów receptorów dla angiotensyny II (antagoniści RA) czy aldosteronu. Inhibitory ACE przyłączają się do centrum aktywnego enzymu ACE, uniemożliwiając wiązanie Ang I i hamując tym samym powstawanie biologicznie aktywnej Ang II. Do efektów farmakologicznych inhibitorów ACE zaliczamy między innymi: zmniejszenie stężenia Ang II i aldosteronu w krwiobiegu, zmniejszenie intensywności procesów oksydacji lipidów, rozkurcz mięśni gładkich naczyń, zmniejszenie ciśnienia tętniczego, wzrost elastyczności naczyń, poprawa parametrów przepływu wieńcowego, zmniejszenie skłonności płytek krwi do agregacji i adhezji, hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich, hamowanie wytwarzania kolagenu przez fibroblasty, zmniejszenie apoptozy komórek mięśnia sercowego, regresja przerostu lewej komory serca i zwłóknienia okołonaczyniowego oraz opóźnienie procesów miażdżycowych [Filipiak i Opolski, 2000b]. Wszystkie te mechanizmy prowadzą do złagodzenia lub ustąpienia objawów chorobowych, ale także przyczyniają się do istotnego wydłużenia życia pacjentów ze schorzeniami sercowo - naczyniowymi [Marian i in., 2000; Scharplatz i in., 2005; Voors i in., 2006]. Leki należące do grupy antagonistów RA w selektywny sposób przeciwdziałają wiązaniu Ang II do odpowiedniego typu receptora. Wybiórcze blokowanie wiązania Ang II do AGTR1, za pomocą selektywnych antagonistów, umożliwia łączenie się Ang II z innymi typami receptorów angiotensynowych, uruchamiając tym samym alternatywne ścieżki działania układu. Antagoniści RA, są dobrze tolerowaną grupą leków, wykazują działanie hipotensyjnie oraz zapobiegają poważnym powikłaniom narządowym w rozwoju nadciśnienia tętniczego [Opolski i Filipiak 2000]. Antagoniści aldosteronu to leki działające przez blokowanie receptorów dla aldosteronu. Leki te ograniczają niekorzystne efekty działania aldosteronu, przyczyniając się do zmniejszenia śmiertelności oraz częstości hospitalizacji pacjentów ze schorzeniami sercowo - naczyniowymi [Filipiak i Opolski, 2000a; Namsolleck i Unger, 2014].

Podsumowując, jak wynika z przeglądu literaturowego opisanego powyżej, nadmierna aktywacja układu renina - angiotensyna - aldosteron

sprzyja powstawaniu i progresji zmian miażdżycowych. W związku z tym, przedmiotem badań dotyczących rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych, mogą być polimorficzne geny kodujące podstawowe czynniki układu RAAS.

3.7. Polimorfizm genu *AGT*

Gen kodujący angiotensynogen (*AGT*) znajduje się w długich ramionach chromosomu pierwszego (1q42-q43), składa się z pięciu eksonów i czterech intronów. Znanym polimorfizmem genu *AGT* jest polimorfizm w sekwencji kodującej wynikający z zamiany tyminy na cytozynę w pozycji 4072 drugiego kodonu genu *AGT* (c.803T>C, rs699, w literaturze często opisywany jako M235T). Zmiana sekwencji nukleotydów w DNA skutkuje zmianą metioniny na treoninę w pozycji 268 łańcucha polipeptydowego białka *AGT*. Wykazano 5% wzrost poziomu angiotensynogenu w osoczu krwi u heterozygot CT i 11% u homozygot CC w porównaniu z homozygotami TT [Sethi i in., 2003]. W wielu pracach opisano, iż polimorfizm ten sprzężony jest z innym polimorfizmem położonym w rejonie promotorowym genu *AGT* (c.-44G>A, rs5051, w literaturze opisywany jako G(-6)A), stąd możliwy efekt polimorfizmu c.803T>C na ekspresję genu i zmiany stężenia białka *AGT* w osoczu. Polimorfizm c.-44G>A polega na zastąpieniu, w allelach C polimorfizmu c.803T>C, guaniny przez adeninę. Obecność adeniny w pozycji -6 ułatwia przyłączenie odpowiednich czynników transkrypcyjnych, co prowadzi do nasilenia transkrypcji genu *AGT*, a w konsekwencji do zwiększonego stężenia białka w osoczu krwi [Jeunemaitre, 2008].

W pracach typu metaanalizy opisano związek polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* głównie z nadciśnieniem tętniczym [Sethi i in., 2003], nadciśnieniem tętniczym oraz ze stanem przedzucawkowym u kobiet ciężarnych [Lin i in., 2012], ale także z chorobą niedokrwinną serca [Sethi i in., 2003; Xu i in., 2007]. W niektórych publikacjach opisano również związek tego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD [Gardemann i in., 1999; Jeunemaitre i in., 1997; Lanz i in., 2005; Mehri i in., 2011]. Natomiast w innych pracach nie znaleziono takiej korelacji [Jia i in., 2012; Nair i in., 2003].

3.8. Polimorfizm genu *ACE*

Gen kodujący enzym konwertujący angiotensynę I (*ACE*), znajduje się w długich ramionach chromosomu 17 (17q22-q24), składa się z 26 eksonów i 25 intronów. Mającym największe znaczenie kliniczne i najczęściej badanym polimorfizmem genu *ACE* jest insercyjno - delecyjny polimorfizm, wynikający z obecności lub braku repetytywnej sekwencji *Alu*, o długości 288 pz w 16 intronie genu (c.2306-105_392ins288, rs4340, znany w literaturze jako I/D). Polimorfizm ten jest odpowiedzialny za około 50% zmienności poziomu białka *ACE* w surowicy krwi, najwyższe wartości przypisuje się homozygotom DD, pośrednie heterozygotom ID a najniższe homozygotom II [Agerholm - Larsen i in., 2000; Rigat i in., 1990]. Nie opisano dotychczas mechanizmu w jakim polimorfizm ten miałby wywierać efekt na ekspresję genu i zmiany poziomu białka *ACE* w surowicy krwi. Najbardziej prawdopodobne wydaje się być jego współdziałanie z innym polimorfizmem położonym w obrębie genu lub poza nim [Sayed - Tabatabaei i in., 2006].

Od wielu lat intensywnie badano związek polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z nadciśnieniem tętniczym [Higaki i in., 2000; O'Donnell i in., 1998] oraz innymi schorzeniami układu sercowo - naczyniowego, w tym CAD. W pracach typu metaanaliza wykazano, że polimorfizm ten może być czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych [Zintzaras i in., 2008]. Uwagę natomiast zwraca bardzo mała liczba prac badających związek tego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania miażdżycy. W niektórych publikacjach wykazano wpływ polimorfizmu 105_392ins288 na stopień zaawansowania CAD [Guney i in., 2013; Hibi i in., 1997; Mendonca i in., 2004; Niemiec i in., 2008a; Ye i in., 2003]. Jednak badania przeprowadzone w innych populacjach nie potwierdziły istnienia takiej zależności [Ciećwierz i in., 1997; Foy i in., 1997; Jeunemaitre i in., 1997; Nakauchi i in., 1996; Qiu i in., 2007]. Potwierdzeniem słuszności w poszukiwaniu związku polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* ze stopniem zaawansowania CAD mogą być również wyniki wielu badań, w których wykazano pozytywną korelację tego polimorfizmu ze zgrubieniem wewnętrznych warstw ściany tętnicy szyjnej, mierzonym za pomocą wartości IMT (grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy), która stanowi

ważny marker wykrywania wczesnych zmian miażdżycowych określany w badaniu USG [Sayed - Tabatabaei i in., 2003].

3.9. Polimorfizm genu *AGTR1*

Gen kodujący receptor dla angiotensyny II typu pierwszego (*AGTR1*) zlokalizowany jest w długich ramionach chromosomu trzeciego (3q21-q25), składa się z pięciu eksonów i czterech intronów. Znanym polimorfizmem genu *AGTR1* jest substytucja adeniny na cytozynę w pozycji 1166 od miejsca startu transkrypcji genu (c.1080*86A>C, rs5186, w literaturze znany jako A1166C). Zmiana ta zlokalizowana jest w 3' UTR, cis - regulatorowym regionie genu, rozpoznawanym przez specyficzne microRNA - 155 (miR - 155). W obecności allele C zdolność wiązania miR - 155 do sekwencji regulatorowej jest obniżona, w skutek czego miR - 155 nie atenuuje dłużej translacji, co powoduje zwiększoną ekspresję genu [Martin i in., 2007]. W niektórych badaniach wykazano wzmożoną produkcję białka *AGTR1* u homozygot CC w porównaniu do heterozygot AC i homozygot AA [Ceolotto i in., 2011].

W pracach typu metaanaliza wykazano związek polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* z rozwojem nadciśnienia tętniczego [Wang i in., 2010]. Wyniki innych badań wskazują, że polimorfizm ten może również stanowić czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych [Freitas i in., 2008; Niemiec i in., 2008b; Xu i in., 2010]. Niewiele jest natomiast prac, w których badano związek tego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania choroby, autorzy niektórych publikacji opisali taką zależność [Nakauchi i in., 1996; Qiu i in., 2007], natomiast inni nie dostrzegli tej zależności [Gardemann i in., 1998; Gruchała i in., 1997; Jeunemaitre i in., 1997; Jia i in., 2012].

3.10. Polimorfizm genu *CYP11B2*

Locus genu kodującego syntazę aldosteronu (*CYP11B2*) zlokalizowany jest w długich ramionach chromosomu ósmego (8q21-q22), składa się z dziewięciu eksonów i ośmiu intronów. Jednym z częściej występujących polimorfizmów genu *CYP11B2* jest zmiana cytozyny na tyminę w obrębie sekwencji promotorowej genu (c.-344C>T, rs1799998, opisywany jako C-344T).

Region obejmujący ten polimorfizm uważany jest za jeden z punktów uchwytu białka regulatorowego, będącego ważnym czynnikiem transkrypcyjnym stymulującym ekspresję genu *CYP11B2*, zwanego czynnikiem steroidogenezy 1 (SF - 1) [Bodula i in., 2007]. Wykazano, że allel C wykazuje około 4 - krotne wyższe powinowactwo do białka SF - 1 w porównaniu z allelem T, w związku z tym allel C może być związany ze zwiększoną ekspresją genu *CYP11B2* [White i Rainey, 2005]. W niektórych pracach opisano zależność między występowaniem allela C i genotypu CC a podwyższonymi wartościami aldosteronu w osoczu krwi [Pojoga i in., 1998]. Natomiast inni badacze uważają, że w związku z tym, że w wyniku obecności allela T dochodzi do osłabionej zdolności wiązania białka SF - 1, to czyni go to bardziej dostępnym i ułatwia jego wiązanie się z innym, nie opisany jeszcze, ważnym w regulacji ekspresji genu *CYP11B2* miejscem. Opisano związek allela T z podwyższonym stężeniem aldosteronu w surowicy krwi, przy czym najwyższe wartości zanotowano u heterozygot a najniższe u homozygot CC [Paillard i in., 1999]. Wiadomo, iż polimorfizm c.-344C>T jako zmiana rejonu promotorowego może mieć związek ze zmianą ekspresji genu, natomiast dokładny mechanizm działania, w którym jeden z alleli wpływa na poziom produkcji syntazy aldosteronu wciąż pozostaje niewyjaśniony.

Polimorfizm c.-344C>T genu *CYP11B2*, jak dotąd najintensywniej badany był w nadciśnieniu tętniczym [Li i Liu, 2014; Sookoian i in., 2007], przy czym jedne źródła podają T [Casiglia i in., 2005], inne C allel [Tsukada i in., 2002] jako czynnik ryzyka rozwoju tego schorzenia. Znane są prace, w których z różnymi wnioskami, badano związek tego polimorfizmu z grubością płytki miażdżycowej tętnicy szyjnej [Sharma i Katz, 2010], z grubością kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych i udowych [Balkestein i in., 2002], z postępowaniem zmian miażdżycowych w naczyniach po wykonanym zabiegu pomostowania aortalno - wieńcowego [Ortlepp i in., 2001], z nawrotem zwężenia leczonej tętnicy po implantacji stentu [Ryu i in., 2002], z parametrami oceniającymi strukturę i funkcję lewej komory serca [Wang i in., 2014], czy z zawałem mięśnia sercowego [Hautanen i in., 1999; Patel i in., 2000] lub częstymi epizodami sercowo - naczyniowymi na podłożu miażdżycowym [Payne i in., 2004]. Zauważalna jest natomiast bardzo mała liczba doniesień

określających związek tego polimorfizmu z zachorowalnością na miażdżycę tętnic wieńcowych oraz ze stopniem jej zaawansowania [Jia i in., 2012].

4. CEL PRACY

Celem pracy było określenie związku czterech polimorfizmów genów kodujących białka układu renina - angiotensyna - aldosteron: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* ze stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych, wyrażonym za pomocą skali Gensiniego.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Materiały

5.1.1. Pacjenci

Badaną populację stanowiła grupa 1809 pacjentów I Kliniki Kardiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. n. med. A. Rynkiewicz; obecny kierownik: dr hab. n. med. M. Gruchała, prof. nadzw. GUMed). Pacjenci hospitalizowani byli w latach 2004 - 2007. U wszystkich przeprowadzono koronarografię w celu diagnozy lub kontynuacji leczenia CAD (kierownik projektu: dr hab. n. med. W. Sobiczewski; I Klinika Kardiologii UCK Gdańsk). W celu umożliwienia przeprowadzenia badań genetycznych, od wszystkich pacjentów pobrano próbki krwi, które następnie mrożono i transportowano do Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Limon), gdzie prowadzone były analizy molekularne. Koronarografię tętnic wieńcowych wykonano w Pracowni Kardiologii Inwazyjnej I Kliniki Kardiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (kierownik: dr n. med. D. Ciećwierz), według standardowo stosowanych metod. Zmiany miażdżycowe oceniane były przez dwóch niezależnych operatorów i opisane w formie wyniku angiograficznego. Podczas szczegółowych badań pacjentów, lekarze I Kliniki Kardiologii, zebrali niezbędne dane demograficzne i kliniczne dotyczące dotychczasowego przebiegu i leczenia chorób układu sercowo - naczyniowego oraz akumulacji czynników ryzyka rozwoju CAD. Pytano między innymi o: wiek, płeć, palenie tytoniu aktualne i w przeszłości, przebyte incydenty sercowo - naczyniowe (np. zawał mięśnia sercowego), przebyte inwazyjne zabiegi leczenia CAD (angioplastyka naczyń wieńcowych, implantacja stentów czy pomostowanie aortalno - wieńcowe), współistniejące choroby, przyjmowane leki. Dokonano pomiarów wzrostu, obwodu pasa oraz wagi pacjentów. Przy pomocy Holtera dokonano 24 godzinnego, monitorowanego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi. W Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku wykonano analizy biochemiczne takie jak: poziom glikemii na czczo oraz poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL i trójglicerydów, z których następnie wyliczono, z równania Friedewalda, poziom cholesterolu frakcji LDL.

Wskaźnik BMI wyliczany był jako masa ciała, wyrażona w kilogramach, dzielona przez kwadrat wysokości, wyrażony w metrach [kg/m²]. Jako osobę palącą obecnie określano osobę, która paliła tytoń w momencie włączenia do badania. Jako osobę palącą kiedykolwiek określano osobę, która paliła w przeszłości. Natomiast jako osobę niepalącą uznawano osobę, która nie paliła nigdy, ani w momencie włączenia do badania ani w przeszłości. Zawał mięśnia sercowego rozpoznawano na podstawie standardowych kryteriów: typowych objawów klinicznych i wzrostu markerów martwicy mięśnia sercowego dla zawału bez uniesienia odcinka ST oraz dodatkowo typowych zmian w zapisie elektrokardiograficznym dla zawału z uniesieniem odcinka ST. Cukrzycę diagnozowano, według kryteriów WHO, na podstawie poziomu glikemii na czczo oraz na podstawie wcześniejszego rozpoznania cukrzycy lub wdrożonego leczenia hipoglikemicznego. Leki używane w farmakoterapii choroby wieńcowej serca, hiperlipidemii, nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy były stosowane według obowiązujących standardów.

Wszyscy pacjenci wzięli świadomy udział w badaniu, zostali poinformowani o jego przebiegu i celu, podpisali zgodę uczestnictwa a cały projekt badawczy otrzymał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

U wszystkich 1809 pacjentów oznaczono warianty polimorficzne czterech genów kodujących białka układu renina - angiotensyna - aldosteron: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2*. Natomiast w celu przeprowadzenia badań określających związek wariantów polimorficznych badanych genów ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, ostateczne analizy statystyczne przeprowadzane były w grupie 647 pacjentów (368 mężczyzn, 279 kobiet), u których nigdy wcześniej nie przeprowadzano inwazyjnych metod leczenia CAD. Dzięki temu uzyskana grupa badawcza składała się wyłącznie z pacjentów, u których przeprowadzona koronarografia była ich pierwszą w życiu oceną stopnia zaawansowania miażdżycy.

5.1.1.1. Ocena stopnia zaawansowania CAD

Stopień zaawansowania CAD określany był przez lekarzy I Kliniki Kardiologii przy użyciu skali Gensiniego w oparciu o wyniki koronarografii. Do obliczeń użyto kalkulatora medycznego, dostępnego na podanej stronie internetowej: <http://www.medal.org/>. Skala Gensiniego to punktowa skala, bazująca na liczbie segmentów naczyń wieńcowych dotkniętych zmianami miażdżycowymi z uwzględnieniem stopnia zwężenia oraz umiejscowienia zmian [Gensini, 1983]. Analizując koronarogram, ocenia się procent każdego zaobserwowanego zwężenia opisanych segmentów naczyń wieńcowych. W następnym etapie danemu procentowi przyporządkowuje się odpowiednią wartość punktową. Punktacja przyznawana jest począwszy od zwężenia 25% i odpowiednio podwajana za każde zwiększenie stopnia okluzji (50%, 75%, 90%, 99%) aż do całkowitego zamknięcia światła tętnicy (100%). W tabeli 3 podano zasady przyznawania punktów, w zależności od procentu zwężenia naczynia wieńcowego, niezbędne do wyliczenia wartości parametru Gensiniego.

Tab. 3. Zasady przyznawania punktów, w zależności od procentu zwężenia naczynia wieńcowego, stosowane do obliczeń wartości parametru Gensiniego.

Punktacja	Zwężenie naczynia [%]
0	0
1	25
2	50
4	75
8	90
16	99
32	100

Następnie, w zależności od lokalizacji, a w związku z tym funkcjonalnego znaczenia tego zwężenia, mnoży się uzyskaną wcześniej wartość przez odpowiedni mnożnik (0.5; 1; 1.5; 2.5; 5). W tabeli 4 podano odpowiednie współczynniki, niezbędne do kalkulacji parametru Gensiniego, zależnie od umiejscowienia danego zwężenia w drzewie naczyniowym.

Tab. 4. Współczynniki stosowane do obliczeń wartości parametru Gensiniego, w zależności od lokalizacji zwężenia naczynia wieńcowego.

Wartość współczynnika	Segment lub gałąź	Tętnica wieńcowa
1	Segment proksymalny	Prawa
1	Segment środkowy	
1	Segment dystalny	
5	Pień lewej tętnicy wieńcowej	Lewa
2.5	LAD - segment proksymalny	
1.5	LAD - segment środkowy	
1	LAD - segment dystalny	
1	D1 - pierwsza gałąź diagonalna	
0.5	D2 - druga gałąź diagonalna	
2.5	Go - segment proksymalny	
1	Go - segment dystalny	
1	Gałąź brzegu tępego	
0.5	Gałąź posterolateralna	
1	Gałąź tylna zstępująca	Prawa lub lewa

Największe znaczenie dla hemodynamiki krążenia wieńcowego i najbardziej poważne kliniczne konsekwencje mają zwężenia w pniu lewej tętnicy wieńcowej, zwężenia te otrzymują więc najwięcej punktów (5 punktów). Minimalna wartość parametru Gensiniego wynosi zero jeśli nie znaleziono żadnego zwężenia powyżej 25% w żadnym z segmentów naczyń wieńcowych, natomiast wartość maksymalną osiąga w teoretycznej sytuacji, w której segmenty wszystkich naczyń byłyby zamknięte.

