

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Leszek Drabik

Związek polimorfizmów genów dla receptora chemokinowego typu 7  
oraz chemokiny CCL19 z miażdżycą naczyń wieńcowych

*Praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. n.med. Ryszard Korbut

Pracę wykonano w Katedrze Farmakologii Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n.med. Ryszard Korbut

Kraków, 2012 rok

Panu prof. Ryszardowi Korbutowi,  
Panu dr Pawłowi Wołkowowi,  
składam serdeczne podziękowania za cenne uwagi i wskazówki  
udzielane podczas pisania niniejszej pracy.

## SPIS TREŚCI

	strona
<b>Wprowadzenie</b> .....	5
Znaczenie miażdżycy. Choroba niedokrwienność serca.....	5
Czynniki środowiskowe i genetyczne miażdżycy.....	5
Znaczenie kliniczne badań nad uwarunkowaniami genetycznymi miażdżycy.....	11
- ocena ryzyka sercowo-naczyniowego.....	11
- farmakogenomika.....	12
- terapia genowa.....	13
- rewaskularyzacja mięśnia sercowego.....	14
Patogeneza miażdżycy.....	15
- znaczenie komórek dendrytycznych.....	16
- rola cytokin, receptora chemokinowego CCR7 oraz ligandu CCL19.....	17
<b>Cele pracy</b> .....	19
<b>Metodyka badań</b> .....	20
Baza danych klinicznych.....	20
Wybór polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 .....	22
Metoda PCR .....	25
Hybrydyzacja typu “ reverse dot blot” .....	28
Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych.....	34
Analiza statystyczna.....	38
<b>Wyniki</b> .....	39
Równowaga Hardy’ego-Weinberga badanych polimorfizmów .....	40
Charakterystyka kliniczna badanej populacji.....	41
Analiza danych angiograficznych.....	43
Analiza wpływu badanych polimorfizmów na wybrane zmienne kliniczne .....	45
Analiza wieloczynnikowa.....	64
Analiza haplotypów.....	66
<b>Omówienie wyników</b> .....	68
<b>Wnioski</b> .....	80
<b>Streszczenie</b> .....	81
<b>Piśmiennictwo</b> .....	83



## **WPROWADZENIE**

### **Znaczenie miażdżycy**

Powikłania miażdżycy naczyń tętniczych odpowiadają za 42% zgonów w Unii Europejskiej i 48% w populacji Polskiej. Choroba niedokrwienna serca oraz udar mózgu, będące najczęstszymi manifestacjami klinicznymi miażdżycy, zajmują dwa pierwsze miejsca wśród wszystkich przyczyn zgonów w Unii Europejskiej [1]. Tylko choroba niedokrwienna serca, jest odpowiedzialna za około 40 tys. zgonów i 230 tys. hospitalizacji rocznie w Polsce. Co piąty zgon z tego powodu dotyczy osób poniżej 65 roku życia [2,3]. Dzięki intensywnemu rozwojowi metod profilaktyki i leczenia, śmiertelność z powodu choroby niedokrwiennej serca systematycznie się obniża [4]. Wraz z rozpowszechnieniem interwencji na naczyniach wieńcowych, leków fibrynolitycznych, leczenia przeciwzakrzepowego i prewencji wtórnej, śmiertelność w pierwszym miesiącu po zawale serca zmniejszyła się od połowy lat 80-tych z 16%, do 4-6% obecnie [5]. Pomimo to, choroby naczyń tętniczych są obecnie największym problemem zdrowotnym w Polsce, jak i w całej Unii Europejskiej.

### **Choroba niedokrwienna serca**

Pojęcie „choroba niedokrwienna serca” obejmuje wszystkie stany niedokrwienia mięśnia sercowego, bez względu na patomechanizm. Termin „choroba wieńcowa” jest pojęciem węższym, odnosi się do stanów niedokrwienia mięśnia sercowego, związanych ze zmianami w tętnicach wieńcowych, powodującymi upośledzenie perfuzji mięśnia sercowego. Podział kliniczny choroby wieńcowej wyróżnia stabilne zespoły wieńcowe: dławicę piersiową stabilną, sercowy zespół X, dławicę związaną z mostkami mięśniowymi nad tętnicami wieńcowymi oraz ostre zespoły wieńcowe (z uniesieniem odcinka ST i bez uniesienia odcinka ST) [6].

### **Czynniki środowiskowe i genetyczne miażdżycy**

Za zwiększenie ryzyka rozwoju miażdżycy oraz jej powikłań, odpowiadają zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Wpływ i znaczenie czynników środowiskowych jest stosunkowo dobrze poznany. Liczne badania wykazały, że takie czynniki ryzyka, jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, hypercholesterolemia, otyłość przyczyniają się do rozwoju miażdżycy [7,8].

Pomimo istotnego wpływu czynników środowiskowych, obciążający wywiad rodzinny w kierunku chorób układu sercowo-naczyniowego, pozostaje niezależnym czynnikiem ryzyka, sugerując istnienie genów zwiększających ryzyko rozwoju miażdżycy [9]. Najczęściej spotykaną ogólną miarą wpływu czynników genetycznych na badaną cechę, jest jej dziedziczność (ang. *heritability*,  $h^2$ ), czyli ta część zmienności fenotypowej, która została wywołana przez czynniki genetyczne. Na podstawie szwedzkiego rejestru, obejmującego obserwację 20 tysięcy par bliźniąt przez 36 lat, dziedziczność dławicy piersiowej szacuje się na 39% u mężczyzn i 43% u kobiet, a dziedziczność zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych na 38% u mężczyzn i aż 57% u kobiet [10].

Istnieją rzadkie przyczyny monogenowe miażdżycy np. hipercholesterolemia rodzinna (dotychczas opisano kilkaset różnych mutacji w obrębie genu receptora LDL), rodzinna hyperlipidemia (spowodowana mutacją w genie cytochromu 450 CYP7A1), rodzinny defekt apolipoproteiny B, homocystynuria (mutacja enzymu - syntazy  $\beta$ -cystationionowej), choroba Tangierska (mutacja w genie ATP-binding cassette-1) oraz rodzinnie występująca postać choroby wieńcowej spowodowana mutacją genu MEF2A (ang. Myocyte-specific enhancer factor 2A), kodującego czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję białek śródbłonka tętnic wieńcowych) [6,11,12]. W postaciach monogenowych, to podłoże genetyczne w największym stopniu determinuje rozwój miażdżycy, a udział czynników środowiskowych ma ograniczone znaczenie. W obrazie klinicznym charakterystyczne jest przedwczesne występowanie miażdżycy oraz jej powikłań [13].

Wpływ czynników genetycznych na rozwój miażdżycy, przejawia się najczęściej, w działaniu wielu genów, z których każdy wykazuje stosunkowo niewielki efekt działania, modyfikowany przez czynniki środowiskowe [14,15]. Większość prowadzonych obecnie badań skupia się na roli zmienności genetycznej. Polimorfizm genetyczny oznacza występowanie w populacji dwóch lub więcej postaci danego genu (alleli), z częstością wyższą, niż wynikająca z samej mutacji. Zakłada się arbitralnie, że najrzadszy wariant alleliczny w danym locus, występuje w populacji z częstością większą niż 1% [16].

Najczęstszą postacią polimorfizmu genetycznego, występującą z częstością 1 na 1200 par zasad i odpowiadającą za ok. 90% zmienności w ludzkim genomie, jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Polymorphism – SNP), w którym zmiana dotyczy jednego nukleotydu [17,18].

W projekcie mapy zmienności ludzkiego genomu – HapMap (faza 3), zgenotypowano dotychczas ok. 1,5 miliona polimorfizmów, wśród 1387 osób należących do 11 populacji m.in zachodnioeuropejskiej, nigeryjskiej, kenijskiej, meksykańskiej, japońskiej i chińskiej [18,19].

Jedną z pierwszych chorób, której etiologię ustalono dzięki badaniom nad polimorfizmem genów, jest zwyrodnienie plamki żółtej (Age-Related Macular Degeneration; AMD), będące w krajach rozwiniętych najczęstszą przyczyną ślepoty osób w podeszłym wieku. Wykazano, że obecność allelu C rs380390 lub allelu C rs1329428, w genie dla czynnika H dopełniacza, zwiększa 4,6-krotnie szansę wystąpienia AMD. Obecność wspomnianych alleli w sekwencjach kodujących genu prowadzi do zmiany struktury białka i jego funkcji, a w konsekwencji do nieprawidłowego funkcjonowanie układu dopełniacza [20]. Obecnie w I fazie badań klinicznych znajdują się swoiste leki bazujące na tym odkryciu, takie jak POT-4 firmy Potentia Pharmaceuticals i ARC1905 firmy Ophthotec [21].

W badaniach nad rolą polimorfizmu pojedynczych nukleotydów, wykorzystywane są najczęściej dwa typy analiz: analiza sprzężeń (linkage analysis) i analiza związku (association study, case-control study). Analiza sprzężeń oparta jest na obserwacji, że w trakcie procesu „crossing over”, zachodzącego w mejozie, markery genetyczne dziedziczą się, zależnie od odległości od węzłów rekombinacji tzw. „recombination hotspots”. W przypadku bliskiego położenia markerów, prawdopodobieństwo ich niezależnego rodziła, jest niskie. Oceniając dziedziczenie panelu markerów, u członków rodzin z daną chorobą genetyczną, możliwe jest wykrycie, które z markerów znajdują się w bliskości fizycznej poszukiwanego genu choroby [22-24]. Analiza sprzężeń odegrała kluczową rolę w identyfikacji loci chorób jednogenowych, jednak w przypadku chorób wielogenowych, wyższą moc wykazują badania związku [15]. W badaniach związku, porównuje się częstość występowania określonych alleli danego genu kandydata, w grupie niespokrewnionych chorych i w grupie kontrolnej [14, 22-24]. Do niedawna dominowały badania genów kandydatów wyznaczonych na podstawie różnych przesłanek patofizjologicznych. W przypadku miażdżycy i jej powikłań były to geny regulujące: metabolizm lipidów, równowagę układu krzepnięcia i fibrynolizy, zapalenie, funkcję naczyń i płytek krwi [25-28]. Liczne prace, oparte na niewielkich populacjach, sugerowały rolę polimorfizmu genu: protrombiny, czynnika V Leiden, czynnika VII, promotora inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1, glikoproteiny Ib i IIb, trombopoetyny, syntazy tlenku azotu, apolipoproteiny-B i apolipoproteiny-E, selektyny-E, CD-14, adhezyny PECAM-1 [25].

Próbie potwierdzenia znaczenia opisywanych w literaturze genów, podjęto w ramieniu genetycznym badania INTERHEART, obejmującym 8579 osób, gdzie analizowano związek 1536 polimorfizmów zlokalizowanych w 103 genach, z ryzykiem zawału serca. Znamienność statystyczną, wykazano jedynie w przypadku polimorfizmów genu: apolipoproteiny B, apolipoproteiny E2 oraz receptora LDL [29]. W opublikowanej w 2006 roku metaanalizie 340 badań, w których wzięło udział łącznie 248000 pacjentów, wykazano związek 15 polimorfizmów, z ryzykiem rozwoju choroby niedokrwiennej serca i zawału serca. Były to warianty genów dla ACE, receptora AT1, białka przenoszącego estry cholesterolu, apolipoproteiny-B, apolipoproteiny E, lipazy lipoproteinowej, paraoksynazy 1, promotora inhibitora aktywatora plazminogenu – 1, syntazy tlenu azotu, reduktazy MTHF. Ograniczeniem pracy była znaczna niejednorodność badań [30].

Obecnie najważniejszą metodą badań nad podłożem genetycznym zmienności cech osobniczych (np. wzrostu, ciśnienia tętniczego), predyspozycji do występowania chorób oraz odpowiedzi na leczenie, stanowią badania asocjacyjne całego genomu - Genome Wide Association Studies (GWAS). Wysoka przepustowość GWAS, pozwala na ocenę dziesiątków tysięcy polimorfizmów, w populacjach liczących tysiące chorych [31]. Baza danych opublikowanych GWAS obejmuje 1181 badań i 5907 polimorfizmów (stan na 24.02.2012) [32]. Dzięki zastosowaniu tej metody, od 2007 roku do 2012, odkryto 35 polimorfizmów odpowiadających za 13 procent dziedziczności choroby niedokrwiennej serca [33]. Badania GWAS nie potwierdziły związku z rozwojem miażdżycy tętnic wieńcowych większości opisywanych w literaturze genów kandydatów [30,33]. Najwyższa powtarzalność badań GWAS, dotyczących choroby niedokrwiennej serca, cechuje polimorfizm rs1333049 znajdujący się na krótkim ramieniu chromosomu 9 (9p21.3) [35-38]. W metanalizie 7 badań obejmującej 12004 chorych i 28949 osób w grupie kontrolnej wykazano, że obecność allelu C rs1333049, zwiększa ryzyko choroby niedokrwiennej serca 1,6-krotnie u homozygot i 1,3-krotnie u heterozygot [39]. Częstość występowania w populacji jednej kopii alelu C jest szacowana na 50%, a dwóch kopii na 25% [37].

Istnieje niewiele badań, w których analizowano wpływ czynników genetycznych na lokalizację i zaawansowanie zmian miażdżycowych, w angiografii tętnic wieńcowych. W badaniach nad dziedzicznością choroby naczyń wieńcowych u bliźniąt wykazano, że obecność blaszek miażdżycowych w częściach proksymalnych naczyń, morfologia zmian i obecność zwapnień, są w znacznej mierze cechami dziedzicznymi, natomiast liczba zajętych naczyń oraz lokalizacja blaszek miażdżycowych w częściach dystalnych naczyń to cechy,



które dziedziczą się w niewielkim stopniu [40]. Wykazano, że allel C rs1333049, zwiększa ryzyko zaawansowanych zmian miażdżycowych - zająć pnia lewej tętnicy wieńcowej oraz choroby trójnaczyniowej, prawdopodobnie poprzez wzrost objętości blaszek miażdżycowych, bez istotnego wpływu na ryzyko ich destabilizacji [41]. Mechanizm zwiększenia ryzyka choroby niedokrwiennej serca przez polimorfizmy 9p.21 jest niejasny, ponieważ rejon ten nie zawiera sekwencji kodujących. Sugerowane jest zaburzenie funkcji genów leżących w sąsiedztwie – CDKN2B, CDKN2A, będących regulatorami cyklu komórkowego, genu kodującego fosforylaze metyloadenozyny - enzymu metabolizmu puryn oraz genów regulujących reaktywność płytek krwi [42,43]. Większość z 35 polimorfizmów odkrytych w badaniach GWAS, trudno powiązać z konkretnym mechanizmem patofizjologicznym, który tłumaczyłby zwiększone ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca [33]. Proponowana jest rola mechanizmów regulujących „cis”, mogących zmieniać poziom ekspresji genów w odległych rejonach genomu [44].