5.1.2. Aparatura

W tabeli 5 podano spis aparatury niezbędnej do wykonania analiz molekularnych opisanego projektu badawczego.

Tab. 5. Spis aparatury.

Firma	Nazwa
Applied Biosystems	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Termocykler GeneAmp PCR System 2400 ▪ Termocykler GeneAmp PCR System 2700 ▪ Termocykler GeneAmp PCR System 2720 ▪ Sekwencjator automatyczny Genetic Analyzer ABI PRISM 310
Bio Rad	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zestaw do elektroforezy agarozowej Sub Cell GT ▪ Zasilacz Power Pac 3000 ▪ Transiluminator Gel Doc 2000 ▪ System do archiwizacji żeli Gel Doc 2000 z oprogramowaniem Quantity One
Eppendorf	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Wirówka Mini Centrifuge ▪ Wirówka z chłodzeniem 5804R ▪ Wirówka Minispin plus ▪ Zestaw pipet automatycznych ▪ Termomikser Comfort ▪ Termocykler Mastercycler personal 96x0.2mL
IKA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stołowa wstrząsarka laboratoryjna (vortex)
Juan	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zamrażarka -80°C
Millipore	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aparat do oczyszczania i dejonizacji wody MilliQUF Plus
MJ - Research	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Termocykler PTC - 200 DNA Engine
NanoDrop Technologies	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spektrofotometr NanoDrop - 1000 zoprogramowaniem ND - 1000 v 3.1.2
Roche	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Termocykler LightCycler® 480 System
Thermo Electron Corporation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ciepłarka Heraeus Function Line B6
Vestrost	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chłodziarko - zamrażarka

5.1.3. Odczynniki

W tabeli 6 wymieniono odczynniki, które zostały użyte do przeprowadzenia badań molekularnych niezbędnych do wykonania opisanego projektu badawczego.

Tab. 6. Spis odczynników.

Firma	Odczynnik
A&A Biotechnology	<ul style="list-style-type: none">▪ Zestaw do usuwania terminatorów po reakcji sekwencjonowania, ExTerminator▪ Zestaw do izolacji genomowego DNA z krwi, bakterii, hodowli komórkowych i tkanek stałych, Genomic Midi AX
Applied Biosystems	<ul style="list-style-type: none">▪ Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit▪ 2.5x Sequencing Buffer▪ Polimer POP4▪ Master Mix SensiFAST™ Probe No - ROX Kit
DNA Gdańsk II	<ul style="list-style-type: none">▪ Marker wielkości M1
Fermentas	<ul style="list-style-type: none">▪ dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)▪ <i>Taq</i> Polimeraza (5 U/μl)▪ Bufor PCR▪ MgCl₂ 25 mM▪ Enzymy restrykcyjne (10 U/μl): <i>DdeI</i>, <i>BsuRI</i>▪ Bufory do enzymów restrykcyjnych
Genomed	<ul style="list-style-type: none">▪ Startery▪ Sondy TaqMan , znakowane grupą fluorescencyjną końcu 5', wygaszaczem na końcu 3'
ICN	<ul style="list-style-type: none">▪ Proteinaza K▪ Fenol, roztwór nasycony o pH=6.6 z buforem do kalibracji
Merck	<ul style="list-style-type: none">▪ Chloroform▪ Izopropanol
Omega	<ul style="list-style-type: none">▪ E.Z.N.A Gel Extraction Kit

POCH	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alkohol etylowy 96%
Prona	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agarozą
Sigma	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bromek etydyny ▪ Błękit bromofenolowy ▪ Cjanol ksylenu ▪ Glicerol ▪ Tris ▪ Kwas borny ▪ EDTA ▪ BSA ▪ SDS ▪ DMSO ▪ NaCl ▪ NaOH ▪ KHCO₃ ▪ NH₄Cl

5.1.4. Roztwory

W tabeli 7 podano skład roztworów użytych do przeprowadzenia analiz molekularnych wykonanych w ramach opisywanego projektu.

Tab. 7. Spis roztworów.

Roztwór	Skład
0.5 M, pH=0.8 EDTA (1000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 186.1 g EDTA ▪ uzupełnić ddH₂O ▪ kalibrować pH do 8.0 (NaOH)
5x bufor TBE (1000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 54 g Tris ▪ 27.5 g kwas borny ▪ 20 ml 0.5 M, pH=0.8 EDTA ▪ uzupełnić ddH₂O
6x bufor obciążający	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0.25 % błękit bromofenolowy ▪ 0.25% cyjanol ksylenu

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 30% glicerol w ddH₂O
Żel agarozowy 2%/3% (100ml)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 g agaroz (2%)/3 g agaroz (3%) ▪ 5 µl bromek etydy ▪ 100 ml 0.5x TBE
Bufor 5x RBC (500 ml)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20.73 g NH₄Cl ▪ 2.3 g KHCO₃ ▪ 10 ml 0.5 M pH=0.8 EDTA
NaCl - EDTA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0.58 g NaCl ▪ 0.19 g EDTA ▪ 10 ml ddH₂O

5.2. Metody

5.2.1. Izolacja materiału genetycznego

DNA izolowano z krwi obwodowej, przy użyciu metody fenol - chloroform oraz z wykorzystaniem gotowych zestawów do izolacji DNA (Genomic Midi AX).

W metodzie fenol - chloroform do rozmrożonej krwi dodawano 10 ml roztworu 1x RBC i inkubowano przez 10 min. w temp. -20°C. Następnie próbki wytrząsano i wirowano z prędkością 3320 x g w temp. 4°C przez 10 min. Po odwirowaniu zlewano supernatant i dolewano 5 ml roztworu 1x RBC, wytrząsano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Powyższą procedurę powtarzano kilkakrotnie, do momentu uzyskania białego osadu leukocytów. Do osadu dodawano 3 ml roztworu NaCl - EDTA, 500 µl SDS (10%) oraz 12 µl proteinazy K (20 ng/ml). Uzyskaną mieszaninę inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. W dalszym etapie do próbek dodawano po 3 ml fenolu (pH 7.9) i wytrząsano przez 30 min. Następnie wirowano z prędkością 3220 x g w temp. 4°C przez 15 min. Po usunięciu fazy wodnej dodawano 5 ml chloroformu i ponownie wytrząsano przez 30 min., po czym wirowano z prędkością 6300 x g w temp. 4°C przez 10 min. i ściągano fazę wodną. Procedurę tę powtarzano dwukrotnie. W celu precypitacji DNA dodawano 5 ml izopropanolu. Następnie próbki inkubowano przez noc w temp. -20 °C. W dalszym etapie próbki wirowano w 4°C przez 30 min., z prędkością 3320 x g. Osad w postaci DNA trzykrotnie płukano przez dodanie 70% etanolu i

wirowanie 10 min. w warunkach: 4°C, 20817 x g. Supernatant zlewano a DNA pozostawiano do wysuszenia. W końcowym etapie DNA zawieszano w ddH₂O.

Izolacja DNA za pomocą gotowych zestawów Genomic Midi AX, odbywała się wedle dołączonego do zestawu protokołu. W metodzie tej, po lizie komórek, próbki nanoszono na kolumny z membranami jonowymiennymi, które wyłapują DNA, podczas gdy większość zanieczyszczeń przechodzi nie wiążąc się. Po dodatkowym wypłukaniu resztek zanieczyszczeń, DNA wymywano z membran roztworem soli o wysokiej sile jonowej. Następnie DNA odsalano i zagęszczano w wyniku precypitacji alkoholowej. Osad DNA zawieszano w odpowiedniej ilości ddH₂O.

Po przeprowadzonej izolacji, za pomocą spektrofotometru, określano stężenie wyizolowanego DNA. Następnie DNA rozcieńczano za pomocą ddH₂O, do roboczego stężenia 30 ng/μl.

5.2.2. Elektroforeza agarozowa

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR oraz PCR - RFLP, przeprowadzano odpowiednio na 2% i 3% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydy. Produkty PCR, PCR - RFLP oraz marker wielkości, zawieszane w buforze obciążającym, nanoszono do studzienek w żelu i przeprowadzano elektroforezę przy stałym napięciu 140 V. Następnie dokonywano wizualizacji prążków w świetle UV, a uzyskany obraz archiwizowano z użyciem systemu do archiwizacji żeli Gel Doc 2000.

5.2.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Jednym z zastosowań techniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym (*real time PCR*) jest możliwość detekcji określonych zmian w sekwencji DNA. Możliwe jest to dzięki użyciu specyficznych, względem badanego miejsca polimorficznego, oligonukleotydowych sond, znakowanych cząsteczkami zdolnymi do emisji fluorescencji po wzbudzeniu (fluorochromami). Powszechnie używanymi są sondy typu TaqMan, które zawierają na końcu 5' znacznik fluorescencyjny, a na końcu 3' cząsteczkę wygaszającą fluorescencję. Sonda po związaniu się z komplementarną sekwencją DNA, jest degradowana na etapie wydłużania przez polimerazę Taq, posiadającą aktywność 5' - 3'

egzonukleazową. Dzięki temu fluorochrom ulega oddzieleniu od wygaszacza i możliwa staje się emisja fluorescencji.

5.2.3.1. Oznaczenie polimorfizmu genu *AGT*

Badanie polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* wykonane zostało przy pomocy techniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym, na aparacie LightCycler 480. Użyto starterów komplementarnych względem analizowanego odcinka: sensowny 5'-TGACAGGTTTCATGCAGGCTGTGAC-3', antysensowny 5'-AGAGCCAGCAGAGAGGTTTGCCT-3' oraz znakowanych sond hydrolizujących, komplementarnych do badanego miejsca polimorficznego: sonda komplementarna do allela C: 6-FAM-CTCCCTGACGGGAGCCAGTGTGGA-BHQ1, sonda komplementarna do allela T: Hex-CTCCCTGATGGGAGCCAGTGTGGAC-BHQ1. Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzane były w końcowej objętości 10 µl, skład mieszaniny przedstawiono w Tab. 8, a warunki temperaturowe w Tab. 9.

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do amplifikacja genu *AGT* metodą PCR w czasie rzeczywistym.

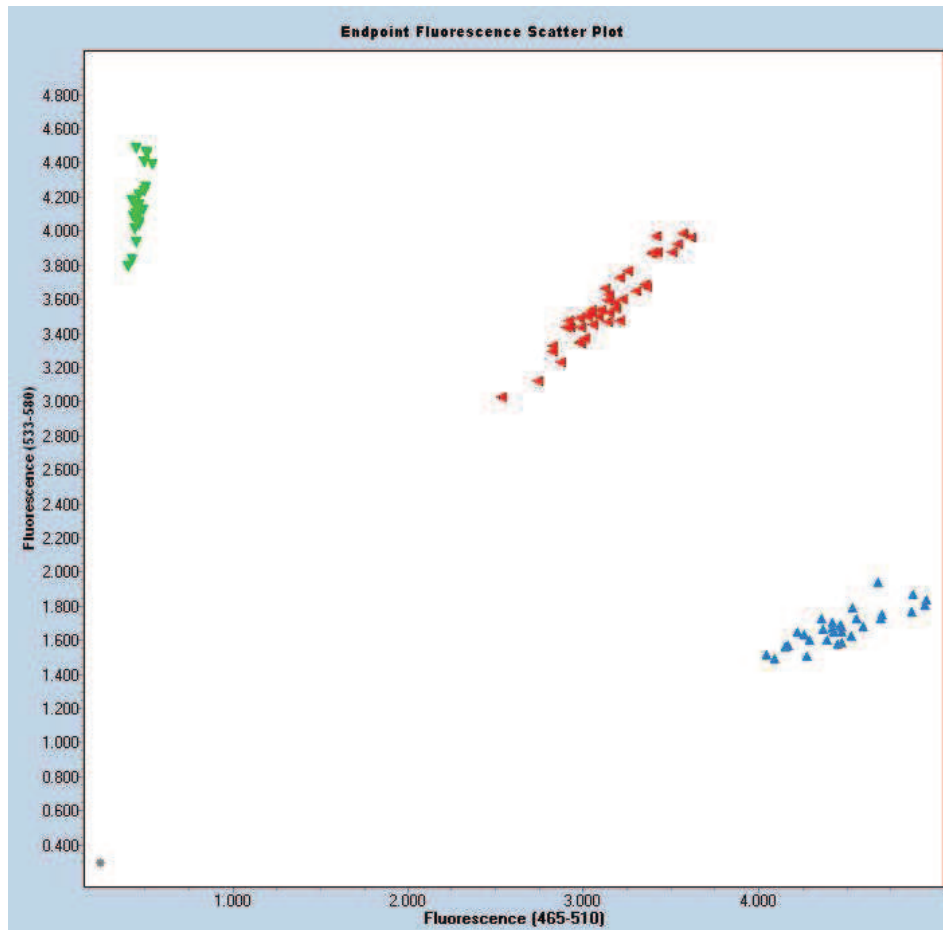
Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [µl]
Master Mix	5
ddH ₂ O	2
Starter sensowny [10 µM]	0.5
Starter antysensowny [10 µM]	0.5
Sonda komplementarna do allela C [100 µM]	0.005
Sonda komplementarna do allela T [100 µM]	0.005
DNA [30 ng/µl]	2

Tab. 9. Warunki temperaturowe reakcji PCR w czasie rzeczywistym genu *AGT*.

Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	10 min.	-
Denaturacja	95	15 sek.	50
Przyłączanie starterów	69	45 sek.	
Wydłużanie	72	30 sek.	

Każdą przeprowadzoną reakcję PCR w czasie rzeczywistym wykonywano wraz z trzema kontrolami pozytywnymi, stanowiącymi próbki każdego z trzech, oznaczonych wcześniej, genotypów oraz z jedną kontrolą negatywną czyli próbką bez dodatku DNA a z taką samą ilością ddH₂O. Na rycinie 5 przedstawiono przykładowy wynik amplifikacji genu *AGT* metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Ryc. 5. Przykładowy wynik reakcji PCR w czasie rzeczywistym genu *AGT*.



5.2.4. Reakcja sekwencjonowania

Aby potwierdzić poprawności oznaczonych genotypów polimorfizmu c.803T>C genu *AGT*, spośród całej badanej populacji, losowo wybrano 16 próbek w celu zsekwenowania odcinka genu, w którym zawarte jest badane miejsce polimorficzne. Wybrane próbki amplifikowano za pomocą reakcji PCR. Użyto starterów o sekwencjach: sensowny 5'-TGACAGGTTTCATGCAGGCTGTGAC-3', antysensowny 5'-AGAGCCAGCAGAGAGGTTTGCCT-3'. Reakcję PCR przeprowadzono w końcowej objętości 50 µl mieszaniny, której skład przedstawiono w Tab. 10, zaś profil temperaturowy w Tab. 11.

Tab. 10. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do amplifikacji genu *AGT* metodą PCR.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [µl]
Bufor 10x	5
MgCl ₂ [25 mM]	4
Starter sensowny [10 µM]	1
Starter antysensowny [10 µM]	1
dNTPs [5 mM]	5
ddH ₂ O	28.9
Taq [5 U/µl]	0.1
DNA [30 ng/µl]	5

Tab. 11. Warunki temperaturowe reakcji PCR genu *AGT*.

Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	5 mim.	-
Denaturacja	95	20 sek.	
Przyłączanie starterów	69	20 sek.	50
Wydłużanie	72	40 sek.	
Wydłużanie końcowe	72	5 min.	-

W wyniku amplifikacji badanego odcinka genu otrzymano produkty DNA o długości 130 pz, których obecność potwierdzana była za pomocą elektroforezy na 2% żelach agarozowych. Następnie wycięto, z żelu agarozowego bloczki zawierające badane fragmenty DNA i oczyszczono je przy użyciu gotowego zestawu E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, wedle dołączonego przez producenta protokołu. W dalszym etapie przeprowadzono reakcję sekwencjonowania oczyszczonego z żelu agarozowego produktu PCR, stosując starter sensowny. Skład mieszaniny (Tab. 12) oraz profil temperaturowy reakcji sekwencjonowania (Tab. 13) przedstawiono w odpowiednich tabelach.

Tab. 12. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji sekwencjonowania genu *AGT*.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
2.5x Sequencing Buffer	4
Big Dye	1
Starter sensowny [1μ M]	2
ddH ₂ O	10
Produkt reakcji PCR	3

Tab. 13. Warunki temperaturowe reakcji sekwencjonowania genu *AGT*.

Etap PCR	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja	96	10 sek.	25
Przyłączanie starterów	50	5 sek.	
Wydłużanie	60	4 min.	

W celu pozbycia się nadmiaru znakowanych dideoksynukleotydów, produkty reakcji sekwencjonowania oczyszczono, przy użyciu gotowego zestawu ExTerminator, wedle dołączonego do zestawu protokołu. Tak przygotowane próbki denaturowano w termocyklerze, w temp. 95 $^{\circ}$ C przez 3 min. i natychmiast schładzano do temp. do 4 $^{\circ}$ C. Próbkę analizowaną były w

automatycznym sekwenatorze Genetic Analyzer ABI PRISM 310. Sekwencje odczytywano przy filtrze E i zapisywano przy użyciu programu komputerowego ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0. Zebrane dane analizowano przy pomocy programu ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v. 3.4.

5.2.5. Reakcja PCR

Reakcje PCR (*Polymerase Chain Reaction*), przeprowadzane były w cienkościennych probówkach o pojemności 500 μ l. Kontrolę negatywną każdorazowo stanowiła próbka, do której zamiast DNA dodawano identyczną objętość ddH₂O.

5.2.5.1. Oznaczenie polimorfizmu genu *ACE*

Badanie polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* wykonano za pomocą techniki reakcji PCR, według zmodyfikowanej metody opisanej przez Rigata i współpracowników [Rigat i in., 1992]. Użyto starterów o sekwencjach: sensowny 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTT-3', antysensowny 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTC-3'. Reakcje PCR przeprowadzane były w końcowej objętości 10 μ l, skład mieszaniny przedstawiono w Tab. 14, a warunki temperaturowe w Tab. 15.

Tab. 14. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do amplifikacji genu *ACE* metodą PCR.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
Bufor 10x	1
MgCl ₂ [25 mM]	0.8
Starter sensowny [10 μ M]	0.2
Starter antysensowny [10 μ M]	0.2
dNTPs [2 mM]	1
ddH ₂ O	5.7
Taq [5 U/ μ l]	0.1
DNA [30 ng/ μ l]	1

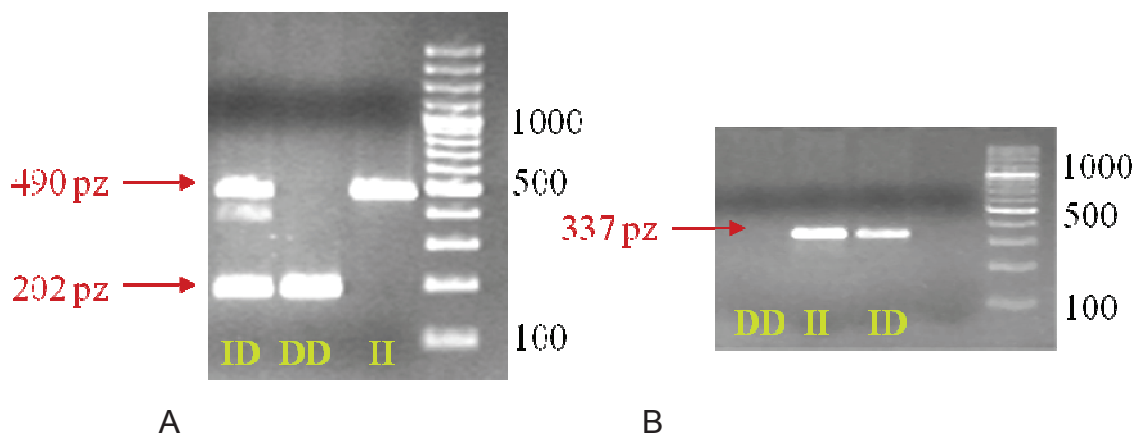
Tab. 15. Warunki temperaturowe reakcji PCR genu *ACE*.

Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	5 min.	-
Denaturacja	95	30 sek.	
Przyłączanie starterów	63	1 min.	30
Wydłużanie	72	2 min.	
Wydłużanie końcowe	72	15 min.	-

W wyniku reakcji PCR, uzyskiwano dwa, różnej długości produkty DNA: produkt pierwszy o długości 490 pz, stanowiący allel insercyjny (allel I) oraz produkt drugi o długości 202 pz, stanowiący allel delecyjny (allel D). Produkty te zidentyfikowano w świetle UV, po przeprowadzonej elektroforezie na 2% żelach agarozowych, barwionych bromkiem etydyny. Przykładowy wynik reakcji PCR, ukazujący trzy możliwe układy alleli w analizie polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* przedstawiono na Ryc. 6A.

Ponieważ allel delecyjny, jako krótszy w porównaniu z allelem insercyjnym, mógł być preferencyjnie amplifikowany w przeprowadzonej reakcji PCR, istniała możliwość błędnego zakwalifikowania heterozygoty ID jako homozygoty DD. Aby uniknąć ewentualnego błędu, wszystkie wstępnie zidentyfikowane jako homozygoty DD próbki, zweryfikowano w kolejnej reakcji PCR, przeprowadzonej ze starterami specyficznymi względem sekwencji allela insercyjnego (starter sensowny: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3', starter antysensowny: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3'), na podstawie metody opisanej przez zespół Lindpaintnera [Lindpaintner i in., 1995]. Reakcja ta przeprowadzana była w warunkach opisanych wcześniej w odpowiednich tabelach (Tab. 14 i 15), natomiast z dodatkiem 10% dimetylsulfoxide (DMSO). W przypadku obecności allela I (heterozygota ID) otrzymywano produkt reakcji PCR o długości 337 pz, który po przeprowadzonej elektroforezie na 2% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny, zidentyfikowany był w świetle UV. Natomiast w przypadku homozygoty DD, nie uzyskiwano żadnego produktu DNA. Reakcję PCR ze starterami specyficznymi do sekwencji allela insercyjnego, zawsze wykonywano stosując jako kontrolę

pozytywną, wcześniej oznaczone próbki o genotypie ID i DD. Przykładowy obraz żelu, po reakcji PCR ze starterami specyficznymi do sekwencji allele insercyjnego badanego polimorfizmu genu *ACE*, pokazano na Ryc. 6B.



Ryc. 6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w analizie polimorfizmu genu *ACE* (A). Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla allele insercyjnego polimorfizmu genu *ACE* (B).

5.2.6. Reakcja PCR – RFLP

W technice PCR - RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism*) wykorzystuje się fakt, iż zmiana w materiale genetycznym może powodować powstanie lub eliminację miejsca cięcia dla specyficznego enzymu restrykcyjnego. Pierwszym etapem metody jest amplifikacja badanego fragmentu DNA techniką PCR, w dalszej kolejności przeprowadza się cięcie, otrzymanego po reakcji PCR, produktu DNA z wykorzystaniem odpowiedniego enzymu restrykcyjnego.

5.2.6.1. Oznaczenie polimorfizmu genu *AGTR1*

Polimorfizm c.1080*86A>C genu *AGTR1* oznaczany był za pomocą zmodyfikowanej metody PCR - RFLP, opracowanej przez Katsuya i współautorów [Katsuya i in., 1995]. Do reakcji amplifikacji badanego fragmentu genu *AGTR1* użyto starterów o sekwencjach: sensowny 5'-GGATGTATTGATTCAACTAGGCATC-3', antysensowny 5'-AAAGTCGGTTCAGTCCACATAATGC-3'. Reakcja PCR przeprowadzana była

w końcowej objętości 20 μ l mieszaniny, której skład podano w Tab. 16 a profil temperaturowy reakcji opisano w Tab. 17.

Tab. 16. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do amplifikacji genu *AGTR1* metodą PCR.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
Bufor 10x	2
MgCl ₂ [25 mM]	1,6
Starter sensowny [10 μ M]	0.4
Starter antysensowny [10 μ M]	0.4
dNTPs [2 mM]	2
ddH ₂ O	11.45
Taq [5 U/ μ l]	0.15
DNA [30 ng/ μ l]	2

Tab. 17. Warunki temperaturowe reakcji PCR genu *AGTR1*.

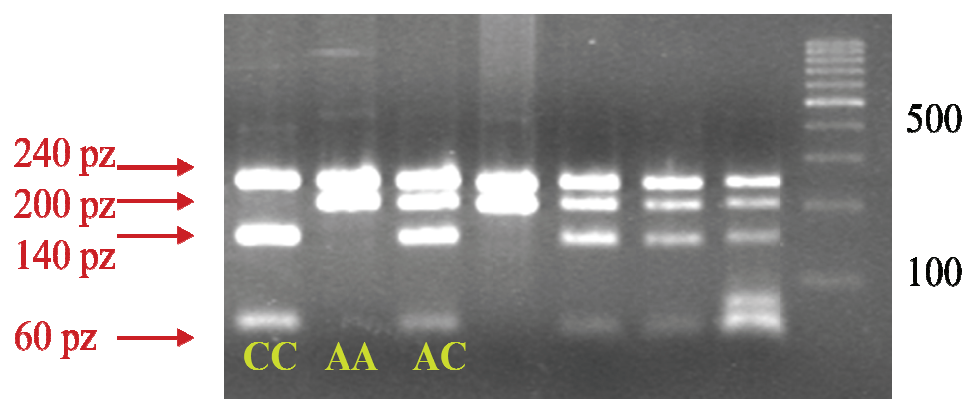
Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	5 min.	-
Denaturacja	95	30 sek.	
Przyłączanie starterów	58	30 sek.	35
Wydłużanie	72	1 min.	
Wydłużanie końcowe	72	10 min.	-

W wyniku reakcji PCR uzyskiwano produkty DNA o długości 437 pz, które następnie trawiono przy użyciu enzymu restrykcyjnego *HpyF3I* (*DdeI*), przez 18 godzin, w temp. 37 °C (Tab. 18).

Tab. 18. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do trawienia produktów PCR genu *AGTR1*.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
Bufor 10x Buffer Tango	2
HpyF3I (DdeI) [10 U/ μ l]	0.2
ddH ₂ O	2.8
Produkt reakcji PCR	20

Po reakcji trawienia, otrzymywano produkty PCR - RFLP o długościach: 240 pz, 200 pz dla genotypu AA; 240 pz, 200 pz, 140 pz, 60 pz dla genotypu AC oraz 240 pz, 140 pz, 60 pz dla genotypu CC. Produkty PCR rozdzielane były na 2%, natomiast produkty PCR - RFLP na 3%, żelach agarozowych. Przykładowy elektroforogram, ukazujący możliwe układy alleli polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* przedstawiono na Ryc. 7.



Ryc. 7. Rozdział elektroforotyczny produktów reakcji PCR - RFLP w analizie polimorfizmu genu *AGTR1*.

5.2.6.2. Oznaczenie polimorfizmu genu *CYP11B2*

Polimorfizm c.-344C>T genu *CYP11B2* oznaczany był za pomocą metody PCR - RFLP. Do amplifikacji badanego fragmentu genu użyto starterów o sekwencjach: sensowny 5'-CTGTGGTGGAGGGTGTACCT-3' antysensowny

5'-TCCAGGGCTGAGAGGAGTAA-3'). Reakcja PCR przeprowadzana była w mieszaninie o końcowej objętości 25 μ l, skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. 19, a warunki temperaturowe reakcji w Tab. 20.

Tab. 19. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do amplifikacji genu *CYP11B2* metodą PCR.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
Bufor 10x	2.5
MgCl ₂ [25 mM]	1.5
Starter sensowny [10 μ M]	1
Starter antysensowny [10 μ M]	1
dNTPs [2 mM]	2.5
ddH ₂ O	15.4
Taq [5 U/ μ l]	0.1
DNA [30 ng/ μ l]	1

Tab. 20. Warunki temperaturowe reakcji PCR genu *CYP11B2*.

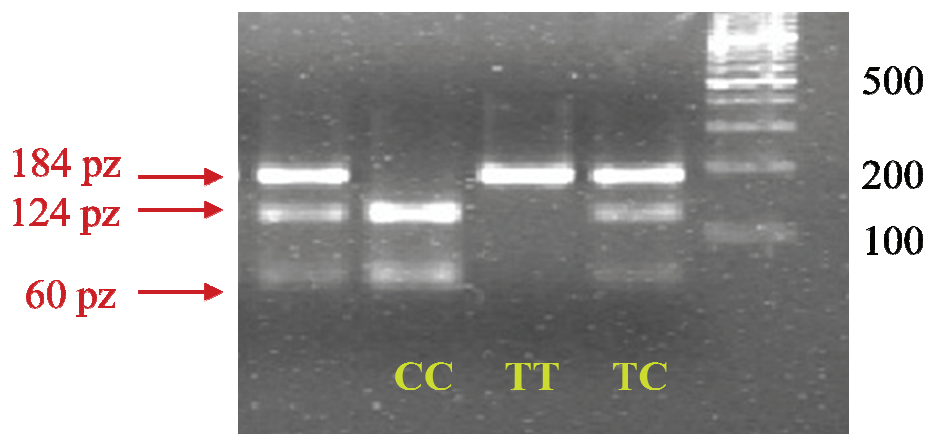
Etap PCR	Temperatura [°C]	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	5 min.	-
Denaturacja	95	30 sek.	
Przyłączanie starterów	59	30 sek.	35
Wydłużanie	72	20 sek.	
Wydłużanie końcowe	72	7 min.	-

Produkty PCR o długości 184 pz, trawione były z użyciem enzymu restrykcyjnego *BsuRI* (*HaeIII*), w mieszaninie reakcyjnej zawierającej dodatek albuminy bydlęcej (BSA), przez 18 godzin, w temp. 37 °C (Tab. 21).

Tab. 21. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do trawienia produktów PCR genu *CYP11B2*.

Skład mieszaniny	Objętość na próbkę [μ l]
Bufor 10x Buffer R	2
<i>BsuRI</i> (<i>HaeIII</i>) [10 U/ μ l]	0.2
ddH ₂ O	2.5
BSA	0.3
Produkt reakcji PCR	10

W wyniku trawienia otrzymywano produkty DNA o długościach: 124 pz, 60 pz dla genotypu CC; 184 pz, 124 pz, 60 pz dla genotypu TC oraz 184 pz dla genotypu TT. Produkty PCR rozdzielane były na 2%, natomiast produkty PCR - RFLP na 3%, żelach agarozowych. Przykładowy elektroforogram, ukazujący trzy możliwe układy alleli polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2*, przedstawiono na Ryc. 8.



Ryc. 8. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR - RFLP w analizie polimorfizmu genu *CYP11B2*.

5.2.7. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne przeprowadzone były w grupie 647 pacjentów. Wyniki dotyczące zmiennych ciągłych podano jako mediany. Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym oceniano stosując test Shapiro - Wilka. Równowaga prawa Hardego - Weinberga, dla każdego z badanych genotypów, sprawdzana była za pomocą testu χ^2 . Związek analizowanych polimorfizmów ze stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych badany był za pomocą testu Kruskala - Wallisa (dla porównania trzech genotypów) oraz testu Wilcoxon (dla porównania par genotypów) wraz z poprawką Bonferroniego, stosowaną przy wielokrotności porównań. Za wartość istotną statystycznie przyjmowano wartość $P < 0.05$. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzane były przy użyciu programu SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

6. WYNIKI

Rozkłady genotypów wszystkich czterech analizowanych polimorfizmów genów kodujących białka RAAS: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* nie różniły się od rozkładów przewidywanych przez prawo Hardy - Weinberga.

Rozkład zmiennych opisujących parametr Gensiniego nie był zgodny z rozkładem normalnym i nie udało się go znormalizować stosując szereg transformacji, dlatego zastosowane w niniejszej rozprawie metody statystyczne to metody nieparametryczne.

Dla 242 pacjentów wartość parametru Gensiniego wynosiła 0 oznacza to, że pacjenci ci nie mieli żadnego zwężenia powyżej 25% w uwidocznionych podczas koronarografii tętnicach wieńcowych.

Mediana parametru Gensiniego w badanej populacji wynosiła 10, przy czym w grupie kobiet wartość ta była dużo niższa (mediana parametru Gensiniego wynosiła 0), w porównaniu z wartością w grupie mężczyzn (mediana parametru Gensiniego wynosiła 26). W tabeli 22 przedstawiono mediany, kalkulowane na podstawie wartości parametru Gensiniego, dla grup pacjentów podzielonych w zależności od akumulacji wybranych czynników ryzyka rozwoju CAD, w populacji ogólnej oraz oddzielnie dla kobiet i mężczyzn.

Tab. 22. Stopień zaawansowania CAD w zależności od akumulacji wybranych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy [Borzyszkowska i in., 2012].

		Parametr Gensiniego *		
		Wszyscy	Mężczyźni	Kobiety
		10 (0-48) (647)	26 (0-61) (368)	0 (0-28) (279)
Palenie papierosów	Niepalący	0 (0-31) (240)	18 (0-53) (75)	0 (0-16) (165)
	Palący w przeszłości	20 (0-56) (304)	28 (2-68) (220)	4 (0-40) (84)
	Palący obecnie	18.5 (0-52) (84)	32 (2-62) (62)	5 (0-32) (22)

Przebyty zawał serca	Nie	2 (0-30) (433)	9.5 (0-42) (222)	0 (0-14) (211)
	Tak	40 (11-86) (213)	46 (22-97) (145)	28 (0-56) (68)
BMI	≤ 26	10 (0-48) (213)	31 (2-58) (113)	0 (0-27) (100)
	> 26	10 (0-48) (434)	25 (0-66) (255)	0 (0-28) (179)
Wiek	≤ 55	2 (0-32) (233)	18 (0-52) (87)	0 (0-16) (146)
	> 55	20 (0-56) (414)	28 (2-69) (281)	4 (0-40) (133)
Cukrzyca	Nie	8 (0-47) (495)	25 (0-60) (282)	0 (0-14) (213)
	Tak	25.5 (3-52.5) (152)	29 (5-62) (86)	20.5 (0-44) (66)
Cholesterol całkowity	≤ 200 mg/dl	8 (0-44) (409)	24 (0-58) (249)	0 (0-20) (160)
	> 200 mg/dl	16 (0-52) (238)	32 (7-62) (119)	3 (0-40) (119)
Cholesterol LDL	≤ 130 mg/dl	9 (0-46) (482)	27 (0-64.5) (288)	0 (0-20) (194)
	> 130 mg/dl	14 (0-49) (165)	22.5 (4-56) (80)	5 (0-41) (85)
Cholesterol HDL	> 40 mg/dl	14 (0-53) (205)	30 (0-67.5) (124)	0 (0-32) (81)
	≤ 40 mg/dl	9 (0-47) (442)	23 (0-57.5) (244)	0 (0-25) (198)
Trójglicerydy	≤ 150 mg/dl	7 (0-44) (473)	25 (0-58) (261)	0 (0-22) (212)
	> 150 mg/dl	20 (0-56) (174)	30 (6-62) (107)	4 (0-41) (67)

* Mediana parametru Gensiniego (25ty-75ty kwartył) (N).

W populacji ogólnej, bez podziału na podgrupy, nie znaleziono żadnego istotnego statystycznie związku między polimorfizmami badanych genów: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* a stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych, wyrażonym za pomocą skali Gensiniego.

Dlatego też w dalszej części analiz, badano związek wymienionych polimorfizmów ze stopniem zaawansowania CAD, w grupach stworzonych przez podział populacji, w zależności od akumulacji głównych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy, to jest: płci, wieku (dla kobiet $>$, \leq 65 lat; dla mężczyzn $>$, \leq 55 lat), zwyczaju palenia papierosów obecnie i w przeszłości, zawału mięśnia sercowego w wywiadzie, wartości ciśnienia tętniczego krwi (sDBPd $>$, \leq 95 mm Hg; sSBPd $>$, \leq 160 mm Hg), zachorowalności na cukrzycę, wartości BMI ($>$, \leq 26), wartości obwodu pasa (otyłość brzuszna; dla kobiet $>$, \leq 80 cm; dla mężczyzn $>$, \leq 94 cm), poziomu cholesterolu całkowitego ($>$, \leq 200 mg/dl), poziomu cholesterolu LDL ($>$, \leq 130 mg/dl), poziomu cholesterolu HDL ($>$, \leq 40 mg/dl) oraz poziomu trójglicerydów ($>$, \leq 150 mg/dl). Dodatkowo wszystkie wyżej wymienione analizy przeprowadzone były oddzielnie w populacji kobiet oraz mężczyzn. Poniżej opisano wyniki analiz dokonanych dla każdego z badanych polimorfizmów.

6.1. Polimorfizm genu *AGT*

Nie znaleziono żadnego istotnego statystycznie związku polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, wyrażonym za pomocą skali Gensiniego, w populacji ogólnej, jak również stosując podziały na podgrupy, w zależności od akumulacji głównych czynników ryzyka rozwoju CAD. W tabeli 23 podano wyniki analiz dotyczących związku polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* ze stopniem zaawansowania CAD, w grupach kobiet i mężczyzn, podzielonych w zależności od wartości: cholesterolu całkowitego ($>$, \leq 200 mg/dl), cholesterolu LDL ($>$, \leq 130 mg/dl) oraz cholesterolu HDL ($>$, \leq 40 mg/dl).

Tab. 23. Polimorfizm c.803T>C genu *AGT* a stopień zaawansowania CAD.

Genotyp <i>AGT</i>		Parametr Gensiniego *			P Kruskal -Wallis
		CC	CT	TT	
Cholesterol całkowity ≤ 200 mg/dl	Wszyscy	4 (0-51) (92)	8 (0-40) (194)	10 (0-43) (116)	0.91
	Mężczyźni	22 (0-82) (59)	20 (0-56) (123)	30 (2-58) (63)	0.88
	Kobiety	0 (0-8) (33)	0 (0-20) (71)	0 (0-36) (53)	0.79
Cholesterol całkowity > 200 mg/dl	Wszyscy	7 (0-48) (55)	14 (0-48.5) (124)	25 (0-66) (53)	0.25
	Mężczyźni	16 (0-56) (27)	32 (8-65) (59)	35 (7-72) (30)	0.55
	Kobiety	2.5 (0-32.5) (28)	2 (0-30) (65)	9 (0-66) (23)	0.54
Cholesterol LDL ≤ 130 mg/dl	Wszyscy	4 (0-50) (113)	9 (0-42.5) (232)	17 (0-48) (130)	0.46
	Mężczyźni	21.5 (0-72) (70)	27 (0-56) (140)	33 (5-68) (74)	0.63
	Kobiety	0 (0-7) (43)	0 (0-21) (92)	0 (0-38) (56)	0.52
Cholesterol LDL > 130 mg/dl	Wszyscy	10.5 (0-48) (34)	12.5 (0-48) (86)	20 (0-56) (39)	0.96
	Mężczyźni	23 (0-47) (14)	25 (8-84) (42)	20 (0-52) (19)	0.51
	Kobiety	5.5 (0-48) (18)	4 (0-30) (44)	16.5 (0-61) (20)	0.53
Cholesterol HDL > 40 mg/dl	Wszyscy	4 (0-39) (104)	10 (0-45) (226)	18 (0-56) (103)	0.21
	Mężczyźni	16 (0-56) (55)	28 (5.5-56.5) (120)	35.5 (0-72) (62)	0.28
	Kobiety	2 (0-16) (49)	0 (0-24) (106)	0 (0-40) (41)	0.86
Cholesterol HDL ≤ 40 mg/dl	Wszyscy	19 (0-98) (43)	14 (0-51.5) (92)	14 (0-42) (66)	0.70
	Mężczyźni	38 (0-116) (31)	23 (0-58) (62)	32 (6-44) (31)	0.32
	Kobiety	0 (0-6) (12)	2 (0-26) (30)	0 (0-41) (35)	0.44

* Mediana parametru Gensiniego (25ty-75ty kwartył) (N).

6.2. Polimorfizm genu ACE

Znaleziono istotny statystycznie związek między polimorfizmem c.2306-105_392ins288 genu ACE a stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, określonym przy użyciu skali Gensiniego, u mężczyzn mających wysoki poziom cholesterolu całkowitego (> 200 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.008$; $P_{\text{IvsDallel}}=0.0023$; $P_{\text{adjusted}}=0.009$), wysoki poziom cholesterolu LDL (> 130 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.016$; $P_{\text{IvsDallel}}=0.007$; $P_{\text{adjusted}}=0.028$) oraz niski poziom cholesterolu HDL (< 40 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.04$; $P_{\text{IvsDallel}}=0.0138$; $P_{\text{adjusted}}=0.055$) [Borzyszkowska i in., 2012]. Najwyższe wartości parametru Gensiniego zaobserwowano u nosicieli allele D badanego polimorfizmu. W tabeli 24 podano wyniki analiz dotyczących związku polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu ACE ze stopniem zaawansowania CAD, w grupach kobiet i mężczyzn, podzielonych w zależności od wartości cholesterolu: całkowitego ($>$, ≤ 200 mg/dl), LDL ($>$, ≤ 130 mg/dl) oraz HDL ($>$, ≤ 40 mg/dl).

Tab. 24. Polimorfizm c.2306-105_392ins288 genu ACE a stopień zaawansowania CAD [Borzyszkowska i in., 2012].

Genotyp ACE		Parametr Gensiniego *			P Kruskal- Wallis
		DD	ID	II	
Cholesterol całkowity ≤ 200 mg/dl	Wszyscy	4 (0-44) (83)	8 (0-44) (205)	14 (0-41.5) (112)	0.24
	Mężczyźni	9.5 (0-57) (50)	25 (0-72) (122)	28.5 (2-53) (70)	0.29
	Kobiety	0 (0-20) (33)	0 (0-16) (83)	2.5 (0-36) (42)	0.46
Cholesterol całkowity > 200 mg/dl	Wszyscy	26.5 (0-58) (64)	17 (0-54) (100)	4.5 (0-39) (68)	0.09
	Mężczyźni	37.5 (14-70) (34)	35 (10-80) (51)	7 (0-38) (30)	0.008^a
	Kobiety	3 (0-48) (30)	0 (0-25) (49)	2.5 (0-48) (38)	0.74
Cholesterol LDL ≤ 130 mg/dl	Wszyscy	4 (0-44) (103)	9.5 (0-47.5) (236)	10.5 (0-43.5) (132)	0.42
	Mężczyźni	16 (0-58) (61)	32 (2-72) (138)	28.5 (1-53) (80)	0.32
	Kobiety	0 (0-20) (42)	0 (0-14) (98)	1 (0-37) (52)	0.52

Cholesterol LDL > 130 mg/dl	Wszyscy	32 (0-63) (44)	16 (0-49) (69)	5.5 (0-38) (48)	0.07
	Mężczyźni	37 (11-60) (23)	25 (2-84) (35)	7 (0-34) (20)	0.016^b
	Kobiety	6 (0-66) (21)	4 (0-28) (34)	4.5 (0-44) (28)	0.75
Cholesterol HDL > 40 mg/dl	Wszyscy	3 (0-38) (38)	17.5 (0-54) (106)	26 (0-53) (56)	0.32
	Mężczyźni	26 (0-44) (21)	30 (0-85) (67)	38 (10-66) (33)	0.34
	Kobiety	0 (0-22) (17)	2 (0-34) (39)	0 (0-32) (23)	0.78
Cholesterol HDL ≤ 40 mg/dl	Wszyscy	11 (0-55) (109)	9 (0-46) (199)	6 (0-40) (124)	0.54
	Mężczyźni	25 (4-60) (63)	31.5 (6-72) (106)	10 (0-40) (67)	0.040^c
	Kobiety	0 (0-45) (46)	0 (0-14) (93)	3 (0-40) (57)	0.24

* Mediana parametru Gensiniego (25ty-75ty kwartył) (N).

^a Wartości testu Wilcoxon: $P_{IivsDD}=0.0056$ dla porównania ACE II vs. DD; $P_{IDvsDD}=0.91$ dla ID vs. DD; $P_{IDvsII}=0.008$ dla ID vs. II, $P_{IivsDallel}=0.0023$ dla II vs. D allele.

^b Wartości testu Wilcoxon: $P_{IivsDD}=0.007$ dla porównania ACE II vs. DD; $P_{IDvsDD}=0.51$ dla ID vs. DD; $P_{IDvsII}=0.03$ dla ID vs. II, $P_{IivsDallel}=0.007$ dla II vs. D allele.

^c Wartości testu Wilcoxon: $P_{IivsDD}=0.08$ dla porównania ACE II vs. DD; $P_{IDvsDD}=0.60$ dla ID vs. DD; $P_{IDvsII}=0.014$ dla ID vs. II, $P_{IivsDallel}=0.0138$ dla II vs. D allele.

Nie znaleziono innego, istotnego statystycznie związku polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych w populacji ogólnej, ani w żadnej innej analizowanej podgrupie.

6.3. Polimorfizm genu *AGTR1*

Nie znaleziono żadnego istotnego statystycznie związku polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, wyrażonym za pomocą wartości parametru Gensiniego, zarówno w populacji ogólnej, jak i w populacji podzielonej na grupy, w zależności od akumulacji wybranych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy [Borzyszkowska i in., 2012]. W tabeli 25 podano wyniki analiz badających korelację polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* ze stopniem zaawansowania CAD, w grupach

kobiet i mężczyzn, podzielonych w zależności od wartości: cholesterolu całkowitego (>, ≤ 200 mg/dl), cholesterolu LDL (>, ≤ 130 mg/dl) oraz cholesterolu HDL (>, ≤ 40 mg/dl).

Tab. 25. Polimorfizm c.1080*86A>C genu *AGTR1* a stopień zaawansowania CAD.

Genotyp <i>AGTR1</i>		Parametr Gensiniego *			P Kruskal -Wallis
		AA	AC	CC	
Cholesterol całkowity ≤ 200 mg/dl	Wszyscy	6 (0-44) (201)	10 (0-41) (169)	7 (2-56) (33)	0.54
	Mężczyźni	22 (0-64) (115)	24 (0-54) (107)	36 (4-98) (23)	0.42
	Kobiety	0 (0-23) (86)	0 (0-20) (62)	0 (0-4) (10)	0.74
Cholesterol całkowity > 200 mg/dl	Wszyscy	10 (0-52) (111)	21 (0-56) (105)	4 (0-30) (17)	0.18
	Mężczyźni	20 (2-56) (59)	37 (11-84) (50)	10 (0-48) (7)	0.10
	Kobiety	1 (0-43.5) (52)	3 (0-40) (55)	2 (0-16) (10)	0.85
Cholesterol LDL ≤ 130 mg/dl	Wszyscy	6.5 (0-44) (234)	14 (0-47.5) (204)	6 (0-50) (37)	0.75
	Mężczyźni	19 (0-62) (131)	32 (0-69) (127)	32 (4-67) (25)	0.48
	Kobiety	0 (0-32) (103)	0 (0-19) (77)	0 (0-4) (12)	0.37
Cholesterol LDL > 130 mg/dl	Wszyscy	10.5 (0-52) (78)	17 (0-48) (70)	6 (0-30) (13)	0.68
	Mężczyźni	25 (2-58) (43)	22.5 (8-48) (30)	10 (0-48) (5)	0.84
	Kobiety	0 (0-45) (35)	8.5 (0-44) (40)	5 (0-23) (8)	0.61
Cholesterol HDL > 40 mg/dl	Wszyscy	10 (0-52) (93)	20 (0-54) (92)	14.5 (1-58.5) (16)	0.85
	Mężczyźni	26 (0-58) (55)	32 (0-80) (55)	23.5 (3-86.5) (12)	0.72
	Kobiety	1 (0-34) (38)	0 (0-22) (37)	2 (0-22) (4)	0.93
Cholesterol HDL ≤ 40 mg/dl	Wszyscy	8 (0-48) (219)	10.5 (0-44) (182)	6 (0-38) (34)	0.81
	Mężczyźni	18 (0-60) (119)	25 (0-56) (102)	34 (3-57) (18)	0.83
	Kobiety	0 (0-26.5) (100)	0 (0-27.5) (80)	0 (0-6) (16)	0.68

* Mediana parametru Gensiniego (25ty-75ty kwartył) (N).

6.4. Polimorfizm genu *CYP11B2*

Znaleziono istotną statystycznie wartość $P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.018$ dla związku stopnia zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, mierzonego za pomocą skali Gensiniego, z polimorfizmem c.-344C>T genu *CYP11B2* wśród kobiet mających wysoki poziom cholesterolu frakcji LDL (> 130 mg/dl) [Borzyszkowska i in., 2012]. Natomiast po zastosowaniu poprawki Bonferroniego dla wielokrotnych porównań, wartość ta nie była już znamienne statystycznie ($P_{\text{CCvsTallel}}=0.045$; $P_{\text{adjusted}}=0.18$).

Nie znaleziono innego, istotnego statystycznie związku polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* ze stopniem zaawansowania choroby w populacji badanej jako całość, jak również w żadnej innej analizowanej podgrupie. W tabeli 26 podano wyniki analiz dotyczących korelacji badanego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD, w grupach kobiet i mężczyzn, podzielonych w zależności od wartości poziomu cholesterolu całkowitego (>, ≤ 200 mg/dl), cholesterolu LDL (>, ≤ 130 mg/dl) oraz cholesterolu HDL (>, ≤ 40 mg/dl).

Tab. 26. Polimorfizm c.-344C>T genu *CYP11B2* a stopień zaawansowania CAD.

Genotyp <i>CYP11B2</i>		Parametr Gensiniego *			P Kruskal-Wallis
		CC	TC	TT	
Cholesterol całkowity ≤ 200 mg/dl	Wszyscy	10 (0-37) (84)	6 (0-48) (225)	19 (0-44) (95)	0.89
	Mężczyźni	18 (0-40) (53)	30 (0-72) (132)	26 (0-58) (61)	0.64
	Kobiety	3 (0-26) (31)	0 (0-16) (93)	0 (0-38) (34)	0.80
Cholesterol całkowity > 200 mg/dl	Wszyscy	27.5 (0-64) (46)	10 (0-48) (124)	16 (0-52) (63)	0.48
	Mężczyźni	33.5 (10-52) (20)	31 (7-56) (65)	32.5 (1-85) (32)	0.92
	Kobiety	6.5 (0-66) (26)	0 (0-21) (59)	4 (0-40) (31)	0.27
Cholesterol LDL ≤ 130 mg/dl	Wszyscy	8.5 (0-38) (96)	7 (0-52) (263)	16 (0-50) (117)	0.81
	Mężczyźni	19 (0-47) (55)	30.5 (0-68) (154)	28 (2-68) (75)	0.60
	Kobiety	0 (0-20) (41)	0 (0-20) (109)	0 (0-32) (42)	0.75

Cholesterol LDL > 130 mg/dl	Wszyscy	33.5 (5-64) (34)	8 (0-48) (86)	16 (0-46) (41)	0.14
	Mężczyźni	28.5 (10-52) (18)	25 (6-56) (43)	15 (0-84) (18)	0.91
	Kobiety	44.5 (0-72.5) (16)	0 (0-17) (43)	25 (0-40) (23)	0.018^a
Cholesterol HDL > 40 mg/dl	Wszyscy	19.5 (0-56) (36)	9.5 (0-42.5) (112)	32 (0-56) (53)	0.36
	Mężczyźni	20 (2-97) (21)	11 (0-53.5) (72)	47 (26-88) (30)	0.08
	Kobiety	19 (0-56) (15)	0 (0-22) (40)	0 (0-38) (23)	0.46
Cholesterol HDL ≤ 40 mg/dl	Wszyscy	10 (0-41) (94)	8 (0-52) (237)	13 (0-40) (105)	0.99
	Mężczyźni	22 (4-45.5) (52)	34 (2-72) (125)	16 (0-52) (63)	0.16
	Kobiety	4 (0-40) (42)	0 (0-15) (112)	3.5 (0-40) (42)	0.27

* Mediana parametru Gensiniego (25ty-75ty kwartył) (N).

^a Wartości testu Wilcoxon: $P_{CCvsTT}=0.23$ dla porównania *CYP11B2* c.-344C>T CC vs. TT; $P_{TTvsTC}=0.029$ dla TT vs. TC; $P_{CCvsTC}=0.027$ dla CC vs. TC, $P_{CCvsTallel}=0.045$ dla CC vs. T allel.

7. DYSKUSJA

Zarówno indukcja, jak i progresja miażdżycy są złożonymi zjawiskami, w których uczestniczą liczne, sprzężone ze sobą procesy takie jak: zaburzenia funkcji śródbłonna, aktywacja płytek krwi, oksydacja i agregacja lipoprotein, przekształcanie makrofagów w komórki piankowe, proliferacja komórek mięśni gładkich, zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej, proces zapalny i wykrzepianie [Rafieian - Kopaei i in., 2014]. Mimo gwałtownego spadku umieralności z powodu chorób układu sercowo - naczyniowego, w Polsce po roku 1991, miażdżyca nadal pozostaje jednym z głównych problemów opieki medycznej zarówno w kraju [Bandosz i in., 2012], jak i w większości państw Unii Europejskiej [Nichols i in., 2014] oraz w Stanach Zjednoczonych [Roger i in., 2012]. Miażdżyca naczyń wieńcowych jest więc problemem zdrowotnym o zasięgu nie tylko ogólnopolskim, ale również światowym. Dlatego niezwykle istotne wydają się być badania związane identyfikacją czynników predysponujących do zachorowania na CAD. W prewencji chorób układu krążenia, określanie indywidualnych czynników ryzyka u konkretnego pacjenta jest istotnym elementem w tzw. strategii wysokiego ryzyka. Strategia ta polega na aktywnym wyszukiwaniu osób zagrożonych zachorowaniem na CAD i objęciu ich jak najwcześniej właściwą opieką medyczną [Podolec i in., 2006]. Dzięki intensywnemu rozwojowi nauki ostatnich lat dowiedziono, iż czynniki genetyczne mogą predysponować do rozwoju i progresji chorób układu sercowo - naczyniowego, zarówno bezpośrednio, jak i w skojarzeniu z innymi czynnikami patogennymi [Sayols - Baixeras i in., 2014]. Oczywiście stała się, więc konieczność poszerzenia badań dotyczących podłoża miażdżycy tętnic wieńcowych, o poszukiwania czynników genetycznych, predysponujących do rozwoju tej choroby.

Celem pracy było określenie związku polimorfizmów czterech genów kodujących białka układu renina - angiotensyna - aldosteron: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344 C>T *CYP11B2* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, u 647 pacjentów po angiograficznej ocenie stanu tętnic wieńcowych.

Ogromna większość publikacji opisujących badania związku polimorfizmów różnych genów z miażdżycą naczyń wieńcowych, to prace typu

case - control. Polegają one na porównaniu częstości występowania określonych alleli danego genu, w grupie osób obciążonych chorobą, w porównaniu ze zdrowymi osobami, stanowiącymi grupę kontrolną. Prace te określają jedynie związek danego polimorfizmu z wystąpieniem choroby. Ograniczeniem sporej części prac tego typu, jest dokonywanie podziału na grupy osób z CAD i osoby zdrowe, tylko na podstawie wywiadu w kierunku dolegliwości sercowo - naczyniowych, czy przebytego incydentu sercowo - naczyniowego, bez wcześniejszego wykonania koronarografii, oceniającej rzeczywisty stan tętnic wieńcowych u badanych osób. Innymi zaś badaniami, są badania związku polimorfizmów genów ze stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych. W tego typu badaniach, w większości opublikowanych prac, dominującą metodą jest określanie różnic w częstości alleli między grupami pacjentów z jedno-, dwu- lub trzynaczyniową (niekiedy również czteronaczyniową) chorobą wieńcową. Za kryterium przyjmowane są, zależnie od publikacji, zwężenia powyżej 50, 70 lub 75% w jednej z głównych tętnic wieńcowych. Metoda ta, nie oddaje jednak w pełni rzeczywistej skali i złożoności opisu stopnia zaawansowania choroby. Dużo lepszym rozwiązaniem jest zamiana sposobu opisu stanu naczyń wieńcowych, ze zmiennej dwudzielnej (badania typu *case - control*) czy wielodzielnej (badania z podziałem na jedno-, dwu- lub trzynaczyniową CAD) na zmienną ciągłą, określaną przez specjalne skale wyrażające stopień zaawansowania zmian miażdżycowych.

Z przeglądu literatury, dotyczącej sposobu opisu nasilenia zmian miażdżycowych tętnic wieńcowych wynika, iż najczęściej stosowanymi skalami są skale: Jenkinsa, 'jeopardy', Leamana oraz Gensiniego.

W skali Jenkinsa dokonuje się podziału tętnic wieńcowych na 8 proksymalnych segmentów, natomiast zwężenia w dystalnych segmentach są pomijane ze względu na trudności w oszacowaniu ich rzeczywistych konsekwencji w niedokrwieniu mięśnia sercowego [Jenkins i in., 1978]. Parametr ten stanowi sumę punktów przyznanych każdemu segmentowi, w zależności od stopnia jego maksymalnego zwężenia (0-25% - 0 pkt., 26-50% - 1 pkt., 51-75% - 2 pkt., 76-99% - 3 pkt., 100% - 4 pkt.). Wskaźnik stopnia zaawansowania CAD w tej klasyfikacji przyjmuje wartości od zera do dwunastu. Skala ta nie zawiera informacji o funkcjonalnym znaczeniu miejsca zwężenia, a

oceniany jest jedynie procent zwężenia, niezależnie od jego umiejscowienia w systemie naczyń wieńcowych.

Skala 'jeopardy' natomiast, określa obszar mięśnia sercowego zagrożonego niedokrwieniem [Dash i in., 1977]. Opiera się ona na podziale tętnic wieńcowych na sześć segmentów. Wszystkie segmenty położone za $\geq 70\%$ zwężeniem (lub za $\geq 50\%$ zwężeniem w przypadku lewego pnia), otrzymują po dwa punkty. Skala ta, w zależności od stopnia nasilenia miażdżycy naczyń wieńcowych, przybiera więc wartości od zera do dwunastu. Jest to dobrze zwalidowana i często używana skala oceny zaawansowania CAD, jej ograniczeniem natomiast może być to, że nie uwzględnia ona różnic w przyznawanych punktach, w zależności od stopnia zwężenia, a jedynie określa jego obecność lub brak, przy określonym kryterium granicznym ($\geq / < 70\%$; $\geq / < 50\%$).

Inną skalą, jest skala Leamana, która uwzględnia podział naczyń wieńcowych na 15 segmentów. Każdemu zwężeniu w danym segmencie przypisuje się pewną wartość, zależną od lokalizacji zwężenia (przy czym wartości te są różne dla lewej i prawej tętnicy wieńcowej, ponieważ tętnice te mają różny udział w zaopatrywaniu w krew lewej komory serca) [Leaman i in., 1981]. Wartość ta mnożona jest przez odpowiedni mnożnik, różny w zależności od stopnia zwężenia (70-89% - 1, 90-99% - 3, 100% - 5). Stosując, do opisu stopnia zaawansowania CAD skalę Leamana, pomijamy małe i średnie zwężenia naczyń, skupiając się tylko na pacjentach, z już w znacznym stopniu zaawansowaną miażdżycą (zwężenia powyżej 70%).

W niniejszej pracy, do opisu stopnia zaawansowania CAD zastosowano skalę Gensiniego. Jest to najczęściej stosowana skala opisująca stan tętnic wieńcowych i posiada największą liczbą cytowań w MEDLINE i Google Scholar, w porównaniu z innymi znanymi skalami [Neeland i in., 2012]. Skala Gensiniego podobnie jak skala Leamana, oprócz określenia stopnia zwężenia danego segmentu, dodatkowo zawiera informację o jego umiejscowieniu, nadając mu odpowiednią wagę w zależności od jego anatomicznego położenia, w całym systemie naczyń wieńcowych [Gensini, 1983]. Dodatkowo, w odróżnieniu od skali Leamana, skala Gensiniego uwzględnia zwężenia w tętnicach wieńcowych w szerokim zakresie, od 25 do 100%.