Badania nad podłożem genetycznym chorób złożonych, jako badania retrospektywne, dla oceny wielkości efektu, najczęściej posługują się pojęciem ilorazu szans („odds ratio” - OR), będącego ilorazem szansy wystąpienia określonego stanu klinicznego w grupie ekspozowanej i grupie kontrolnej [45]. Dotychczas poznane polimorfizmy zwiększają szansę wystąpienia choroby niedokrwiennej serca nieznacznie (OR 1,07-1,92). Wielkość efektu jest typowa dla chorób złożonych, w których poszczególne geny i polimorfizmy, wykazują stosunkowo niewielki efekt działania, sumujący się przy określonym genotypie i podlegający wpływowi czynników środowiskowych [17, 33].

Wpływ czynników genetycznych i środowiskowych w rozwoju choroby niedokrwiennej serca jest wzajemny. Czynniki genetyczne mogą decydować o stopniu nasilenia środowiskowych czynników ryzyka i odpowiedzi na nie, a czynniki środowiskowe modyfikować efekt genów. Model obejmujący 95 polimorfizmów tłumaczy ok. 13% zmienności stężenia frakcji LDL [46]. Polimorfizm genu TRIB1 (*Drosophila tribbles* homologue), regulującego kaskadę kinaz aktywowanych mitogenami, decyduje o stężeniu frakcji LDL, HDL i trójglicerydów [46]. Zmienność w obrębie genu 17- $\alpha$  hydroksylazy (CYP17A1), koreluje z wysokością skurczowego ciśnienia tętniczego [47]. Obecność allelu A w pozycji 20210 genu protrombiny, zwiększa 11-krotnie ryzyko zawału serca niezakończonego zgonem, w grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym, stosujących hormonalną terapię zastępczą [48].

W grupie osób palących papierosy, poniżej 68 roku życia, genotyp DD w genie dla enzymu konwertującego angiotensynę (polimorfizm I/D), wiąże się z 5-krotnie większym ryzykiem zawału serca [49]. W metaanalizie oceniającej predyspozycje genetyczne uzależnienia od tytoniu, obejmującej ponad 140000 badanych, z rozpoczęciem palenia korelowało 8 polimorfizmów m.in. w obrębie genu neurotrofiny (BDNF). Polimorfizm w sąsiedztwie genu beta-hydroksylazy dopaminy wpływał na prawdopodobieństwo zaprzestania palenia, a polimorfizmy genu receptora nikotynowego CHRN3 oraz regionu 10q25, 9q13 miały związek z liczbą wypalanych codziennie papierosów [50]. Badania przeprowadzone wśród sportowców wskazują, że polimorfizm I/D genu enzymu konwertującego angiotensynę odpowiada za zdolność do długotrwałego wysiłku u biegaczy długodystansowych i himalaistów [51]. Dla większości polimorfizmów opisanych w badaniach GWAS (22 z 34) nie obserwuje się jednak związku z klasycznymi czynnikami ryzyka [33].

Dalszego postępu w badaniach nad zmiennością genetyczną, a także regulacją ekspresji genów, epigenetyką, transkryptomiką, można oczekiwać, dzięki zastosowaniu nowej generacji metod sekwencjonowania - Next-Generation Sequencing (NGS), cechujących się niezwykle wysoką przepustowością [34]. NGS umożliwiają istotną redukcję kosztu sekwencjonowania całego genomu, z 70 milionów dolarów przy zastosowaniu metod pierwszej generacji np. metody Sangera, do kilkudziesięciu tysięcy dolarów, przy wykorzystaniu aparatów NGS, takich jak: GAIIx (Illumina), GS-FLX Titanium (454 Sequencing), SOLID 3 (Applied Biosystems), Single Molecule Sequencer (Helicos) [35]. W drugiej połowie 2012 roku w sprzedaży pojawi się System GridIon firmy Oxford Nanopore Technologies, umożliwiający zsekwencjonowanie ludzkiego genomu w 15 minut. System MinIon tej samej firmy, zminiaturyzowany do wielkości pamięci USB, umożliwia w cenie 900 dolarów, sekwencjonowanie dziesiątek milionów par zasad. Systemy Oxford Nanopore wykorzystują zjawisko zmian w potencjale elektrycznym błon polimerowych, podczas transportu nici DNA, przez białkowe kanały (nanopory) obecne w błonie [144].

## **Znaczenie kliniczne badań nad uwarunkowaniami genetycznymi miażdżycy i jej powikłań**

Najczęstszy typ zmienności genetycznej w ludzkim genomie, jakim jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu, prawdopodobnie odgrywa rolę na każdym etapie rozwoju choroby niedokrwiennej serca: od fazy narażenia na czynniki ryzyka, przez okres bezobjawowy, po manifestację kliniczną oraz rozwój powikłań, decyduje także o odpowiedzi na leczenie [33,46,47]. Testy genetyczne, oparte na analizie polimorfizmów genu, mogą posłużyć do potwierdzenia diagnozy, przewidywania ryzyka rozwoju choroby, wykrycia bezobjawowego nosicielstwa genów ryzyka oraz oceny skuteczności profilaktyki i leczenia. Złożone podłoże genetyczne choroby niedokrwiennej serca wskazuje na ograniczoną możliwość zastosowania swoistych metod leczenia [33].

### **Ocena ryzyka sercowo-naczyniowego**

Pula polimorfizmów może stanowić podstawowy czynnik etiologiczny choroby niedokrwiennej serca [33]. Dla większości chorób zidentyfikowano dotychczas od 10 do 30 polimorfizmów ryzyka, jednak skale ryzyka oparte na włączeniu znanych SNP do dotychczas stosowanych modeli, wiążą się z niewielką lub umiarkowaną poprawą zdolności predykcyjnej skal dla indywidualnych pacjentów [52,53].

W modelu Malmö Diet and Cancer Study, zawierającym 9 polimorfizmów korelujących, ze stężeniem cholesterolu frakcji LDL i HDL, wraz ze wzrostem liczby alleli ryzyka obserwowano liniowy wzrost stężenia frakcji LDL, spadek stężenia frakcji HDL oraz zwiększenie ryzyka choroby niedokrwiennej serca [54].

W innym, skandynawskim badaniu prospektywnym, obejmującym 30725 uczestników bez jawnej choroby układu sercowo-naczyniowego, oceniano wartość predykcyjną panelu 13 polimorfizmów, wykazujących silny związek z chorobą niedokrwinną serca. W 10-letnim okresie obserwacji, w podgrupie z przewidywanym najwyższym ryzykiem genetycznym, w oparciu o panel, częstość występowania choroby niedokrwiennej serca była o 70% wyższa, niezależnie od wpływu klasycznych czynników ryzyka [55].

W modelu konsorcjum Wellcome Trust Case-Control, zawierającym 9 polimorfizmów, częstość występowania choroby niedokrwiennej serca w badanej grupie, wzrastała proporcjonalnie do liczby alleli ryzyka. W grupie najwyższego ryzyka iloraz szans wynosił 2,2. Wzrost ryzyka choroby niedokrwiennej serca w modelu był niezależny od klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [56].

## **Farmakogenomika**

Indywidualizacja terapii farmakologicznej choroby niedokrwiennej serca, w zależności od genotypu pacjenta, stwarza nadzieję na zwiększenie skuteczności i zmniejszenie ryzyka działań ubocznych leczenia oraz optymalizację czasu stosowania terapii.

Dostępne dane dotyczące redukcji ryzyka zawału serca i udaru mózgu są niejednoznaczne, z powodu niskiej powtarzalności badań [57,58]. W badaniu, do którego włączono 1038 chorych z nadciśnieniem tętniczym, polimorfizm Tryp460Gly genu alfa-adducyny, regulującego reabsorpcję nerkową sodu wiązał się ze zmniejszeniem ryzyka zawału serca niezakończonym zgonem i udaru mózgu w odpowiedzi na leczenie diuretykami (OR, 0.49; 95% CI, 0.32-0.77). Zależności takiej nie obserwowano dla innych grup leków hypotensyjnych [57]. W największym, badaniu z zakresu farmakogenomiki GenHAT (Genetics of Hypertension Associated Treatment) przeprowadzonym na grupie 42418 chorych z nadciśnieniem tętniczym, oceniano wpływ polimorfizmów genów układu renina-angiotenzyna-aldosteron oraz genów regulujących homeostazę sodową, funkcję śródbłonka, gospodarkę lipidową, oporność na insulinę, na odpowiedź na różne grupy leków hypotensyjnych [58]. Nie potwierdzono wpływu polimorfizmu Tryp460Gly genu alfa-adducyny oraz sposobu leczenia hypotensyjnego (chlortalidon, amlodypina, lizynopril, doksazosyna) na częstość występowania choroby niedokrwiennej serca [59]. Wykazano natomiast, że leczenie lizynoprilem, w porównaniu z leczeniem amlodypiną, w grupie chorych z polimorfizmem 455G>A genu fibrynogenu beta, zwiększało ryzyko udaru mózgu [60]. Genotyp TT polimorfizmu T2238C w obrębie genu NPPA, kodującego przedsiolkowy peptyd natriuretyczny, wiązał się z korzystniejszym rokowaniem, w przypadku leczenia blokerem kanału wapniowego, obecność allelu C determinowała lepszą odpowiedź terapeutyczną na diuretyki [61].

Liczne prace oceniają wpływ farmakoterapii i genotypu na drugorzędowe punkty końcowe, będące uznanymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego np. przerost mięśnia lewej komory czy białkomocz. W badaniu EUCLID, obejmującym 530 chorych z cukrzycą typu 1, genotyp II w genie dla enzymu konwertującego angiotensynę (polimorfizmu I/D ACE), wiązał się z największą redukcją albuminurii, w trakcie leczenia lizynoprylem [62]. W grupie chorych po przeszczepie nerki, z nadciśnieniem tętniczym leczonym lizynoprylem, obecność genotypu DD ACE był niezależnym czynnikiem wielkości redukcji przerostu mięśnia lewej komory [63].

Znajomość czynników genetycznych determinujących farmakokinetykę i farmakodynamikę leku, może zmniejszyć ryzyko istotnych działań ubocznych, częstość hospitalizacji, wpływając na rokowanie i jakość życia chorych. Wykazano, że obecność wariantów CYP2C9\*2 i CYP2C9\*3 cytochromu P450, wiąże się ze zmniejszeniem aktywności enzymatycznej cytochromu do 12% i 5%, w stosunku do najczęstszego allelu CYP2C9\*1. Stosowanie warfaryny w standardowych dawkach, u pacjentów z wariantami CYP2C9\*2 i CYP2C9\*3 zwiększa ryzyko krwawienia, z powodu zahamowania rozkładu enancjomeru S-warfaryny i wzrostu jego stężenia we krwi [64,65]. Szacuje się, że obecność genotypów CYP2C9 i reduktazy epoksydu witaminy K (VKORC1) odpowiada za 35 do 50% zmienności w ostatecznej dawce warfaryny [66]. Skonstruowanie haplotypów, na bazie 10 polimorfizmów VKORC1, pozwala na stratyfikację pacjentów z niskim i wysokim zapotrzebowaniem na warfarynę [67]. W badaniu Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study wykazano, że leczenie przeciwnieprzytępliwych chorych, u których znano genotyp CYP2C9 i VKORC1, wiązało się ze zmniejszeniem ryzyka hospitalizacji z powodu krwawienia o 28% w trakcie 6 miesięcy obserwacji [65,68]. Wyniki badania doprowadziły do zmian zaleceń dotyczących bezpieczeństwa stosowania warfaryny przez Amerykańską Agencję ds. Leków (FDA) [31].

### **Terapia genowa**

Wiedza o mechanizmach genetycznych rozwoju choroby niedokrwiennej serca, daje nadzieje nie tylko na optymalizację już istniejącej farmakoterapii, ale także na ich modyfikację za pomocą terapii genowej. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań, z zastosowaniem terapii genowej, są niejednoznaczne. W większości badań obserwowano korzystny wpływ na takie parametry jak: perfuzja mięśnia sercowego oceniana metodą SPECT i zapotrzebowaniem na azotany, tolerancja wysiłku, grubość i lokalna kurczliwość mięśnia sercowego w rezonansie magnetycznym serca, jakość życia; część badań nie wykazywała korzyści względem placebo [69-71].

W niedawno zakończonym polskim badaniu VIF-CAD (Angiogenesis Using VEGF-A165/bFGF Plasmid Delivered Percutaneously in No-option CAD Patients), pacjentom z zaawansowaną chorobą wieńcową, którzy otrzymywali optymalne leczenie farmakologiczne, zgodne z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i nie kwalifikowali się do rewaskularyzacji metodami standardowymi, podawano w trakcie cewnikowania serca do mięśnia lewej komory, plazmid zawierający czynniki wzrostu naczyń - VEGF i FGF.

W obserwacji jednorocznej, terapia genowa nie spowodowała poprawy perfuzji mięśnia sercowego ocenianej metodą SPECT, obserwowano jedynie poprawę tolerancji wysiłku i zmniejszenie nasilenia objawów klinicznych choroby wieńcowej [21,72].

### **Rewaskularyzacja mięśnia sercowego**

W wybranych grupach chorych z chorobą niedokrwienną serca, rewaskularyzacja naczyń wieńcowych poprawia rokowanie i jakość życia, w porównaniu z leczeniem farmakologicznym [5,73]. Aktualne wytyczne dotyczące rewaskularyzacji mięśnia sercowego w stabilnej dławicy piersiowej, uznają za istotne hemodynamicznie, zmiany powodujące redukcję światła naczynia o ponad 50%, jeżeli udokumentowano niedokrwienia badaniami nieinwazyjnymi lub wykazano istotne zmniejszenie rezerwy wieńcowej metodą FFR (fractional flow reserve) [73]. Obok rozległości niedokrwienia, do najważniejszych czynników decydujących o wyborze metody rewaskularyzacji tętnic wieńcowych, należy lokalizacja zmian miażdżycowych. Angioplastyka naczyń wieńcowych (PCI) jest preferowaną metodą w zawale serca, a wśród chorych ze stabilną chorobą wieńcową, w przypadku choroby jedno- lub dwunaczyniowej, nieobejmującej początkowego odcinka gałęzi międzykomorowej przedniej. Pomostowanie aortalno-wieńcowe (CABG) wykazuje przewagę nad PCI, u chorych z zajęciem pnia lewej tętnicy wieńcowej lub proksymalnego odcinka gałęzi międzykomorowej przedniej, chorobą wielonaczyniową, cukrzycą lub przewlekłą chorobą nerek [73]. Badania genetyczne mogą mieć znaczenie w wyborze metody terapii. Polimorfizmy rejonu 9p21 korelują z obecnością najbardziej zaawansowanych form choroby wieńcowej - zajęciem pnia lewej tętnicy wieńcowej oraz chorobą trójnaczyniową, w których preferowaną metodą leczenia jest pomostowanie aortalno-wieńcowe [41].