Wszystkie wymienione wyżej skale opisujące stopień zaawansowania CAD, w tym skala Gensiniego, opierają się na ocenie zwężenia naczyń wieńcowych uwidacznianych za pomocą koronarografii. Badanie to jest powszechnie i najczęściej stosowanym badaniem oceny stanu światła tętnic wieńcowych. Alternatywą do koronarografii może być kosztowniejsza, nowoczesna ultrasonografia wewnątrznaczyniowa (IVUS). Jest to inwazyjne badanie ultrasonograficzne, polegające na wprowadzeniu do światła naczynia miniaturowej głowicy ultrasonograficznej, emitującej ultradźwięki, umożliwiającej zobrazowanie, zarówno światła naczynia, jak i samej ściany tętnicy wieńcowej. Celem pracy zespołu Neelanda było wzajemnie porównanie różnych, najczęściej cytowanych w literaturze, skal opisujących stopień zaawansowania CAD (między innymi wymienionych tu skal: Jenkinsa, 'jeopardy', Gensiniego) oraz ocena czy dostarczają one porównywalnych danych, do wyników opartych na badaniu IVUS [Neeland i in., 2012]. Dowiedziono, że skale te wykazują wzajemny, wysoki stopień korelacji oraz opisywany przez nie stopień zaawansowania CAD, określony na podstawie wyników koronarografii, dobrze koreluje z opisem stopnia zaawansowania CAD, bazującym na wynikach IVUS. Dane opisywane za pomocą skali Gensiniego uzyskały jedną z najwyższych wartości współczynnika korelacji z wynikami opartymi na IVUS (ρ 0.75; $P < 0.0001$), w porównaniu z innymi, dziewięcioma badanymi skalami stopnia zaawansowania miażdżycy (najwyższą wartość uzyskała, nie opisana tu, skala CASS-50: ρ 0.76; $P < 0.0001$, natomiast najniższą skala 'jeopardy': ρ 0.50; $P=0.003$). W oparciu o przegląd fachowej literatury, uzasadnionym wyborem wydaje się więc być wykorzystanie powszechnie używanej skali, jaką jest skala Gensiniego, do opisu stopnia zaawansowania CAD badanej w niniejszej rozprawie grupy pacjentów.

Początkowo, w opisywanym projekcie udział wzięło 1809 pacjentów I Kliniki Kardiologii UCK, u których przeprowadzono elektrywną koronarografię i określono warianty polimorficzne czterech badanych genów. Natomiast do badań stopnia zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych wybrano ostateczną grupę 647 osób (368 mężczyzn, 279 kobiet), u których nie przeprowadzono nigdy wcześniej żadnych inwazyjnych metod leczenia CAD (angioplastyka wieńcowa, implantacja stentów czy pomostowanie aortalno - wieńcowe), a wykonana koronarografia była ich pierwszym w życiu badaniem

opisującym stan tętnic wieńcowych. W związku z tym, aktualny stopień zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, u wszystkich pacjentów w badanej grupie, był wynikiem rzeczywistego wpływu czynników ryzyka związanych z rozwojem miażdżycy, a nie rezultatem jakichkolwiek ingerencji chirurgicznych.

W badanej populacji znajdowały się zarówno osoby z wysokimi wartościami parametru Gensiniego, co oznacza daleko posuniętą miażdżycę naczyń wieńcowych, jak i osoby u których wartość czynnika Gensiniego wynosiła zero, co świadczy o braku istotnych zwężeń (powyżej 25%) w naczyniach wieńcowych. Podkreślić należy, iż brak punktów w skali Gensiniego nie oznacza braku jakichkolwiek zwężeń w tętnicach wieńcowych badanych pacjentów czy brak diagnozy choroby niedokrwiennej serca, a jedynie brak zwężeń powyżej 25%. Populacja uwzględniająca zarówno osoby z niewielkimi, jak i poważnymi zmianami w naczyniach wieńcowych odzwierciedla naturalną skalę nasilenia choroby i stanowi dobrą grupę badawczą do poszukiwania korelacji między danym czynnikiem genetycznym a stopniem zaawansowania CAD.

Układ renina - angiotensyna - aldosteron jest biochemicznym szlakiem odpowiedzialnym za regulację wartości ciśnienia tętniczego krwi. W wielu pracach opisano, że jego nadmierna aktywacja przyczyniać się może do rozwoju nadciśnienia oraz innych powikłań sercowo - naczyniowych, w tym miażdżycy [Bodula i in., 2007; Gruchała i in., 2000; Jacoby i Rader, 2003]. W związku z tym, że poszczególne, biologicznie aktywne składowe tego szlaku takie jak Ang II i aldosteron wykazują szerokie promiażdżycowe działanie, układ ten stanowi dobry przedmiot badań w poszukiwaniu markerów genetycznych wpływających na ekspresję genów czy produkcję białek RAAS, które mogą mieć związek z wystąpieniem lub nasilaniem się miażdżycy. Przedmiotem badań w niniejszej pracy były polimorfizmy czterech genów, kodujących najważniejsze białka RAAS. Gen *AGT* koduje angiotensynogen - białko stanowiące pierwotny substrat w szlaku, *ACE* koduje enzym konwertujący angiotensynę I - dzięki jego aktywności powstaje Ang II, *AGTR1* koduje receptor dla angiotensyny II typu pierwszego - umożliwia biologiczną aktywność Ang II, natomiast *CYP11B2* koduje syntazę aldosteronu - enzym syntetyzujący aldosteron.

Analiza, badanej w niniejszej rozprawie populacji, bez zastosowania podziałów w zależności od akumulacji wybranych czynników ryzyka rozwoju CAD, nie wykazała istotnego statystycznie związku między żadnym z analizowanych polimorfizmów genów: c.803T>C *AGT*, c.2306-105_392ins288 *ACE*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* a stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych. Brak asocjacji polimorfizmu danego genu z progresją CAD w populacji ogólnej tłumaczyć można faktem, iż miażdżycza jest chorobą wieloczynnikową, w której trudno jest oszacować wpływ jaki wywiera tylko jeden wybrany czynnik ryzyka, jakim jest jeden polimorfizm genu, na przebieg schorzenia o tak złożonej etiopatogenezie. Nie wykluczone jest również istnienie integracji podłoża genetycznego miażdżycy naczyń wieńcowych z innymi czynnikami, które mogą maskować lub ujawniać osobniczą predyspozycję do rozwoju zmian miażdżycowych o wysokim stopniu zaawansowania. W takim wypadku obraz kliniczny choroby jest wykładnikiem oddziaływania poszczególnych wariantów genów z określonymi czynnikami środowiskowymi.

W związku z tym, że nie znaleziono asocjacji między analizowanymi polimorfizmami a stopniem zaawansowania CAD w populacji badanej jako całość, dalsze analizy statystyczne prowadzone były w podgrupach stworzonych przez podział populacji w zależności od akumulacji najczęstszych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych, to jest: płci, wieku (dla kobiet >, ≤ 65 lat; dla mężczyzn >, ≤ 55 lat), zwyczaju palenia papierosów obecnie i w przeszłości, zawału mięśnia sercowego w wywiadzie, wartości ciśnienia tętniczego krwi (sDBPd >, ≤ 95 mm Hg; sSBPd >, ≤ 160 mm Hg), zachorowalności na cukrzycę, wartości BMI (>, ≤ 26), wartości obwodu pasa (otyłość brzuszna; dla kobiet >, ≤ 80 cm; dla mężczyzn >, ≤ 94 cm), poziomu cholesterolu całkowitego (>, ≤ 200 mg/dl), poziomu cholesterolu LDL (>, ≤ 130 mg/dl), poziomu cholesterolu HDL (>, ≤ 40 mg/dl) oraz poziomu trójglicerydów (>, ≤ 150 mg/dl). Dodatkowo dla wszystkich wyżej wymienionych czynników ryzyka przeprowadzono analizy stosując podział w zależności od płci. Poniżej przedstawiono omówienie uzyskanych wyników, oddzielnie dla każdego badanego polimorfizmu genetycznego.

Znaczenie enzymu ACE w etiologii miażdżycy jest dobrze udokumentowane. Bierze on udział w zarówno fizjologicznej jak i

patofizjologicznej konwersji Ang I do jej biologicznie aktywnej postaci Ang II. Jest to główny enzym determinujący stężenie Ang II w ścianach naczyń krwionośnych układu sercowo - naczyniowego. Ang II jest jednym z najbardziej efektywnych regulatorów ciśnienia krwi, wpływa również na utrzymanie homeostazy wodno - elektrolitowej organizmu, powoduje pobudzenie współczulnego układu nerwowego oraz biosyntezę aldosteronu. Ponadto wpływa na szereg sprzyjających powstawaniu miażdżycy mechanizmów, w tym na: dysfunkcję i apoptozę komórek śródbłonna, utlenianie lipoprotein, produkcję cytokin prozapalnych, aktywację monocytów i makrofagów, proliferację komórek mięśni gładkich, agregację i adhezję płytek krwi czy syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej [Jacoby i Rader, 2003]. Poziom enzymu ACE w surowicy krwi zależny jest od insercyjno - delecyjnego polimorfizmu (c.2306-105_392ins288), położonego w 16 intronie genu kodującego to białko. Wykazano że homozygoty DD charakteryzują się najwyższymi wartościami ACE w porównaniu z homozygotami II i heterozygotami ID [Rigat i in., 1990]. W niektórych pracach wykazano, że chroniczny wpływ wysokich wartości Ang II u nosicieli allela D genu *ACE* może mieć związek z rozwojem choroby niedokrwiennej serca [Agerholm - Larsen i in., 2000]. Natomiast wyniki pracy Ohishi i współpracowników świadczą o tym, że zwiększona produkcja enzymu ACE jest związana z progresją CAD [Ohishi i in., 1997]. W pracy tej badano segmenty naczyń wieńcowych uzyskanych z sekcji zwłok pacjentów, którzy chorowali na miażdżycę. W segmentach naczyń pozbawionych zmian miażdżycowych, produkcja ACE zachodziła w komórkach śródbłonna, natomiast w segmentach dotkniętych zmianami miażdżycowymi dochodziło do nadmiernej produkcji ACE w makrofagach oraz komórkach mięśni gładkich powstałej płytki miażdżycowej. W podobnej pracy, autorzy opisują, że głównym źródłem tkankowego ACE w płytkach miażdżycowych są rejony bogate w komórki zapalne takie jak makrofagi oraz, że akumulacja ACE w zwężonych naczyniach wieńcowych może powodować wzmożoną produkcję lokalnej Ang II, która bierze udział w mechanizmie powstawania miażdżycy, a enzym ACE zlokalizowany w płytce miażdżycowej jest najprawdopodobniej celem działania leków będących inhibitorami ACE [Diet i in., 1996].

W wielu badaniach wykazano, że leki będące inhibitorami ACE, są z powodzeniem stosowane w terapii pacjentów chorujących na miażdżycę

naczyń wieńcowych [Voors i in., 2006]. W literaturze, często opisywane są różnice w skuteczności leczenia związkami farmakologicznymi antagonizującymi RAAS, w zależności od genotypu ACE pacjenta. W badaniach Scharplata i wsp. zaobserwowano lepszą odpowiedź na leczenie inhibitorami ACE u pacjentów będących homozygotami DD w porównaniu z homozygotami II, w przebiegu schorzeń układu sercowo - naczyniowego [Scharplatz i in., 2005]. W badaniu kontrolowanym angiograficznie również wykazano, że genotyp polimorfizmu ACE wpływa na efekt leczenia miażdżycy. Wśród chorych z genotypem DD wykazano istotnie większą redukcję stężenia cholesterolu LDL i apolipoproteiny B oraz mniejszy stopień progresji zmian miażdżycowych u pacjentów po ponad dwuletnim leczeniu inhibitorami ACE [Marian i in., 2000]. Wyniki wymienionych wyżej badań, sugerują wyraźny związek polimorfizmu genu ACE z miażdżycą naczyń wieńcowych i jej progresją.

W niniejszej pracy, analiza polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu ACE wykazała istnienie istotnego statystycznie związku allele D badanego polimorfizmu, ze stopniem zaawansowania CAD, u mężczyzn mających wysoki poziom cholesterolu całkowitego (> 200 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.008$; $P_{\text{IIvsDalleI}}=0.0023$; $P_{\text{adjusted}}=0.009$), wysoki poziom cholesterolu LDL (> 130 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.016$; $P_{\text{IIvsDalleI}}=0.007$; $P_{\text{adjusted}}=0.028$) oraz niski poziom cholesterolu HDL (< 40 mg/dl) ($P_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.04$; $P_{\text{IIvsDalleI}}=0.0138$; $P_{\text{adjusted}}=0.055$). Wyniki te sugerują, iż efekty promiażdżycowego działania Ang II są bardziej zauważalne, jeśli są dodatkowo spotęgowane przez inne obciążające organizm mechanizmy, takie jak długotrwała ekspozycja na czynniki sprzyjające powstawaniu miażdżycy.

W szeregu publikacji, dotyczących związku polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu ACE z rozwojem i progresją zmian miażdżycowych, opisano istniejącą asocjację tego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD. W pracy badającej Polską populację, liczącą 172 pacjentów z potwierdzoną w badaniu koronarograficznym wczesną CAD (pacjenci w wieku między 30 a 55 lat) stwierdzono, że badany polimorfizm ma związek ze stopniem zaawansowania CAD oraz, że allel D sprzyja powstawaniu licznych i krytycznych zwężeń w systemie naczyń wieńcowych [Niemić i in., 2008a]. Stopień nasilenia choroby określono w tej pracy na podstawie obecności

zwężenia (ponad 50%) w przynajmniej jednej z czterech badanych naczyń wieńcowych (podział na jedno -, dwu -, trzy - i czteronaczyniową CAD) oraz na podstawie obecności krytycznego zwężenia (ponad 90%) w systemie naczyń wieńcowych. W tak zaprojektowanym badaniu nie uwzględnia się lokalizacji i funkcjonalnego znaczenia danej zmiany. W pracy tej badano pacjentów z już zdiagnozowaną CAD, którzy byli poddani koronarografii z powodu wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego, czyli wystąpienia znacznych zmian w krążeniu wieńcowym, powodujących ograniczenie lub ustanie przepływu krwi. Podobnie w innej pracy, autorzy wykazali związek polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* ze stopniem zaawansowania CAD, u 296 pacjentów po zawale mięśnia sercowego lub z miażdżycą naczyń wieńcowych, potwierdzoną w badaniu koronarograficznym [Mendonca i in., 2004]. Progresję miażdżycy określono za pomocą zmodyfikowanej skali Leamana, punktowane były zwężenia powyżej 75%, inaczej niż w skali Gensiniego, gdzie przypisywane są punkty zwężeniom już od 25% redukcji ich średnicy. Również w badaniu przeprowadzonym na większej populacji, liczącej 1162 pacjentów z angiograficznie potwierdzoną CAD, zauważono że allel D polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* ma związek ze stopniem zaawansowania miażdżycy [Ye i in., 2003]. Stopień nasilenia CAD określony był na podstawie liczby segmentów naczyń wieńcowych (spośród 15 wyznaczonych), zwężonych w zakresie od 5 do 75%. Stosując tę skalę, pomijano zatem zmiany o wysokim stopniu zaawansowania choroby. W literaturze znajdują się także prace opisujące korelację badanego polimorfizmu z nasilaniem się zmian miażdżycowych, w innych niż tętnice wieńcowe naczyniach krwionośnych. W obszernej metaanalizie, porównano wyniki 23 publikacji, określających związek polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej (IMT) tętnicy szyjnej [Sayed - Tabatabaei i in., 2003]. Zauważono, iż korelacja allela D z badanym parametrem jest dużo wyraźniejsza w grupie pacjentów o wysokim stopniu ryzyka zachorowania na CAD. W prawie połowie prac badających populacje wysokiego ryzyka wykazano istotny statystycznie związek polimorfizmu genu *ACE* z IMT tętnicy szyjnej, gdzie w grupach niskiego ryzyka tylko w jednej spośród piętnastu prac wykazano taką zależność. Autorzy tej publikacji wyznaczają kierunek postępu przyszłych badań dotyczących etiopatogenezy miażdżycy na grupy wysokiego

ryzyka rozwoju chorób sercowo - naczyniowych. Również wyniki niniejszej pracy wskazują, że progresja CAD, oprócz podłoża genetycznego zależna jest także od innych czynników ryzyka, takich jak płeć i profil lipidowy danego pacjenta.

Znane są prace opisujące różnice w aktywności RAAS u kobiet i mężczyzn wynikające z wpływu hormonów kortykosteroidowych na funkcjonowanie tego systemu. W przeglądowym artykule z 2013 roku, wynotowano główne różnice w fizjologii RAAS w zależności od płci [Hilliard i in., 2013]. Hormony płci wpływają na poziom ekspresji poszczególnych białek systemu, ale także powodują różnice w odpowiedzi na stymulację i inhibicję układu. U kobiet odpowiedni poziom estrogenów wpływa na zmniejszenie syntezy reniny, ACE, AGTR1, oraz zwiększenie syntezy AGT i AGTR2, którego stymulacja wywiera przeciwstawne efekty do promiażdżycowych działań wynikających z pobudzenia receptora AGTR1. W związku z tym u kobiet może dochodzić do zmniejszenia ciśnienia tętniczego krwi w wyniku aktywacji innego niż u mężczyzn receptora dla Ang II. Dzięki temu mechanizmowi możliwe jest utrzymanie fizjologicznych wartości ciśnienia tętniczego u ciężarnych kobiet przy podwojonej objętości krwi i zwiększonej wydolności serca. U mężczyzn zaś testosteron stymuluje ekspresję genu *AGT* oraz powoduje zwiększoną aktywność reniny i pobudzenie receptora AGTR1. Na podstawie podsumowania zawartego w tym artykule można wnioskować, że główne różnice w funkcjonowaniu RAAS wynikają z regulowanej hormonalnie aktywacji różnych receptorów dla Ang II u kobiet i u mężczyzn. Również autorzy metaanalizy, opisującej wyniki 118 publikacji typu *case - control* (łącznie 43733 pacjentów i 82606 osób z grupy kontrolnej), zauważają zależny od płci efekt badanego polimorfizmu na ryzyko zachorowania na CAD [Zintzaras i in., 2008]. Wyniki tej analizy wykazały pozytywną asocjację polimorfizmu genu *ACE* z miażdżycą naczyń wieńcowych, w szczególności w pewnych wyselekcjonowanych grupach pacjentów, w tym wśród mężczyzn. Analiza publikacji włączonych w tę obszerną metaanalizę wykazała, że wśród kobiet polimorfizm c.2306-105_392ins288 genu *ACE* nie był istotnie związany z zachorowalnością na CAD, natomiast u mężczyzn zależność ta była bardzo wysoka. W sześciu, spośród jedenastu prac badających potencjalny wpływ płci na zależne od polimorfizmu c.2306-105_392ins288 zwiększone ryzyko CAD, znaleziono

pozytywny związek tylko u mężczyzn, w czterech nie znaleziono takiej zależności u obu płci, natomiast w jednej opisano taką zależność zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn. W publikacji typu *case - control* badano związek pięciu polimorfizmów w trzech genach kodujących białka RAAS (w tym: c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1* oraz c.2306-105_392ins288 *ACE*) z zachorowalnością na CAD [Freitas i in., 2008]. Polimorfizmem, który okazał się mieć związek z miażdżycą był polimorfizm c.2306-105_392ins288 genu *ACE*, jednakże po podziale populacji na kobiety i mężczyzn zależność ta była widoczna już tylko w grupie mężczyzn. Również w pracach badających związek tego polimorfizmu z nadciśnieniem tętniczym wykazano różnice w zależności od płci badanych grup pacjentów. W populacji liczącej 3095 osób wykazano znamiennej związek nadciśnienia z genotypem DD wśród mężczyzn i brak takiego związku u kobiet [O'Donnell i in., 1998]. Podobne wyniki uzyskano w populacji liczącej 5014 osób, gdzie opisywany polimorfizm związany był z podwyższonym ryzykiem rozwoju nadciśnienia tętniczego tylko u mężczyzn [Higaki i in., 2000].