Istotnym ograniczeniem angioplastyki wieńcowej jest nawrót zwężenia poszerzanej tętnicy (restenoza) i konieczność ponownej rewaskularyzacji. Znanymi czynnikami ryzyka restenozy są m.in. cukrzyca, stosowanie stentów metalowych, liczba stentów oraz średnica stentu poniżej 3mm [74]. Mechanizmy genetyczne mogące decydować o odpowiedzi zapalnej na wszczepienie stentu i ryzyko restenozy w stencie są słabo poznane. Sugerowana jest rola polimorfizmu genu receptora adrenergicznego beta-2 (ADRB2), czynnika stymulującego wzrost granulocytów i makrofagów (CSF2), chemokiny CCL11 oraz receptora CD14 [75].

## **Patogeneza miażdżycy**

Obecne koncepcje procesu miażdżycowego naczyń krwionośnych uznają kluczową rolę procesu zapalnego, w którym mechanizmy immunologiczne współdziałają z czynnikami metabolicznymi, w zapoczątkowaniu i rozwoju zmian [7, 76-77].

W procesie powstawania blaszki miażdżycowej można wyróżnić szereg etapów [76]. Pasma tłuszczowe (ang. „fatty streaks”) obecne w błonie wewnętrznej tętnic, stanowią najwcześniej rozpoznawalną makroskopowo zmianę miażdżycową, obecną już w badaniach autopsyjnych u dzieci. Rozwój pasm tłuszczowych jest związany z ogniskowym odkładaniem się lipidów, wywodzących się głównie z lipoprotein osocza [76]. Przedostające się do intymy lipoproteiny, w szczególności frakcji LDL, mogą ulec modyfikacji, prowadząc do powstania silnie aterogennych utlenowanych cząsteczek ox-LDL. W przestrzeni podśródbłonkowej, dochodzi do kontaktu zmodyfikowanych cząsteczek LDL z siecią immunokompetentnych komórek, rozpoznających sygnały zagrożenia [77, 78]. Wytworzony przez nie gradient chemotaktyczny przyciąga z krwi do ściany tętnicy monocyty, komórki immunologiczne i komórki macierzyste [76-79]. Kaskada reakcji zapalnych oraz wychwyt ox-LDL przez makrofagi, prowadzi do powstawania komórek piankowatych (ang. „foam cells”), tworzących pasma tłuszczowe i ostatecznie rdzeń lipidowy blaszki miażdżycowej [76, 80]. Rdzeń lipidowy dojrzałych blaszek miażdżycowych, zostaje pokryty od strony światła naczynia przez czapkę włóknistą (ang. fibrous cap) zbudowaną z komórek mięśniówki gładkiej, macierzy pozakomórkowej, komórek zapalnych i ich mediatorów. Neowaluskaryzacja rdzenia blaszki przez naczynia przydanki, rozwój nacieków zapalnych w regionie brzeżnych, prowadzi do powstania tzw. zmian złożonych (ang. „complicated lesion”) [76, 79]. Blaszkami miażdżycowymi o tym charakterze wykazują zwiększone ryzyko pęknięcia w porównaniu z blaszkami włóknisto-tłuszczowymi. Pękająca blaszka, uwalniając trombogenną zawartość prowadzi do powstania zakrzepu i zatoru tętniczego, którego konsekwencją kliniczną może być zawał serca, udar mózgu [76].

Zapalenie rozumiane, jako złożony układ interakcji pomiędzy czynnikami rozpuszczalnymi i komórkami, powstający w tkance w odpowiedzi na uraz, zakażenie, niedokrwienie, uszkodzenie toksyczne lub autoimmunologiczne, odgrywa rolę na każdym etapie rozwoju blaszki miażdżycowej [81]. Kluczowy w początkowym etapie rozwoju zmian miażdżycowych proces migracji i różnicowania się monocytów w makrofagi i ostatecznie komórki piankowate, jest zależny od wielu cytokin i czynników wzrostu, produkowanych przez zmieniony zapalnie śródbłonek [76].

Aktywowany, zmieniony prozapalnie śródbłonek wykazuje ekspresję cytokin (m.in. białka chemotaktycznego monocytów MCP-1, interleukiny 8), cząsteczek adhezyjnych (międzykomórkowych – ICAM-1 oraz naczyniowych VCAM-1, selektyny E i P), umożliwiając rekrutację limfocytów i makrofagów oraz infiltrację warstwy podśródbłonkowej przez komórki i powstanie wczesnych form miażdżycy - pasm tłuszczowych [7,82]. Rozwój zaawansowanych zmian miażdżycowych jest wynikiem oddziaływania komórek zapalnych obecnych w blaszce miażdżycowej -monocytów/makrofagów, limfocytów (T, B, NKT), komórek dendrytycznych i mastocytów. Wydzielane przez aktywowane komórki proteazy, poprzez rozkład macierzy pozakomórkowej, prowadzą do osłabienia czapeczki włóknistej, zwiększając prawdopodobieństwo pęknięcia blaszki miażdżycowej, powstania zakrzepu i manifestacji klinicznej [83]. Badania krytycznych zmian, odpowiadających za zawał serca, wykazują, że zapalenie jest głównym czynnikiem odpowiadającym za pęknięcie blaszki miażdżycowej i erozję jej powierzchni [84,85]. Poprzez produkcję czynników prozakrzepowych komórki zapalne nasilają powstawanie zakrzepu na powierzchni uszkodzonej blaszki miażdżycowej [ 76-77].

### **Znaczenie komórek dendrytycznych w rozwoju miażdżycy**

Komórki dendrytyczne (DC), należą do komórek prezentujących antygen, które rozpoznają obce i potencjalnie niebezpieczne antygeny i prezentują je w kontekście antygeny głównego układu zgodności tkankowej MHC I i II, obecnego na ich powierzchni, łącząc w ten sposób cechy komórek odporności swoistej i nieswoistej [86].

W 2011 roku Ralph M. Steinman otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, za wykazanie roli komórek dendrytycznych w funkcjonowaniu odporności [87].

Dojrzewanie DC wiąże się ze zwiększeniem skuteczności prezentacji antygeny limfocytom. Dojrzałe DC posiadają receptory chemokinowe (CCR, CXCR- CCR4, CCR7, CXCR4) oraz wydzielają liczne chemokiny: CCL19 (C-C motif chemokine 19), MDC (macrophage-derived chemokine), TRAC (thymus and activation-regulated chemokine), PARC (thymus and activation-regulated chemokine), IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) [88].

Gen CCR 7 koduje receptor sprzężony z białkiem G. Ekspresję receptora stwierdzano na powierzchni komórek dendrytycznych, limfocytów B oraz T. Funkcja biologiczna CCR7 obejmuje: aktywację limfocytów B oraz T, kontrolę migracji limfocytów T do zmienionych zapalnie tkanek oraz stymulację dojrzewania komórek dendrytycznych [89,90].



Poprzez receptor CCR7, wirus Epstein-Barr (EBV) wywiera swój wpływ na limfocyty B [88]. Chemokiny CCL19 i CCL21 to ligandy dla receptora CCR7, produkowane przez komórki zrębu węzłów chłonnych [91].

Komórki dendrytyczne mogą odgrywać rolę na wielu etapach rozwoju procesu miażdżycowego, przy czym istnieją przesłanki wskazujące na zarówno na ich pro-, jak i przeciwmiażdżycowe działanie. Zwiększoną liczbę DC w ścianie tętnic obserwuje się nie tylko na wczesnych etapach miażdżycy, ale także w niezmiennych miażdżycowo naczyniach, w miejscach poddanych większemu stresowi hemodynamicznemu. Migracji ze światła naczyń oraz z naczyń przydanki tętnic, sprzyjają zmiany śródbłonna pod wpływem oksydowanego LDL [92]. Komórki dendrytyczne mogą także uczestniczyć w destabilizacji blaszki miażdżycowej. Ponad 90% DC lokalizuje się na brzegach blaszek miażdżycowych, w miejscu szczególnie narażonym na pęknięcie, przy czym większość wykazuje cechy aktywacji, np. ekspresję molekuly CD83 [93].

### **Rola cytokin, receptora chemokinowego CCR7 oraz ligandu CCL19 w rozwoju miażdżycy**

W ludzkich blaszkach miażdżycowych stwierdzano ekspresję szeregu chemokin: MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, CCL2); MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory proteins-1 $\alpha$ , CCL3), RANTES (regulated upon activation, normal T expressed and presumably secreted; CCL5), CCL19, fraktalkiny (CXCL1), chemokin indukowanych interferonem (IP-10/CXCL10; Mig/CXCL9) [107,108].

Cytokiny mają kluczowe znaczenie w rozwoju i destabilizacji blaszki miażdżycowej: wpływają na przepuszczalność śródbłonna [94]; ekspresję molekuł adhezyjnych [95] metabolizm lipidów [96]; utlenianie LDL [97], migrację i proliferację komórek mięśniówki gładkiej [98], regulację odpowiedzi immunologicznej Th1/Th2 [99], rekrutację limfocytów CD4+ [100], ekspresję metaloproteinaz [101], skład macierzy pozakomórkowej [102], neowaskularyzację blaszki [103], indukcje apoptozy [104], prozakrzepową czynność śródbłonna [105]. Chemokiny, obok interleukin, interferonów (IFN), czynników wzrostu (TGF, TNF, CSF), stanowią jedną z klas cytokin, uczestniczącą w komunikacji międzykomórkowej, regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz zapalenia [106].

Komórki dendrytyczne, po wychwyceniu antygenów zagrożenia, produkują na swej powierzchni szereg receptorów, w tym molekuly układu MHC i receptor CCR7; następnie zaczynają wędrować do węzłów chłonnych, zgodnie z rosnącym gradientem chemokin CCL19 i CCL21, gdzie aktywują limfocyty T [88,109]. W mechanizmie zależnym od CCR7 i jego ligandów, komórki piankowate, mogą nabywać cech komórek dendrytycznych, i migrować z blaszki miażdżycowej, przyczyniając się do zmniejszenia ładunku cholesterolu w blaszce. W badaniu w którym przeszczepiano zmieniony miażdżycowo łuk aorty od hiperlipemicznych myszy apoE-KO (będących modelem ludzkiej miażdżycy, na podłożu dyslipidemii) do myszy normolipemicznych lub celem kontroli do innych myszy apoE-KO; normalizacja lipemii prowadziła do regresji blaszki miażdżycowej, podczas gdy pozostawanie w środowisku apoE-KO wywoływało dalszą progresję miażdżycy. W procesie regresji blaszki miażdżycowej dochodziło do silnej indukcji genu CCR7. Dzięki indukcji CCR7, obciążone cholesterolem komórki piankowate nabywały cech komórek dendrytycznych i migrowały do węzłów chłonnych. Po zablokowaniu przy pomocy przeciwciał chemokin CCL19 i CCL21 do regresji blaszki miażdżycowej nie dochodziło [111]. U pacjentów z chorobą wieńcową, pod wpływem statyn dojrzewanie komórek dendrytycznych ulega zahamowaniu, poziom CCR-7 ulega zwiększeniu, a CCL19 i CCL21 obniżeniu [110].

Dane literaturowe przemawiają za istotną rolą komórek dendrytycznych w rozwoju miażdżycy [88-92,109,111]. W moim badaniu zamierzam ocenić wpływ zmienności w obrębie genów regulujących funkcję komórek dendrytycznych na rozwój, nasilenie i lokalizację zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, u pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Polimorfizm genów, poprzez zmianę poziomu ekspresji lub modyfikację funkcji białek regulatorowych, może decydować o zawartości komórek dendrytycznych w blaszce miażdżycowej oraz ich zdolność do migracji z blaszki. Uwarunkowana genetycznie zmienność w obrębie jednego z szlaków rozwoju miażdżycy, może wpływać na nasilenie i lokalizację zmian aterogennych w tętnicach wieńcowych.

## CELE PRACY

Przedmiotem pracy jest ocena związku pomiędzy polimorfizmami genu receptora chemokinowego CCR7 oraz jego ligandu CCL19 a miażdżycą tętnic wieńcowych i jej powikłaniami w populacji pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do planowej koronarografii.

Celem pracy jest:

- ocena częstości występowania, stopnia zaawansowania oraz lokalizacji zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych w badanej populacji
- wyjaśnienie czy polimorfizmy wybranych genów regulujących funkcję komórek dendrytycznych, są związane z rozwojem miażdżycy tętnic wieńcowych i jej powikłań
- ocena badanych polimorfizmów jako czynników ryzyka sercowo-naczyniowego

Hipoteza robocza zakłada, że badane polimorfizmy lub skonstruowane na ich bazie haplotypy, mają wpływ na rozwój, nasilenie i lokalizację zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych i ryzyko zawału serca. Wpływ ten może wynikać ze zmiany poziomu ekspresji lub modyfikacji funkcji białek regulujących zawartość komórek dendrytycznych w blaszce miażdżycowej oraz ich migrację z blaszki, co może determinować typ zmiany, stopień krytyczności zwężenia i pośrednio stabilność blaszki miażdżycowej

## METODYKA BADAŃ

### Spis treści:

1. Baza danych klinicznych
2. Wybór polimorfizmów genu CCR7 i CCL19
3. Metoda PCR
4. Hybrydyzacja typu “reverse dot blot”
5. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
6. Analiza statystyczna

Badanie realizowane jest w Katedrze Farmakologii UJ CM, we współpracy z Zakładem Hemodynamiki i Angiokardiografii Instytutu Kardiologii CM UJ, kierowanym przez Pana Prof. dr hab. med. Krzysztofa Żmudkę-

Do genotypowania polimorfizmów wykorzystano metodę chemiluminescencyjną, w której stosuje się znakowane sondy specyficzne dla alleli oraz metodę analizy długości fragmentów restrykcyjnych.

### Baza danych klinicznych

W projekcie wykorzystano DNA oraz bazę danych klinicznych obejmująca 300 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, u których wykonano planową koronarografię w latach 2002-2004, w Zakładzie Hemodynamiki Instytutu Kardiologii CM UJ Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badanie posiada zgodę komisji bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr KBET/88/B/2006

Baza danych klinicznych obejmuje m.in takie dane jak:

- dotychczasowy przebieg choroby niedokrwiennej serca (ilość przebytych zawałów serca, klasa CCS),
- czynniki ryzyka miażdżycy (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, hypercholesterolemia, otyłość, palenie tytoniu, dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby niedokrwiennej serca),
- choroby współistniejące (niewydolność serca, niewydolność nerek, zaburzenia rytmu serca, migotanie przedsionków),

- dotychczasowe leczenie farmakologiczne choroby niedokrwiennej serca,
- wyniki wybranych badań laboratoryjnych (stężenie glukozy, frakcji lipidogramu),
- wyniki koronarografii (lokalizacja zmian miażdżycowych i stopień redukcji średnicy światła tętnic wieńcowych) [3].