Oprócz związku z płcią, wyraźny jest również wpływ gospodarki lipidowej na korelację polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z miażdżycą tętnic wieńcowych. W wielu badaniach potwierdzono, że niewyrównany profil lipidowy, wpływa na funkcjonowanie RAAS, głównie przez stymulację syntezy poszczególnych białek układu. Hipercholesterolemia powoduje wzrost stężenia *AGT* oraz *Ang II* w osoczu krwi [Daugherty i in., 2004], jak również wpływa na znaczny wzrost ekspresji receptora *AGTR1* [Putnam i in., 2012]. Dodatkowo oksydowany *LDL* zwiększa ekspresję białka *ACE* w komórkach śródbłonna tętnic wieńcowych [Li i in., 2003]. W pracy Orena i wsp., zbadano różnice w częstości alleli polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* u zdrowych mężczyzn oraz określono korelacje trzech różnych wariantów genotypowych z niektórymi czynnikami ryzyka rozwoju CAD [Oren i in., 1999]. Opisano najwyższe wartości cholesterolu *LDL* u homozygot *DD*, pośrednie u heterozygot *ID*, a najniższe u homozygot *II*. W pracy typu *case - control*, badającej 400 mężczyzn populacji polskiej, opisano wpływ badanego polimorfizmu na rozwój choroby wieńcowej serca oraz jego korelacje z wybranymi czynnikami ryzyka CAD [Buraczynska i in., 2003]. Zauważono, że genotyp *DD* był znacznie częstszy u osób z hipercholesterolemią w porównaniu z osobami o właściwym

profilu lipidowym. W innej pracy, badającej populację Polską, również skupiono się na poszukiwaniu interakcji polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z czynnikami ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych [Niemiec i in., 2007]. Zaobserwowano wyższą frekwencję genotypu DD wśród pacjentów z potwierdzoną w badaniu angiograficznym CAD w porównaniu z grupą kontrolną, różnice te były większe w grupie mężczyzn. Ponadto allel D związany był ze zwiększonym ryzykiem rozwoju CAD, w korelacji z podwyższonymi wartościami cholesterolu całkowitego (≥ 5 mmol/l), cholesterolu LDL (≥ 3 mmol/l), trójglicerydów (≥ 1.7 mmol/l) oraz nadwagą i otyłością.

Również w pracach dotyczących związku badanego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, wyraźny jest wpływ na wyniki badań zarówno płci jak i wartości profilu lipidowego badanych pacjentów. W publikacji z 2013 roku badano wpływ polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* oraz innych czynników ryzyka chorób sercowo - naczyniowych na rozwój i stopień zaawansowania CAD [Guney i in., 2013]. Udział w badaniu wzięło 343 pacjentów po przeprowadzonym badaniu koronarograficznym. Stopień zaawansowania CAD określono w zależności od liczby głównych naczyń wieńcowych zwężonych w minimum 70%, zaś grupę kontrolną stanowiły osoby bez istotnych zwężeń tętnic (za wartość krytyczną przyjęto zwężenie 30%). Zarówno frekwencja genotypu DD jak i allele D była znacząco wyższa w grupie osób ze zdiagnozowaną miażdżycą w porównaniu z grupą kontrolną. Genotyp DD związany był z większą liczbą zwężonych naczyń w porównaniu z genotypem II, przy czym po podziale populacji ze względu na płeć zależność ta była utrzymana tylko w grupie mężczyzn. Dodatkowo wykryto związek badanego polimorfizmu z hiperlipidemią (zdefiniowaną jako poziom cholesterolu: całkowitego > 200 mg/dl; LDL > 100 mg/dl; HDL < 40 mg/dl dla mężczyzn, < 50 mg/dl dla kobiet oraz poziom trójglicerydów > 150 mg/dl) i paleniem tytoniu. Powyższy przegląd literatury oraz wyniki opisywanej pracy wskazują że, wpływ polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* na stopień zaawansowania miażdżycy jest wyrażany przez akumulację pewnych czynników ryzyka, którymi mogą być m.in. płeć i wysokie wartości cholesterolu w osoczu krwi.

Mimo dużej liczby prac potwierdzających związek polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z wystąpieniem czy progresją CAD u mężczyzn lub u

osób z podwyższonymi wartościami cholesterolu, w literaturze można znaleźć doniesienia, w których nie wykryto takiej asocjacji. Hibi i wsp. nie znaleźli związku badanego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD wśród pacjentów z hiperlipidemią, określoną jako poziom cholesterolu całkowitego ≥ 5.7 mmol/l [Hibi i in., 1997]. Stopień zaawansowania CAD dla 152 pacjentów po koronarografii opisywano jako: liczbę zwężonych naczyń wieńcowych ($\geq 75\%$), liczbę zwężeń ($\geq 50\%$) oraz za pomocą oddzielnie kalkulowanego parametru określającego procent długości badanego segmentu naczynia wieńcowego, który dotknięty jest zmianami miażdżycowymi. W pracy tej nie znaleziono związku genotypu DD ze stopniem zaawansowania CAD analizując populację jako całość, dopiero oddzielne analizy w podgrupach pacjentów o różnej akumulacji czynników ryzyka rozwoju CAD ujawniła opisywaną zależność w grupie osób palących papierosy. Znane są również inne prace, w których nie opisano związku badanego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD ani w populacji ogólnej, ani po zastosowaniu podziałów. W pracy z 1997 nie znaleziono związku polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* z progresją CAD zarówno w populacji ogólnej, jak i podgrupach w zależności od przebytego zawału serca, czy w grupie pacjentów o niskim ryzyku rozwoju choroby [Jeunemaitre i in., 1997]. Do opisu rozległości miażdżycy Jeunemaitre wykorzystał cztery różne, autorskie skale opracowane na podstawie wyników koronarografii 463 pacjentów. W innej pracy również nie znaleziono związku badanego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD. W badaniu tym oprócz liczby głównych naczyń wieńcowych dotkniętych zmianami miażdżycowymi (75% zwężenia), do opisu stopnia zaawansowania CAD zastosowano skalę Gensiniego [Nakauchi i in., 1996]. Podstawowym ograniczeniem tej pracy jest natomiast dość mało liczna grupa pacjentów po koronarografii, wynosząca zaledwie 133 osoby. W podobnej publikacji, opisującej badania prowadzone na populacji liczącej 130 osób po koronarografii, nie znaleziono związku badanego polimorfizmu ze zwiększoną liczbą naczyń wieńcowych zwężonych w ponad 75% oraz wyższymi wartościami parametru 'jeopardy' [Qiu i in., 2007]. W polskim badaniu przeprowadzonym wśród 111 mężczyzn po 65 roku życia nie stwierdzono istotnego związku między genotypem polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* a liczbą zajętych naczyń wieńcowych zobrazowanych w badaniu koronarograficznym

[Ciećwierz i in., 1997]. Podobnie w innym badaniu, w którym podzielono populację liczącą 258 osób na grupy w zależności od liczby zwężonych głównych naczyń wieńcowych (50% zwężenia), nie znaleziono zależności między analizowanym polimorfizmem a stopniem zaawansowania CAD [Foy i in., 1997]. Autorzy wymienionych prac stosowali różne sposoby opisu progresji miażdżycy naczyń wieńcowych, zarówno specjalnie skonstruowane skale, jak i podział na grupy pacjentów w zależności od liczby zwężonych głównych tętnic wieńcowych (choroba jedno-, dwu-, trzynaczyniowa). Trzeba zauważyć, że taka mnogość i różnorodność sposobów opisu stopnia zaawansowania choroby znacznie utrudnia możliwość porównywania ze sobą wyników różnych prac. Jednakże w większości publikacji, do oceny rozległości miażdżycy stosowano sam podział na grupy z jedno-, dwu- lub trzynaczyniowa CAD. Podział ten, jak wcześniej wspomniano, jest niewystarczający i nie odzwierciedla całego wachlarza zmian miażdżycowych w rozwoju CAD. Ponadto w takich analizach nie uwzględniane są również lokalizacja i funkcjonalne znaczenie zwężenia danego segmentu tętnicy wieńcowej, co dodatkowo ujęte jest w zastosowanej w opisywanym badaniu skali Gensiniego [Gensini, 1983].

Dotychczas nie został w pełni poznany mechanizm, w którym polimorfizm c.2306-105_392ins288 miałby wpływać na ekspresję genu *ACE*. Autorzy wielu publikacji rozważają jego możliwe oddziaływanie z innym funkcjonalnym polimorfizmem położonym w obrębie genu lub w innym miejscu w genomie [Sayed - Tabatabaei i in., 2006]. Sugerowano, iż funkcjonalne znaczenie tego polimorfizmu wynikać może z obecności w rejonie delecyjnym sekwencji wiążącej białko regulatorowe powodujące hamowanie ekspresji genu [Rosatto i in., 1999]. Brak wyciszcza ekspresji genu, u osób z allelem D, miałby prowadzić do zwiększonej ekspresji genu, a w konsekwencji wyższego stężenia białka w surowicy czy tkankach. W badaniach Rosatto i wsp. wykazano natomiast, że delecja fragmentu 16 intronu genu *ACE* nie ma związku ze zmianami w poziomie transkrypcji genu. Niezbędne są zatem dalsze badania nad zmianami ekspresji genu *ACE*, dzięki którym w jednoznaczny sposób będzie można wyjaśnić, wykazany w wielu badaniach związek omawianego polimorfizmu z chorobami sercowo - naczyniowymi, w tym stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych.

Angiotensynogen jest wyjściowym substratem RAAS, od którego zależy funkcjonowanie całego systemu i produkcja aktywnych biologicznie białek układu. Głównym miejscem syntezy AGT są komórki wątroby, jednakże jego lokalną produkcję opisano również w mózgu, nerkach, tkance tłuszczowej czy nadnerczach [Szczepańska - Sadowska, 2000]. Natomiast w układzie sercowo - naczyniowym AGT syntetyzowany jest głównie w przydane i mięśniach gładkich ścian dużych tętnic oraz w przedsionkach serca. Opisano również zwiększoną ekspresję genu *AGT* w odpowiedzi na uszkodzenie wewnętrznej warstwy ściany naczyń krwionośnych [Corvol i Jeunemaitre, 1997]. Jednym z częściej opisywanych polimorfizmów *AGT* jest kodujący polimorfizm c.803T>C, zlokalizowany w obrębie drugiego kodonu genu. Wykazano, że polimorfizm ten związany jest z 5% wzrostem poziomu AGT w osoczu krwi u heterozygot CT i 11% u homozygot CC w porównaniu z homozygotami TT [Sethi i in., 2003]. Opisywany w niektórych pracach, efekt wywierany przez polimorfizm c.803T>C genu *AGT* na ekspresję białka, tłumaczyć można jego sprzężeniem z polimorfizmem c.-44G>A, położonym w rejonie promotorowym genu [Jeunemaitre, 2008]. W badaniach na myszach wykryto, że wszczepienie dodatkowej kopii genu *AGT*, powoduje rozwój nadciśnienia tętniczego, a w konsekwencji hipertrofię kardiomiocytów, włóknienie mięśnia sercowego oraz zaburzenia czynności serca [Xu i in., 2009]. W badaniach z 2014 roku, opisano bardziej intensywną ekspresję *AGT* w płytkach miażdżycowych tętnic szyjnych, w porównaniu ze zdrowymi fragmentami naczyń, u pacjentów po udarze niedokrwiennym [Fraga - Silva i in., 2014]. W innym badaniu, opisano związek tego polimorfizmu z IMT tętnicy szyjnej u pacjentów cierpiących na nadciśnienie tętnicze [Bozec i in., 2003]. U chorych z genotypem CC zanotowano wyższe wartości IMT, w porównaniu z homozygotami TT. W tym samym badaniu, w długoterminowej obserwacji, u pacjentów CC, zaobserwowano 7% redukcję grubości tętnicy szyjnej w odpowiedzi na zastosowane leki obniżające wartości ciśnienia tętniczego krwi. Wyniki te świadczą, iż polimorfizm ten może być markerem w wykrywaniu wczesnych zmian miażdżycowych tętnicy szyjnej oraz może mieć wpływ na redukcję jej grubości po zastosowanym leczeniu. Przegląd literatury dotyczącej polimorfizm c.803T>C genu *AGT* nie dostarcza natomiast wyczerpujących informacji na temat wpływu tego polimorfizmu na stopień zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych.

W niniejszej pracy nie znaleziono związku polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych zarówno w populacji ogólnej, jak i w grupach pacjentów podzielonych w zależności od różnej akumulacji czynników ryzyka rozwoju CAD. Wyniki te są zgodne z wynikami prezentowanymi w metaanalizie, obejmującej 127 publikacji, w której mimo wykrycia związku badanego polimorfizmu z nadciśnieniem tętniczym, wykazano brak zależności z chorobą niedokrwienną serca oraz zawałem mięśnia sercowego [Sethi i in., 2003]. W innej obszernej metaanalizie, obejmującej 43 badania o łącznej liczbie 13478 pacjentów i 17024 osób z grupy kontrolnej, opisano jedynie nieznaczny związek polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* z chorobą niedokrwienną serca [Xu i in., 2007]. Jednakże wnioski te dotyczyły głównie publikacji opisujących badania przeprowadzone na mniejszych grupach pacjentów, a analizy przeprowadzone w oparciu o publikacje badające najbardziej liczne populacje (ponad 500 osób), nie wykazały takiej zależności. Również w wielu pracach, w których analizowano wpływ polimorfizmu c.803T>C genu *AGT*, na stopień zaawansowania zmian miażdżycowych, opisano brak oczekiwanej korelacji. W pracy z 2012 roku, badano populację liczącą 1089 osób, po przebytej koronarografii a stopień zaawansowania choroby określono za pomocą skali Gensiniego [Jia i in., 2012]. W badaniu tym, podobnie jak w niniejszej pracy, nie znaleziono związku polimorfizmu c.803T>C genu *AGT* ze stopniem zaawansowania CAD. Autorzy innej publikacji, oceniali związek tego polimorfizmu z miażdżycą, w grupie 141 pacjentów z potwierdzoną w badaniu angiograficznym CAD (50% zwężenie w jednej z trzech głównych tętnic wieńcowych), 159 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i 131 osób stanowiących grupę kontrolną [Nair i in., 2003]. Opisano brak różnic w częstości alleli badanego polimorfizmu, między populacjami osób chorych, w porównaniu z grupą kontrolną. Również po podziale pacjentów z CAD na grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby (porównanie grupy z jednonaczyniową CAD z grupą z dwu i trzynaczyniową CAD), nie wykazano różnic w częstości alleli między porównywanymi grupami. Podobnie, we wspomnianym już wcześniej badaniu, przeprowadzonym w grupie 463 pacjentów z angiograficznie potwierdzoną miażdżycą tętnic wieńcowych, nie znaleziono związku allelela C ze stopniem zaawansowania CAD w populacji analizowanej jako całość, jak i w podgrupach utworzonych w zależności od

przebitego zawału serca [Jeunemaitre i in., 1997]. Do opisu stopnia nasilenia choroby wykorzystano liczbę naczyń wieńcowych zwężonych w przynajmniej 75% oraz trzy inne, opracowane przez autorów publikacji skale, opisujące stan naczyń wieńcowych. Zauważono natomiast, że w grupie pacjentów o niskim stopniu ryzyka rozwoju CAD (BMI < 26 kg/m², przy brak leczenia hipercholesterolemii i poziomie cholesterolu całkowitego ≤ 6,2 mmol/l) frekwencja allelu C była nieznacznie wyższa u pacjentów bez istotnych zmian miażdżycowych (większych niż 75%) w żadnym z badanych segmentów naczyń wieńcowych, w porównaniu z pacjentami z istotnymi zmianami. W dalszych analizach wykazano, że allel C jest negatywnie skorelowany (P=0.04) z jedną ze skal opisujących stopień zaawansowania miażdżycy (procent badanych segmentów zwężonych w co najmniej 50%) w grupie pacjentów o niskim ryzyku rozwoju CAD. Wyniki te sugerować mogą, że allel ten może mieć związek z kliniczną manifestacją CAD w grupie pacjentów o niskim stopniu zaawansowania choroby. Jednakże, jak zauważają sami autorzy pracy, hipoteza wymaga dalszej weryfikacji.

Analizując literaturę dotyczącą genu *AGT*, znaleźć można również doniesienia opisujące istniejącą korelację między polimorfizmem c.803T>C a stopniem zaawansowania CAD. W pracy z 2011 roku, badano związek tego polimorfizmu z CAD, w grupie 123 pacjentów po ostrym zawale mięśnia sercowego (potwierdzona obecność 50% zwężenia w przynajmniej jednym z głównych naczyń wieńcowych), w porównaniu z populacją 144 osób zdrowych [Mehri i in., 2011]. Opisano istotną statystycznie zależność badanego polimorfizmu z zawałem mięśnia sercowego. Dodatkowo odnotowano wyższe częstości genotypu CC i allela C wraz ze wzrostem liczby zwężeń naczyń wieńcowych oraz w grupie pacjentów z czteronaczyniową CAD w porównaniu z pacjentami z jedno-, dwu- i trzynaczyniową CAD, jak również wśród chorych z ponad 90% zwężeniami w naczyniach wieńcowych, w porównaniu z pacjentami bez krytycznych zwężeń. Trzeba natomiast zauważyć, że wszyscy włączeni do badania pacjenci z CAD, inaczej niż w badaniu opisywanym w niniejszej pracy, to pacjenci po przebyłym ostrym zawale mięśnia sercowego, w przebiegu którego najczęściej dochodzi do rozerwania płytki miażdżycowej. W badaniu liczącym 2250 mężczyzn podzielonych na grupy z jedno-, dwu-, trzynaczyniową CAD (zwężenia powyżej 50%) i bez CAD, opisano brak związku polimorfizmu

c.803T>C z wystąpieniem choroby [Gardemann i in., 1999]. W badaniu tym opisano również brak związku badanego polimorfizmu z ryzykiem wystąpienia zawału serca zarówno w populacji ogólnej, jak i w populacji niskiego oraz wysokiego ryzyka zdarzeń sercowych. Ponadto w analizach dotyczących stopnia zaawansowania CAD, opisano brak korelacji badanego polimorfizmu z wartościami parametru Gensiniego w populacji ogólnej. Natomiast po podziale badanej grupy pacjentów z zależności od wieku, opisano wyższe wartości parametru Gensiniego u mężczyzn przed 65 rokiem życia będących nosicielami allele C w porównaniu z homozygotami TT. W brazylijskiej pracy, wykryto związek allele C z wartościami opisaną przez autorów skali rozległości miażdżycy, ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na wielonaczyniową CAD oraz wyższymi wartościami parametru Gensiniego, wśród 871 pacjentów [Lanz i in., 2005]. Jednakże sporym ograniczeniem wymienionej pracy jest różnorodność etniczna badanej populacji, składającej się zarówno z osób rasy kaukaskiej, czarnoskórych, mulatów i azjatów. W literaturze znane są doniesienia opisujące różnice w częstości alleli polimorfizmu c.803T>C genu *AGT*, w zależności od przynależności etnicznej badanych populacji [Corvol i Jeunemaitre, 1997; Goldenberg i in., 2006]. Dodatkowo Lanz i współpracownicy [Lanz i in., 2005], zastosowali inne niż w niniejszej pracy, zasady doboru badanej grupy pacjentów, z analizowanej populacji wykluczono chorych po przebytym zdarzeniu sercowym, w tym po zawale mięśnia sercowego.

Badania segmentów naczyń wieńcowych wykonane przez zespół Schieffer i wsp. wykazały obecność nie tylko enzymu ACE i Ang II w blaszkach miażdżycowych pacjentów dotkniętych chorobą wieńcową, ale także receptora AGTR1, co może świadczyć o jego związku z rozwojem miażdżycy naczyń wieńcowych [Schieffer i in., 2000]. W innej pracy porównywano poziom produkcji AGTR1 w segmentach naczyń wieńcowych pochodzących z autopsji pacjentów o różnym stopniu zaawansowania CAD [Gross i in., 2002]. Wykryto, że w segmentach naczyń bez zmian miażdżycowych produkcja AGTR1 zachodziła w komórkach mięśni gładkich ściany naczyń, natomiast we fragmentach tętnic ze zmianami miażdżycowymi receptor ten obecny był również w strukturach budujących płytkę miażdżycową, takich jak komórki zapalne czy miofibroblasty. Zauważono również wyraźną korelację między obecnością AGTR1 a rozmiarem blaszki, jak również ze zgrubieniem

kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy, co sugerować może intensywną produkcję receptora w tkankach miażdżycowych. W związku z tym, że Ang II większość swoich promiażdżycowych działań wywiera przez receptor AGTR1, w literaturze pojawia się coraz więcej prac badających związek polimorfizmów genu kodującego ten receptor z miażdżycą tętnic wieńcowych. Dobrze poznanym polimorfizmem genu *AGTR1* jest substytucja c.1080*86A>C w 3' nieulegającym translacji, cis - regulatorowym regionie genu, rozpoznawanym przez specyficzne miR - 155. W obecności allele C zdolność wiązania miR - 155 do sekwencji regulatorowej jest obniżona, w skutek czego miR - 155 nie wiąże się i nie atenuuje dłużej translacji, co powoduje zwiększoną ekspresję genu i produkcję białka AGTR1 [Martin i in., 2007]. W niektórych pracach wykazano wzmożoną produkcję białka AGTR1 u homozygot CC w porównaniu z heterozygotami AC i homozygotami AA [Ceolotto i in., 2011]. Z doniesień klinicznych natomiast, powszechnie znany jest pozytywny wpływ farmakoterapii lekami należącymi do grupy antagonistów RA w schorzeniach układu sercowo - naczyniowego [Opolski i Filipiak, 2000]. Jednakże w badaniach opublikowanych w 2014 roku, opisano odwrotną korelację poziomu miR - 155 ze stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych, mierzonym przy pomocy skali Gensiniego, u 110 pacjentów po wykonanej w celu diagnozy CAD koronarografii [Zhu i in., 2014]. Taka niespójność wyników podkreśla konieczność prowadzenia dalszych badań mających na celu określenie wpływu omawianego polimorfizmu na zachorowalność i progresję CAD.

W niniejszej pracy nie znaleziono związku polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych w populacji ogólnej oraz w grupach pacjentów podzielonych w zależności od różnej akumulacji czynników ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych. Wyniki te są zgodne z wynikami obszernej metaanalizy, uwzględniającej dane z 53 badań [Xu i in., 2010]. W pracy tej oceniono wpływ badanego polimorfizmu na ryzyko zachorowania na CAD jako niewielki, natomiast nawet ta skromna asocjacja stawała się nieistotna statystycznie, gdy oddzielnej analizie poddano wyniki z największych badań (populacje liczące ponad 500 osób) i o najwyższym współczynniku jakości. W pracy badającej polską populację, liczącą 172 pacjentów z potwierdzoną w badaniu koronarograficznym

miażdżycą i 169 zdrowych osób, nie znaleziono asocjacji polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* z CAD w populacji ogólnej [Niemiec i in., 2008b]. Opisano natomiast związek allele C ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na CAD u pacjentów palących papierosy oraz u pacjentów z hipercholesterolemią definiowaną jako poziom cholesterolu całkowitego ≥ 5 mmol/l. Natomiast w innej pracy badającej 289 przypadków CAD i 510 osób zdrowych nie znaleziono związku omawianego polimorfizmu ze zwiększoną zachorowalnością na miażdżycę naczyń wieńcowych w populacji ogólnej [Freitas i in., 2008]. W pracy tej, oddzielna analiza dla osób z dyslipidemią (opisaną jako poziom: cholesterolu całkowitego ≥ 200 mg/dl, trójglicerydów ≥ 150 mg/dl, cholesterolu LDL ≥ 130 mg/dl oraz cholesterolu HDL ≤ 40 mg/dl) nie była możliwa do wykonania ze względu na zbyt małe liczebności w analizowanych podgrupach. Podobne wyniki, do opisanych w niniejszej pracy, otrzymywali również inni badacze szukający asocjacji polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* ze stopniem zaawansowania CAD. W badaniach populacji polskiej, przeprowadzonych w grupie 95 pacjentów w wieku poniżej 50 lat, z potwierdzoną w badaniu koronarograficznym istotną miażdżycą naczyń wieńcowych, nie stwierdzono istotnego statystycznie związku ze stopniem zaawansowania zmian w naczyniach wieńcowych oraz z występowaniem nadciśnienia tętniczego, zawału mięśnia sercowego i obciążenia rodzinnego chorobą niedokrwinną serca w wywiadzie [Gruchała i in., 1997]. Stopień zaawansowania miażdżycy określany był w tym badaniu jako liczba zmienionych naczyń wieńcowych uwidocznionych w badaniu koronarograficznym. Podobnie Gardemann i wsp. opisali brak związku między badanym polimorfizmem a CAD, zawałem mięśnia sercowego oraz stopniem zaawansowania CAD mierzonym zarówno za pomocą skali Gensiniego jak i stosując podział na jedno-, dwu-, trzynaczyniową chorobę wieńcową (50% zwężenie), w populacji 2244 mężczyzn po koronarografii [Gardemann i in., 1998]. Ponadto w pracy tej nie znaleziono oczekiwanej korelacji stosując podział populacji na grupy, w zależności od poziomu: apolipoproteiny AI i B, cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, ale także od zwyczaju palenia papierosów czy obecności współistniejących chorób takich jak: nadciśnienie tętnicze, otyłość czy cukrzyca. Również badacze zespołu Jia nie znaleźli związku polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* ze stopniem

zaawansowania CAD mierzonym za pomocą skali Genisniego, wśród 1089 pacjentów [Jia i in., 2012]. Podobnie Jeunemaitre i wsp., w grupie 463 pacjentów po koronarografii, nie opisali korelacji tego polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD, określanym przez cztery różne skale progresji miażdżycy, ani analizując populację jako całość, ani w podgrupach podzielonych na pacjentów w zależności od przebytego zawału mięśnia sercowego czy w grupie pacjentów niskiego ryzyka rozwoju CAD (BMI < 26 kg/m², brak konieczności leczenia hipercholesterolemii lub poziom cholesterolu całkowitego ≤ 6,2 mmol/l) [Jeunemaitre i in., 1997].

W literaturze znaleźć można nieliczne prace opisujące związek polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* z rozległością miażdżycy. W publikacji opisującej badania prowadzone w grupie 133 pacjentów po koronarografii i 258 zdrowych ochotników, nie znaleziono związku badanego polimorfizmu z CAD, oraz ze stopniem jej zaawansowania mierzonym w skali Gensiniego [Nakauchi i in., 1996]. Natomiast liczba zwężonych (powyżej 75%) naczyń wieńcowych była większa u pacjentów z CAD o genotypie AC w porównaniu z genotypem AA (opisano brak genotypu CC w grupie pacjentów CAD). Dodatkowo, w analizach przeprowadzonych, po wykluczeniu chorych na cukrzycę, wartości parametru Gensiniego były wyższe u heterozygot AC w porównaniu z homozygotami AA. Jednakże w niniejszej pracy, przeprowadzonej w liczniejszej grupie, to jest u 647 pacjentów, nie opisano takiej zależności. W innej pracy również nie znaleziono związku badanego polimorfizmu z chorobą niedokrwinną serca w populacji liczącej 130 osób po koronarografii i 90 osób stanowiących grupę kontrolną. Natomiast opisano zwiększoną liczbę naczyń wieńcowych zwężonych w ponad 75% oraz wyższe wartości parametru 'jeopardy', u pacjentów o genotypie AC, w porównaniu z pacjentami o genotypie AA (w pracy tej nie opisano homozygot CC) [Qiu i in., 2007]. Tak jak wcześniej wspomniano skala 'jeopardy' nie oddaje niestety w pełni rzeczywistego stopnia zaawansowania CAD, a jedynie obrazuje jaki obszar mięśnia sercowego zagrożony jest niedokrwieniem [Dash i in., 1977]. Dodatkowo, należy podkreślić, iż populacje badane przez zespoły Nakauchiego oraz Qiu są zbyt mało liczne, aby na podstawie ich wyników można było jasno i ostatecznie określić związek polimorfizmu c.1080*86A>C genu *AGTR1* z CAD. Zważywszy na to, że niska częstość allela C badanego polimorfizmu,

uniemożliwia wykrycie wszystkich możliwych układów genotypowych w grupach liczących po 133 [Nakauchi i in., 1996] czy 130 [Qiu i in., 2007] osób.

Angiotensyna II, stymuluje aktywność syntazy aldosteronu do katalizy reakcji ostatniego etapu biosyntezy aldosteronu w warstwie kłębkowatej kory nadnerczy. Z kolei aldosteron wykazuje szerokie działanie sprzyjające powstawaniu nadciśnienia i miażdżycy: powoduje nasilony wychwyt kationów sodowych i wody z moczu pierwotnego, wykazuje właściwości prooksydacyjne, sprzyja dysfunkcji komórek śródbłonna, stymuluje wytwarzanie enzymu ACE, przyczynia się do wzrostu zawartości kolagenu w komórkach mięśnia sercowego [Bodula i in., 2007; Filipiak i Opolski, 2000a; Namsolleck i Unger, 2014]. Aldosteron syntetyzowany jest nie tylko w nadnerczach, ale także w kardiomiocytach, śródbłonnku oraz w mięśniach gładkich ścian naczyń krwionośnych, a jego stężenie w komórkach mięśnia sercowego jest wielokrotnie wyższe niż w osoczu krwi [Filipiak i Opolski, 2000a]. Opisanym polimorfizmem genu kodującego syntazę aldosteronu (*CYP11B2*), jest zmiana c.-344C>T w sekwencji promotorowej genu. Wiadomo, iż zmiana ta leży w obrębie miejsca wiążącego jeden z czynników transkrypcyjnych, czynnik SF - 1. Wykazano różnice w zdolności wiązania czynnika SF - 1 w zależności od danego wariantu polimorficznego. Natomiast dokładny mechanizm, w którym jeden z alleli wpływa na wzmożoną ekspresję genu i produkcję aldosteronu wciąż pozostaje niewyjaśniony [White i Rainey, 2005]. Jak dotąd polimorfizm ten najintensywniej badany był w rozwoju nadciśnienia tętniczego [Li i Liu, 2014; Sookoian i in., 2007], z biegiem lat natomiast pojawiają się doniesienia o jego związku z miażdżycą tętnic szyjnych, udowych, aorty czy tętnic wieńcowych. W pracy badającej wpływ aldosteronu na rozwój miażdżycy aorty u myszy, oprócz podwyższenia wartości ciśnienia tętniczego, wykazano 32% wzrost powierzchni naczynia zajętego zmianami miażdżycowymi u zwierząt, którym podawano aldosteron [Keidar i in., 2004]. Ponadto, w badaniu tym wykazano wzrost parametrów oksydacji w makrofagach izolowanych z otrzewnej oraz w ścianach wyciętych segmentów aorty, po podawaniu aldosteronu. Izolowane i hodowane z aldosteronem makrofagi wykazywały zwiększoną zdolność do oksydacji cząstek cholesterolu frakcji LDL oraz stymulacji produkcji i aktywacji enzymu ACE. Podawanie leków hamujących aktywność RAAS zmniejszało prooksydacyjne i promiażdżycowe działanie

aldosteronu. Wyniki tych badań sugerują, że za rozwój miażdżycy mogą odpowiadać: prooksydacyjne właściwości aldosteronu, jego zdolność do podwyższania ciśnienia tętniczego krwi oraz stymulacja wytwarzania enzymu ACE.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki świadczą o braku związku polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych zarówno w populacji ogólnej jak i w subpopulacjach stworzonych przez podział pacjentów ze względu na akumulację wybranych czynników ryzyka związanych z rozwojem CAD. Jak dotąd, opublikowano niewiele prac badających korelację c.-344C>T polimorfizmu genu *CYP11B2* zarówno z ryzykiem zachorowania na miażdżycę jak i ze stopniem zaawansowania CAD. A zatem uzyskane, w niniejszej pracy wyniki porównać można jedynie do wyników badań odnoszących się do grubości innych niż tętnice wieńcowe naczyń, takich jak tętnica szyjna, czy udowa lub do wystąpienia częstych epizodów sercowo - naczyniowych o podłożu miażdżycowym, takich jak zawał mięśnia sercowego lub do zjawiska nawrotu zwężenia tętnicy po zastosowaniu inwazyjnych metod leczenia miażdżycy. W pracy badającej korelację trzech polimorfizmów (w tym c.2306-105_392ins288 *ACE* i c.-344C>T *CYP11B2*) z grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej i udowej, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic, między wartościami IMT zarówno tętnicy szyjnej jak i udowej, wśród wariantów polimorficznych c.-344C>T genu *CYP11B2* [Balkestein i in., 2002]. W pracy z 2010 roku badano korelacje polimorfizmu genu *CYP11B2* z miażdżycą tętnicy szyjnej, opisano związek tego polimorfizmu z wielkością płytki miażdżycowej mierzonej w badaniu rezonansu magnetycznego, natomiast nie wykazano związku z czynnikiem prognostycznym rozwoju miażdżycy, jakim jest grubość kompleksu błony wewnętrznej i środkowej [Sharma i Katz, 2010]. W pracy typu *case - control*, w której badano ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, zauważono jedynie nieistotny statystycznie trend wzrostu ryzyka zawału, u mężczyzn w wieku między 40 a 57 lat, będącymi nosicielami allele C polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* [Hautanen i in., 1999]. Zależność ta wzrastała po zestawieniu z innymi, znanymi czynnikami ryzyka CAD, takimi jak palenie tytoniu czy niskie wartości cholesterolu HDL. Jednakże, podobnie jak w

niniejszej pracy, autorzy publikacji nie znaleźli związku polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* z wystąpieniem badanego schorzenia u mężczyzn z wysokimi wartościami cholesterolu LDL. W pracy badającej 542 pacjentów po zawale mięśnia sercowego oraz 500 zdrowych ochotników, również nie wykazano związku badanego polimorfizmu z ryzykiem wystąpienia zawału, w badanej populacji traktowanej jako całość, jak i w populacji osób przed 55 rokiem życia, czy w skojarzeniu z innymi czynnikami ryzyka CAD takimi jak: palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, wysokie wartości BMI czy niewłaściwy profil lipidowy [Patel i in., 2000]. W wieloletnim, prospektywnym badaniu, przeprowadzonym w licznej grupie 2490 zdrowych mężczyzn w średnim wieku (średnia wieku: 56,1 ± 3,5 roku), określano związek polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* z występowaniem częstych zdarzeń wieńcowych na podłożu miażdżycowym takich jak: nagła śmierć sercowa, zawał mięśnia sercowego, czy konieczności przeprowadzenia zabiegu rewaskularyzacji czyli zabiegu poszerzenia i udroźnienia zwężonego naczynia krwionośnego, polegającego na przykład na implantacji stentu w miejscu zwężenia naczynia [Payne i in., 2004]. Autorzy tej pracy nie znaleźli jednak związku badanego polimorfizmu z żadnym z analizowanych zdarzeń sercowych, w trwającej ponad 10 lat obserwacji. W innej pracy, wykazano brak wpływu polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2*, na postęp zmian miażdżycowych, mierzonych za pomocą skali Gensiniego, u 101 pacjentów po przeprowadzonym zabiegu wszczepienia pomostów naczyniowych [Ortlepp i in., 2001]. Podobnie Ryu i współpracownicy, nie znaleźli związku badanego polimorfizmu z restenozą, czyli nawrotem zwężenia leczonej tętnicy po implantacji stentu, w wieloletniej obserwacji 238 pacjentów, zarówno w prostym badaniu typu *case - control* jak i po uwzględnieniu dodatkowych czynników ryzyka rozwoju CAD [Ryu i in., 2002]. Należy jednak zaznaczyć, że proces odbudowy zwężenia po zabiegu wprowadzenia stentu do leczonego naczynia wieńcowego ma nieco inne podłoże niż powstawanie i progresja nowych zmian miażdżycowych, dlatego też wyniki tych badań nie mogą być bezpośrednio porównywane do wyników badań dotyczących stopnia nasilenia rozwoju pierwotnych zmian miażdżycowych.

Badaniem, w którym opisano związek omawianego powyżej polimorfizmu ze stopniem zaawansowania CAD, jest wspomniana wcześniej praca z 2012 roku, w której badano osiem polimorfizmów w czterech różnych genach

kodujących białka RAAS (w tym: c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1* i c.-344C>T *CYP11B2*) [Jia i in., 2012]. W pracy tej analizie poddano chińską populację liczącą 1089 osób, u których oceniono w badaniu koronarograficznym stan tętnic wieńcowych. W zależności od obecności 50% zwężenia w przynajmniej jednej z głównych naczyń wieńcowych, utworzono grupę pacjentów z CAD liczącą 727 osób oraz grupę kontrolną, składającą się z 362 osób. Opisano związek polimorfizmu 344C>T genu *CYP11B2* z chorobą wieńcową serca, dodatkowo wykryto interakcję pomiędzy badanym polimorfizmem a wiekiem, płcią, paleniem papierosów oraz spożywaniem alkoholu w kształtowaniu ryzyka zachorowania na miażdżycę. W analizach dotyczących stopnia zaawansowania CAD, zaobserwowano niższe wartości parametru Gensiniego, u osób o genotypie CT i CC badanego polimorfizmu, w porównaniu z homozygotami TT. Z wyników pracy tej wynika, że allel C może mieć efekt ochronny w rozwoju zmian miażdżycowych. Mimo, iż badania te prowadzone były w dość licznej grupie, u osób z ocenioną w badaniu angiograficznym miażdżycą naczyń wieńcowych, należy zwrócić uwagę, że wyniki te odnoszą się do populacji chińskiej. W pracy, w której analizowano 20 różnych publikacji badających związek polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* z parametrami oceniającymi strukturę i funkcję lewej komory serca, widać wyraźną różnicę między uzyskiwanymi wynikami, w zależności od narodowości badanej populacji [Wang i in., 2014]. W przeanalizowanych w tej metaanalizie publikacjach, opisywano korelacje badanych parametrów, raz z allelem T, raz C, w zależności od przynależności etnicznej badanej populacji: azjatyckiej czy kaukaskiej. W literaturze brakuje natomiast innych, niż opisane przez zespół Jia [Jia i in., 2012], doniesień potwierdzających związek badanego allela ze stopniem zaawansowania CAD. Wskazuje to na konieczność prowadzenia dalszych badań określających wpływ polimorfizmu c.-344C>T genu *CYP11B2* w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.

Choć etiologia chorób sercowo - naczyniowych jest złożona, to od wielu lat podejmowano wysiłki zmierzające do wyodrębnienia charakterystycznych cech wyprzedzających rozwój bądź zwiększających ryzyko ich wystąpienia. Miażdżycy naczyń wieńcowych jest obecnie chorobą cywilizacyjną o szerokim zakresie występowania. A w związku z tym, że rozwój miażdżycy jest procesem cichym, chronicznym, postępującym w czasie, który rozpocząć się może już w

rozwoju płodowym, a najczęściej ujawnia się dopiero w piątej dekadzie życia u mężczyzn i w szóstej u kobiet oraz w wielu przypadkach już pierwsza manifestacja choroby może być tragiczna (zawał czy nagła śmierć sercowa), to szczególnie istotne wydają się być badania identyfikujące osoby o podwyższonym ryzyku zachorowania [Sayols - Baixeras i in., 2014].

W niniejszej pracy badano związek polimorfizmów czterech genów, kodujących białka układu renina - angiotensyna - aldosteron ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych, u pacjentów po koronarografii. Wykryto, że mężczyźni o genotypie DD polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE*, którzy mają nieprawidłowe wartości profilu lipidowego, mogą być szczególnie narażeni na rozwój miażdżycy naczyń wieńcowych. Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż polimorfizm ten może modyfikować proces choroby miażdżycowej, powodując indywidualne różnice w stopniu zaawansowania zwężeń tętnic w przebiegu CAD. Wiadomo, że u homozygot DD wykazano zwiększony poziom enzymu ACE [Agerholm - Larsen i in., 2000], co może przyczyniać się do powstawania zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych. Jeśli dodatkowo u tych samych osób, hormony płci oraz niewyrównany profil lipidowy powodować będą nadmierną stymulację RAAS, to w konsekwencji u pacjentów tych możemy spodziewać się zmian miażdżycowych o wysokim stopniu zaawansowania. Taka jednoczesna, wielotorowa aktywacja sprzyjających powstawaniu miażdżycy szlaków, powodować może poważne konsekwencje zdrowotne wybranych grup pacjentów CAD.