Kryteria rozpoznania chorób i czynników ryzyka w oparciu o standardy postępowania Polskich Towarzystw Naukowych obejmowały [3, 112,113]:

- przebyty zawał serca przed przyjęciem do szpitala - rozpoznanie przed przyjęciem do szpitala na podstawie dokumentacji medycznej chorego lub zapisu EKG wykazującego cechy dokonanej martwicy mięśnia serca
- nasilenie dławicy piersiowej przed przyjęciem do szpitala - wg klasyfikacji CCS (Canadian Cardiovascular Society)
- nadciśnienie tętnicze - rozpoznanie przed przyjęciem do szpitala na podstawie dokumentacji medycznej chorego
- hipercholesterolemia - stężenie cholesterolu całkowitego u chorego  $> 200$  mg% lub frakcji LDL  $> 130$  mg% (niezależnie od sposobu leczenia), przed przyjęciem do szpitala lub w trakcie hospitalizacji
- otyłość - BMI chorego większe niż 30 w trakcie hospitalizacji
- palenie tytoniu w przeszłości i aktualnie – na podstawie badania podmiotowego
- obciążenie rodzinne wczesnym występowaniem w rodzinie choroby niedokrwiennej serca (u mężczyzn  $<55$ rz, u kobiet  $<65$ rz) – na podstawie badania podmiotowego
- cukrzyca, niewydolność serca, niewydolność nerek, zaburzenia rytmu serca, migotanie przedsionków - rozpoznanie przed przyjęciem do szpitala na podstawie dokumentacji medycznej chorego lub w trakcie hospitalizacji

W ocenie lokalizacji zmian miażdżycowych stosowano podział anatomiczny tętnic wieńcowych na 15 segmentów wg zaleceń programu „POLKARD” [3, zmod.]:

- 1 – prawa tętnica wieńcowa (RCA) proksymalnie
- 2 – prawa tętnica wieńcowa (RCA) medialnie
- 3 – prawa tętnica wieńcowa (RCA) dystalnie
- 4 – prawa tętnica wieńcowa (RCA) - gałąź tylna zstępująca (PDA)
- 5 – pień lewej tętnicy wieńcowej (LM)
- 6 – gałąź międzykomorowa przednia (LAD) proksymalnie
- 7 – gałąź międzykomorowa przednia (LAD) medialnie
- 8 – gałąź międzykomorowa przednia (LAD) dystalnie
- 9 – gałąź diagonalna pierwsza (D1)
- 10 – gałąź diagonalna druga (D2)
- 11 – gałąź okalająca (Cx) proksymalnie
- 12 – gałąź okalająca pierwsza (OM1)
- 13 – gałąź okalająca (Cx) po OM1
- 14 – gałąź okalająca (Cx) – gałąź tylna-boczna
- 15 – gałąź okalająca (Cx) – gałąź tylna zstępująca (PDA)

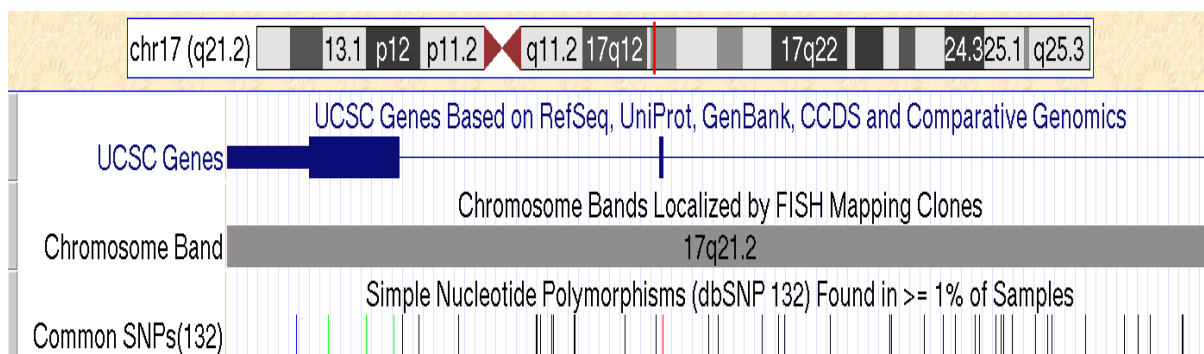
Za zmiany miażdżycowe zlokalizowane proksymalnie uznawano takie, które były obecne w pniu lewej tętnicy wieńcowej, segmencie proksymalnym gałęzi międzykomorowej przedniej, gałęzi okalającej i prawej tętnicy wieńcowej oraz na rozwidleniu gałęzi diagonalnej pierwszej i gałęzi międzykomorowej przedniej, rozwidleniu gałęzi marginalnej pierwszej i gałęzi okalającej (segmenty 1,5,6,9,11,12). Zmiany zlokalizowane w innych segmentach uznawano za dystalne (nie-proksymalne). Do badania nie włączano chorych ze zmianami w pomostach aortalno- wieńcowych.

### **Wybór polimorfizmów genu CCR7 i CCL19**

Ze względu na dostępność środków finansowych, zastosowano metodę badania genów kandydatów, wyodrębnionych na podstawie przesłanek biologicznych - genu receptora chemokinowego CCR7 oraz jego ligandu CCL19.

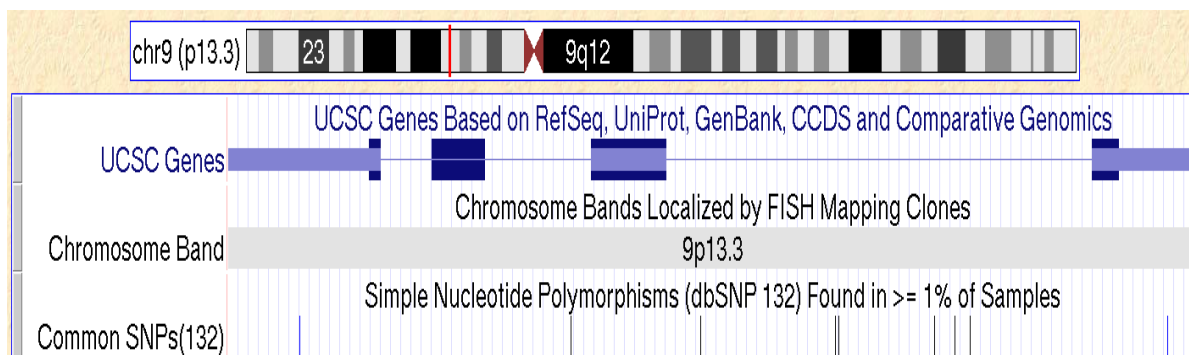
Gen dla CCR7 o długości 11715 par zasad, jest zlokalizowany na chromosomie 17, w prążku 17q21.2, w pozycji 38710022-38721736 (mapa ludzkiego genomu - UCSC Genome Browser) [18]. Sekwencja kodująca składa się z 3 egzonów.