W analizie pozostałych genów, to jest: c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2*, nie znaleziono związku ze stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń wieńcowych. Podkreślić należy jednak fakt, że nasze badanie jest jednym z nielicznych, określających związek polimorfizmu genu *CYP11B2* z progresją CAD, wskazuje to konieczność prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Dzięki podobnym pracom, możliwe staje się określenie i objęcie odpowiednią kontrolą, istotnych czynników predysponujących i nasilających rozwój miażdżycy, u konkretnego pacjenta. W przyszłości, możliwe będzie szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia lub wczesna interwencja medyczna u pacjentów, u których określono wysokie prawdopodobieństwo rozwoju

miażdżycy. Wpłynąć to może istotnie na zmniejszenie umieralności z powodu schorzeń układu sercowo - naczyniowego oraz na znaczne obniżenie kosztów leczenia kardiologicznego przyszłych społeczeństw.

8. WNIOSKI

1. Mężczyźni o genotypie DD polimorfizmu c.2306-105_392ins288 genu *ACE* mający wysoki poziom cholesterolu całkowitego (> 200 mg/dl), wysoki poziom cholesterolu LDL (> 130 mg/dl) oraz niski poziom cholesterolu HDL (< 40 mg/dl) mają podwyższone ryzyko wystąpienia zmian miażdżycowych tętnic wieńcowych o wysokim stopniu zaawansowania.
2. Nie wykazano obecności związku między polimorfizmami: c.803T>C *AGT*, c.1080*86A>C *AGTR1*, c.-344C>T *CYP11B2* a stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych u chorych z CAD.

9. PIŚMIENICTWO

- Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. 2000. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2):484-492.
- Balkestein EJ, Wang JG, Struijker-Boudier HA, Barlassina C, Bianchi G, Birkenhager WH, Brand E, Den Hond E, Fagard R, Herrmann SM, Van Bortel LM, Staessen JA. 2002. Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population. *J Hypertens* 20(8):1551-1561.
- Bandosz P, O'Flaherty M, Drygas W, Rutkowski M, Koziarek J, Wyrzykowski B, Bennett K, Zdrojewski T, Capewell S. 2012. Decline in mortality from coronary heart disease in Poland after socioeconomic transformation: modelling study. *Bmj* 344:d8136.
- Bodula A, Dolyk A, Protasiewicz J, Adamiec R. 2007. [The role of the -344C/T polymorphism of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) in cardiovascular diseases]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:838-847.
- Borzyszkowska J, Stanislawska-Sachadyn A, Wirtwein M, Sobiczewski W, Ciecwierz D, Targonski R, Gruchala M, Rynkiewicz A, Limon J. 2012. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is associated with severity of coronary artery disease in men with high total cholesterol levels. *J Appl Genet* 53(2):175-182.
- Bozec E, Fassot C, Tropeano AI, Boutouyrie P, Jeunemaitre X, Lacolley P, Dabire H, Laurent S. 2003. Angiotensinogen gene M235T polymorphism and reduction in wall thickness in response to antihypertensive treatment. *Clin Sci (Lond)*. England. 637-644.
- Buraczynska M, Pijanowski Z, Spasiewicz D, Nowicka T, Sodolski T, Widomska - Czekańska T, Książek A. 2003. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: assessment of the risk of coronary heart disease. *Kardiol Pol* 58(1):1-9.
- Casiglia E, Tikhonoff V, Mazza A, Rynkiewicz A, Limon J, Caffi S, Guglielmi F, Martini B, Basso G, Winnicki M, Pessina AC, Somers VK. 2005. C-344T polymorphism of the aldosterone synthase gene and blood pressure in the elderly: a population-based study. *J Hypertens* 23(11):1991-1996.
- Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Strapazzon G, Ragazzo F, Bratti P, Fabricio AS, Squarcina E, Gion M, Palatini P, Semplicini A. 2011. Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am J Hypertens* 24(2):241-246.
- Ciećwierz D, Gruchala M, Keita L, Romanowski P, Sobiczewski W, Wdowczyk-Szulc J, Targoński R, Ochman K, Limon J, Rynkiewicz A. 1997. Polimorfizm insercyjno-delecyjny genu enzymu konwertującego angiotensynę I u starszych pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i chorobą wieńcową. *Nadciśnienie Tętnicze* 1(2):51-55.
- Corvol P, Jeunemaitre X. 1997. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev* 18(5):662-677.
- Dash H, Johnson RA, Dinsmore RE, Harthorne JW. 1977. Cardiomyopathic syndrome due to coronary artery disease. I: Relation to angiographic extent of coronary disease and to remote myocardial infarction. *Br Heart J* 39(7):733-739.
- Daugherty A, Rateri DL, Lu H, Inagami T, Cassis LA. 2004. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation* 110(25):3849-3857.
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. 1996. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94(11):2756-2767.
- Dzau VJ. 1993. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Intern Med* 153(8):937-942.

- Filipiak KJ, Opolski G. 2000a. Antagoniści aldosteronu w chorobach układu sercowo-naczyniowego. In: Opolski G, Filipiak KJ, editors. *Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 81-87.
- Filipiak KJ, Opolski G. 2000b. Właściwości farmakologiczne inhibitorów konwertazy angiotensyny. In: Opolski G, Filipiak KJ, editors. *Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 45-70.
- Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ. 1997. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterised by coronary angiography. *Hum Genet* 100(3-4):420-425.
- Fraga-Silva RA, Savergnini SQ, Montecucco F, Nencioni A, Caffa I, Soncini D, Costa-Fraga FP, De Sousa FB, Sinisterra RD, Capettini LA, Lenglet S, Galan K, Pelli G, Bertolotto M, Pende A, Spinella G, Pane B, Dallegri F, Palombo D, Mach F, Stergiopoulos N, Santos RA, da Silva RF. 2014. Treatment with Angiotensin-(1-7) reduces inflammation in carotid atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost. Germany*. 736-747.
- Freitas AI, Mendonca I, Brion M, Sequeira MM, Reis RP, Carracedo A, Brehm A. 2008. RAS gene polymorphisms, classical risk factors and the advent of coronary artery disease in the Portuguese population. *BMC Cardiovasc Disord* 8:15.
- Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. 1998. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 19(11):1657-1665.
- Gardemann A, Stricker J, Humme J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. 1999. Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 145(2):309-314.
- Gensini GG. 1983. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 51(3):606.
- Goldenberg I, Moss AJ, Ryan D, McNitt S, Eberly SW, Zareba W. 2006. Polymorphism in the angiotensinogen gene, hypertension, and ethnic differences in the risk of recurrent coronary events. *Hypertension* 48(4):693-699.
- Gross CM, Gerbaulet S, Quensel C, Kramer J, Mittelmeier HO, Luft FC, Dietz R. 2002. Angiotensin II type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 97(4):327-333.
- Gruchała M, Ciećwierz D, Rynkiewicz A. 2000. Znaczenie polimorfizmu genów układu renina-angiotensyna w chorobach układu sercowo-naczyniowego. In: Opolski G, Filipiak KJ, editors. *Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 89-104.
- Gruchała M, Ciećwierz D, Sobiczewski W, Mierzejewski L, Romanowski P, Targoński R, Dubaniewicz W, Chlebus K, Ochman K, Limon J, Rynkiewicz A. 1997. Brak związku polimorfizmu genu receptora angiotensyny II typu 1 (AT1) z nadciśnieniem tętniczym i chorobą wieńcową u pacjentów poniżej 50 roku życia. *Nadciśnienie Tętnicze* 1(3):111-116.
- Gruchała M, Rynkiewicz A. 2002. Aspekty genetyczne choroby niedokrwiennej serca. In: Ciechanowicz A, Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyło W, editors. *Genetyka chorób układu krążenia*. Kraków: Medycyna Praktyczna. 81-94.
- Guney AI, Ergec D, Kirac D, Ozturhan H, Caner M, Koc G, Kaspar C, Ulucan K, Agirbasli M. 2013. Effects of ACE polymorphisms and other risk factors on the severity of coronary artery disease. *Genet Mol Res* 12(4):6895-6906.
- Hautanen A, Toivanen P, Manttari M, Tenkanen L, Kupari M, Manninen V, Kayes KM, Rosenfeld S, White PC. 1999. Joint effects of an aldosterone synthase

- (CYP11B2) gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction. *Circulation* 100(22):2213-2218.
- Hibi K, Ishigami T, Kimura K, Nakao M, Iwamoto T, Tamura K, Nemoto T, Shimizu T, Mochida Y, Ochiai H, Umemura S, Ishii M. 1997. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism adds risk for the severity of coronary atherosclerosis in smokers. *Hypertension* 30(3 Pt 2):574-579.
- Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogihara T. 2000. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men : the Suita Study. *Circulation* 101(17):2060-2065.
- Hilliard LM, Sampson AK, Brown RD, Denton KM. 2013. The "his and hers" of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 15(1):71-79.
- Jacoby DS, Rader DJ. 2003. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease: from genes to treatment. *Arch Intern Med* 163(10):1155-1164.
- Jenkins PJ, Harper RW, Nestel PJ. 1978. Severity of coronary atherosclerosis related to lipoprotein concentration. *Br Med J* 2(6134):388-391.
- Jeunemaitre X. 2008. Genetics of the human renin angiotensin system. *J Mol Med (Berl)* 86(6):637-641.
- Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillauneuf MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Gueronprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. 1997. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 99(1):66-73.
- Jia EZ, Xu ZX, Guo CY, Li L, Gu Y, Zhu TB, Wang LS, Cao KJ, Ma WZ, Yang ZJ. 2012. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and coronary artery disease: detection of gene-gene and gene-environment interactions. *Cell Physiol Biochem* 29(3-4):443-452.
- Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S. 1995. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 345(8965):1600-1603.
- Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. 2004. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation* 109(18):2213-2220.
- Kones R, Rumana U. 2014. Prevention of cardiovascular disease: updating the immensity of the challenge and the role of risk factors. *Hosp Pract (1995)* 42(1):92-100.
- Kraus WE. 2000. Genetic approaches for the investigation of genes associated with coronary heart disease. *Am Heart J* 140(4):S27-35.
- Lanz JR, Pereira AC, Lemos PA, Martinez E, Krieger JE. 2005. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with coronary artery disease severity. *Clin Chim Acta* 362(1-2):176-181.
- Leaman DM, Brower RW, Meester GT, Serruys P, van den Brand M. 1981. Coronary artery atherosclerosis: severity of the disease, severity of angina pectoris and compromised left ventricular function. *Circulation* 63(2):285-299.
- Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, Mehta JL. 2003. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 57(1):238-243.
- Li W, Liu C. 2014. The -344C/T polymorphism in the CYP11B2 gene is associated with essential hypertension in the Chinese. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. England: The Author(s) 2014.* 150-155.

- Lin R, Lei Y, Yuan Z, Ju H, Li D. 2012. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms and susceptibility of pre-eclampsia: a meta-analysis. *Ann Hum Genet* 76(5):377-386.
- Lindpaintner K, Pfeiffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. 1995. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332(11):706-711.
- Marian AJ, Safavi F, Ferlic L, Dunn JK, Gotto AM, Ballantyne CM. 2000. Interactions between angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and response of plasma lipids and coronary atherosclerosis to treatment with fluvastatin: the lipoprotein and coronary atherosclerosis study. *J Am Coll Cardiol*. United States. 89-95.
- Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS. 2007. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding. *J Biol Chem* 282(33):24262-24269.
- Mehri S, Mahjoub S, Farhati A, Bousaada R, Ben Arab S, Baudin B, Hammami M. 2011. Angiotensinogen gene polymorphism in acute myocardial infarction patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12(1):42-47.
- Mendonca I, Freitas IA, Sousa CA, Gomes S, Faria P, Drumond A, Silva G, Araujo JJ, Freitas S, Ornelas I, Andrade G, Coelho AP, Silva PM, Cardoso A, Brehm AA, dos Reis RP. 2004. Polymorphism of the ACE gene is associated with extent and severity of coronary disease. *Rev Port Cardiol* 23(12):1605-1611.
- Nair KG, Shalia KK, Ashavaid TF, Dalal JJ. 2003. Coronary heart disease, hypertension, and angiotensinogen gene variants in Indian population. *J Clin Lab Anal* 17(5):141-146.
- Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arie K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K. 1996. Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 125(2):161-169.
- Namsolleck P, Unger T. 2014. Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*. England. i62-i68.
- Neeland IJ, Patel RS, Eshtehardi P, Dhawan S, McDaniel MC, Rab ST, Vaccarino V, Zafari AM, Samady H, Quyyumi AA. 2012. Coronary angiographic scoring systems: an evaluation of their equivalence and validity. *Am Heart J* 164(4):547-552.e541.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. 2014. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 35(42):2929.
- Niemiec P, Zak I, Wita K. 2007. Modification of the coronary artery disease risk associated with the presence of traditional risk factors by insertion/deletion polymorphism of the ACE gene. *Genet Test* 11(4):353-359.
- Niemiec P, Zak I, Wita K. 2008a. The D allele of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is associated with the severity of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 46(4):446-452.
- Niemiec P, Zak I, Wita K. 2008b. The risk of coronary artery disease associated with cigarette smoking and hypercholesterolemia is additionally increased by the presence of the AT1R gene 1166C allele. *Biochem Genet* 46(11-12):799-809.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. 1998. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97(18):1766-1772.
- Ohishi M, Ueda M, Rakugi H, Naruko T, Kojima A, Okamura A, Higaki J, Ogihara T. 1997. Enhanced expression of angiotensin-converting enzyme is associated

- with progression of coronary atherosclerosis in humans. *J Hypertens* 15(11):1295-1302.
- Opolski G, Filipiak KJ. 2000. Właściwości farmakologiczne antagonistów receptorów AT1 dla angiotensyny II. In: Opolski G, Filipiak KJ, editors. *Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 71-79.
- Oren I, Brook JG, Gershoni-Baruch R, Kepten I, Tamir A, Linn S, Wolfvitz E. 1999. The D allele of the angiotensin-converting enzyme gene contributes towards blood LDL-cholesterol levels and the presence of hypertension. *Atherosclerosis* 145(2):267-271.
- Ortlepp JR, Janssens U, Bleckmann F, Lauscher J, Merkelbach-Bruse S, Hanrath P, Hoffmann R. 2001. A chymase gene variant is associated with atherosclerosis in venous coronary artery bypass grafts. *Coron Artery Dis* 12(6):493-497.
- Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F. 1999. Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension* 34(3):423-429.
- Patel S, Steeds R, Channer K, Samani NJ. 2000. Analysis of promoter region polymorphism in the aldosterone synthase gene (CYP11B2) as a risk factor for myocardial infarction. *Am J Hypertens* 13(2):134-139.
- Payne JR, Dhamrait SS, Toor IS, Cooper J, Jones A, Miller GJ, Humphries SE, Montgomery HE. 2004. The -344T>C promoter variant of the gene for aldosterone synthase (CYP11B2) is not associated with cardiovascular risk in a prospective study of UK healthy men. *Atherosclerosis* 174(1):81-86.
- Podolec P, Kopeć G, Pająk A, Undas A, Kozek E, Tykarski A, Naruszewicz M, Stańczyk J, Opala G, Godycki-Ćwirko M, Torbicki A, Musiał J. 2006. Konsensus Rady Redakcyjnej Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia dotyczący oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. *Forum Profilaktyki* 2(3):1-3.
- Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, Benetos A. 1998. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11(7):856-860.
- Polewczyk A, Janion M, Polewczyk M. 2011. Acute Coronary Syndromes in Women - Gender Specific Changes in Coronarography. In: Branislav B, editor. *The Need for Improvement in Medical i Interventional Therapy*.
- Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. 2012. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(6):H1219-1230.
- Pyorala K, De Backer G, Graham I, Poole-Wilson P, Wood D. 1994. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. *Atherosclerosis* 110(2):121-161.
- Qiu C, Han Z, Lu W. 2007. Association of polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and type 1 angiotensin II receptor genes with coronary heart disease and the severity of coronary artery stenosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27(6):660-663.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. 2014. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 5(8):927-946.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86(4):1343-1346.
- Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. 1992. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 20(6):1433.

- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. 2012. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125(1):188-197.
- Rosatto N, Pontremoli R, De Ferrari G, Ravazzolo R. 1999. Intron 16 insertion of the angiotensin converting enzyme gene and transcriptional regulation. *Nephrol Dial Transplant* 14(4):868-871.
- Ryu SK, Cho EY, Park HY, Im EK, Jang YS, Shin GJ, Shim WH, Cho SY. 2002. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) gene polymorphism as a risk factor of coronary in-stent restenosis. *Yonsei Med J* 43(4):461-472.
- Sayed-Tabatabaei FA, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, Wittteman JC. 2003. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke* 34(7):1634-1639.
- Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Wittteman JC. 2006. ACE polymorphisms. *Circ Res* 98(9):1123-1133.
- Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Lucas G, Elosua R. 2014. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *Appl Clin Genet*. 15-32.
- Scharplatz M, Puhan MA, Steurer J, Perna A, Bachmann LM. 2005. Does the Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism modify the response to ACE inhibitor therapy?--A systematic review. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 6:16.
- Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. 2000. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 101(12):1372-1378.
- Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. 2003. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7):1269-1275.
- Sharma R, Katz J. 2010. Preliminary studies on human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism, matrix metalloprotease-9, apoptosis, and carotid atherosclerosis plaque size by proton magnetic resonance imaging. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11(3):198-204.
- Sones FM, Jr., Shirey EK. 1962. Cine coronary arteriography. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 31:735-738.
- Sookoian S, Gianotti TF, Gonzalez CD, Pirola CJ. 2007. Association of the C-344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens* 25(1):5-13.
- Szczepańska-Sadowska E. 2000. Fizjologia i patofizjologia układu renina-angiotensyna-aldosteron. In: Opolski G, Filipiak KJ, editors. *Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 1-25.
- Tsukada K, Ishimitsu T, Teranishi M, Saitoh M, Yoshii M, Inada H, Ohta S, Akashi M, Minami J, Ono H, Ohroi M, Matsuoka H. 2002. Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. *J Hum Hypertens* 16(11):789-793.
- Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. 2006. The current role of ACE-inhibitors for secondary prevention in cardiovascular disease; from pathogenesis to clinical practice. *Cardiovasc Drugs Ther* 20(1):69-73.

- Wang JL, Li X, Hao PP, Feng X, Chen YG, Yun Z. 2010. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism and essential hypertension in Chinese: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. England.* 127-135.
- Wang L, Zhou J, Zhang B, Wang H, Li M, Niu Q, Chen Y, Chen R, Wen S. 2014. Association of echocardiographic left ventricular structure and -344C/T aldosterone synthase gene variant: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*
- Weber KT. 2001. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 345(23):1689-1697.
- White PC, Rainey WE. 2005. Editorial: polymorphisms in CYP11B genes and 11-hydroxylase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90(2):1252-1255.
- Wu C, Lu H, Cassis LA, Daugherty A. 2011. Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review. *N Am J Med Sci (Boston)* 4(4):183-190.
- Xu M, Sham P, Ye Z, Lindpaintner K, He L. 2010. A1166C genetic variation of the angiotensin II type I receptor gene and susceptibility to coronary heart disease: collaborative of 53 studies with 20,435 cases and 23,674 controls. *Atherosclerosis* 213(1):191-199.
- Xu MQ, Ye Z, Hu FB, He L. 2007. Quantitative assessment of the effect of angiotensinogen gene polymorphisms on the risk of coronary heart disease. *Circulation* 116(12):1356-1366.
- Xu P, Wang Y, Sterner-Kock A, Bader M, Schultheiss HP, Walther T. 2009. Excessive hypertension and end-organ damage in a transgenic mouse line carrying the rat angiotensinogen gene. *J Cardiovasc Pharmacol* 53(1):38-43.
- Ye S, Dhillon S, Seear R, Dunleavey L, Day LB, Bannister W, Day IN, Simpson I. 2003. Epistatic interaction between variations in the angiotensin I converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genes in relation to extent of coronary atherosclerosis. *Heart* 89(10):1195-1199.
- Zhu GF, Yang LX, Guo RW, Liu H, Shi YK, Ye JS, Yang ZH. 2014. microRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score. *Coron Artery Dis* 25(4):304-310.
- Zintzaras E, Raman G, Kitsios G, Lau J. 2008. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 168(10):1077-1089.