**Rycina 1.** Lokalizacja genu CCR7 (UCSC Genome Browser).



Gen dla CCL19, długości 1708 par zasad, jest zlokalizowany na chromosomie 9, w prążku 9p13.3, w pozycji 34689567-34691274. Sekwencja kodująca składa się z 4 egzonów

**Rycina 2.** Lokalizacja genu CCL19 (UCSC Genome Browser).



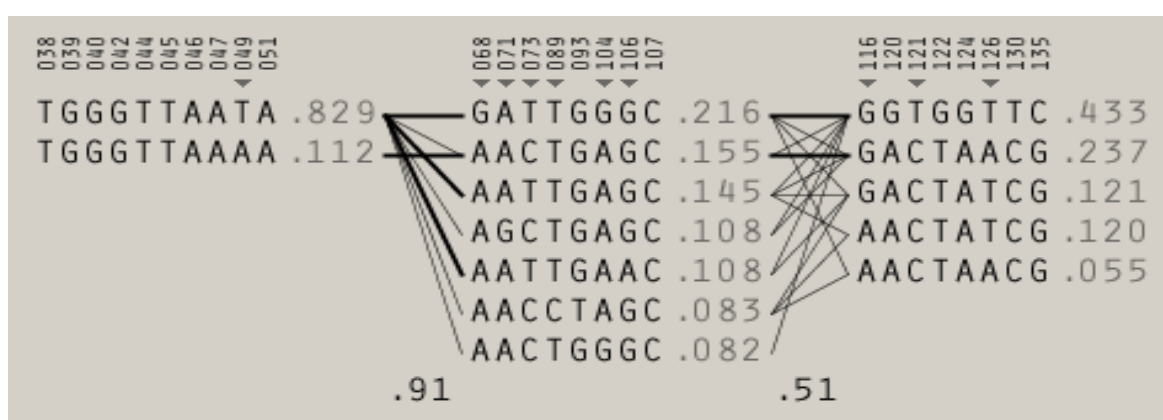
Region zawierający CCR7 znajduje się w obszarze dosyć silnej nierównowagi sprzężeń o wielkości 99000 par zasad, tj. obszaru w którym nie zachodziła rekombinacja DNA a zmienność jest wyłącznie efektem powstawania nowych mutacji.

Pozwala na wybranie tzw. polimorfizmów etykietujących (ang. tagging SNPs), które zawierają w sobie większość informacji potrzebnej do oceny zmienności genetycznej stwierdzanej w danym fragmencie DNA. Zgodnie z szacunkami mówiącymi o obecności jednego polimorfizmu na około 1200 par zasad można się spodziewać na takim odcinku DNA około 80 polimorfizmów.

Wyboru polimorfizmów etykietujących dokonano przy użyciu programu Haploview 4.2. Dla poznania około 90% zmienności genetycznej w całym tym obszarze wystarczy zgenotypować maksymalnie 7 polimorfizmów.

Region zawierający CCL19 znajduje się w obszarze silnej nierównowagi sprzężeń o wielkości 40000pz. Dla poznania około 87% zmienności genetycznej w całym tym obszarze wystarczy zgenotypować max. 5 polimorfizmów. Pokazuje to jak wielką oszczędność można uzyskać wykorzystując obecność nierównowagi sprzężeń.

**Rycina 3.** Blok haplotypowy obejmujący gen CCR7, polimorfizmy etykietujące.



**Tabela 1.** Wykaz wybranych polimorfizmów etykietujących genu CCR7 i CCL19.

Gen	Polimorfizm		Fizyczna lokalizacja na chromosomie
CCR 7	rs17708087	A/G	17:38 670 513
	rs16965880	A/G	17:38 673 928
	rs645991	C/T	17:38 675 157
	rs9675320	C/T	17:38 698 666
	rs2023906	G/A	17:38 713 686
	rs3136685	A/G	17:38 719 799
	CCL 19	rs3176818	A/G
rs3176820		C/T	9:34 686 143
rs3176823		C/T	9:34 685 765



## **Metoda polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR, Polymerase Chain Reaction)**

Izolację DNA z próbek krwi obwodowej przeprowadzono przy użyciu automatycznego izolatora kwasów nukleinowych EasyMag. Aparat wykorzystuje do izolacji metodę Booma [114].

Primery (firma DNA-Gdansk II) zaprojektowano za pomocą programów Primer 3, PREMIER Biosoft International, RepeatMasker. Liofilizat primerów rozcieńczano buforem TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA) do stężenia 100uM.

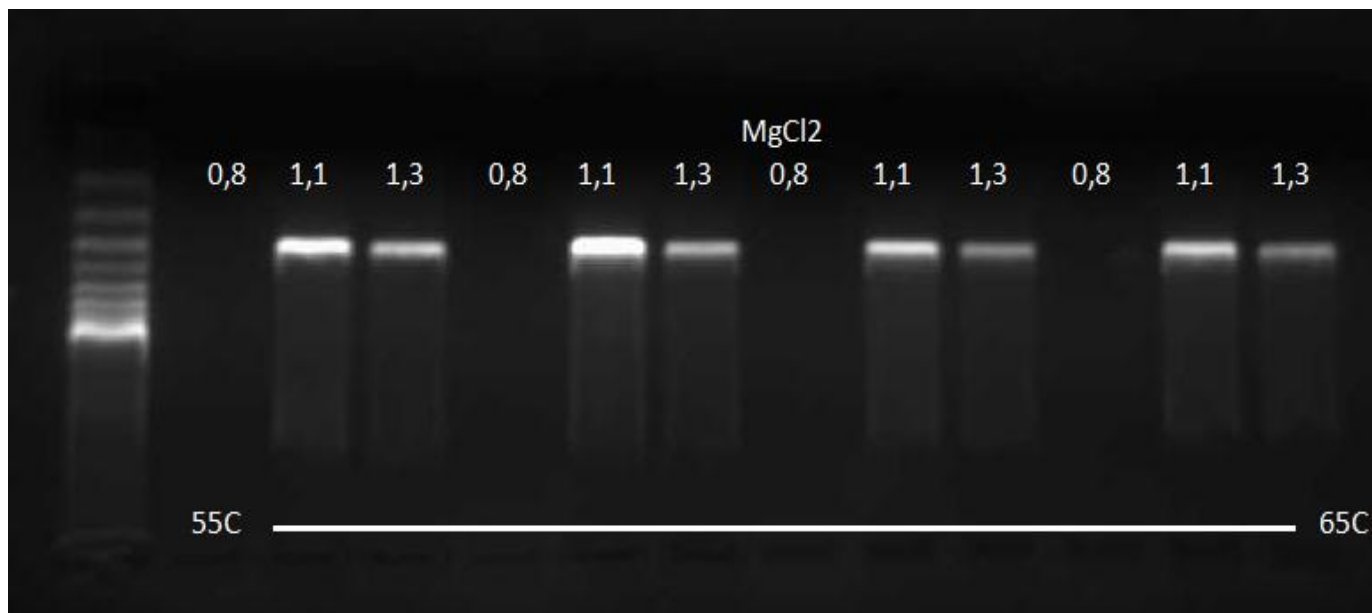
Dla każdego produktu PCR dokonywano indywidualnego doboru warunków reakcji (stężenia chlorku magnezu, primerów, polimerazy DNA, temperatury meltingu, czasu trwania cyklu elongacji - Tabela 2) [115,116]. Jakość produktu oceniano metodą elektroforezy w żelu agarozowym (rycina 4). Dla wykluczenia zanieczyszczenia próbek przeprowadzano kontrole negatywne.

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR:

- DNA 5,0  $\mu$ l
- bufor 10x (Invitrogen) 3,0  $\mu$ l
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen) 1,1 -1,3  $\mu$ l
- dNTP 2mM (Fermentas) 0,8  $\mu$ l
- primer F 100 $\mu$ M (DNA-Gdansk II) 0,6  $\mu$ l
- primer R 100 $\mu$ M (DNA-Gdansk II) 0,6  $\mu$ l
- polimeraza DNA (Platinum Taq – Invitrogen; Perpetual Taq DNA - EURx) 0,1- 0,2  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O do 30  $\mu$ l

Program reakcji PCR (aparat DNA Engine®):

- 94 °C przez 5 minut
- 35-39 cykli: denaturacja 94 °C przez 20-45s, annealing 60°C przez 20-45s, elongacja 72°C przez 20-45s
- 72 °C przez 10 minut



**Rycina 4.** Ocena wpływu warunków reakcji na jakość produktu PCR  
(0,8 μl; 1,1 μl; 1,3 μl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, temperatura annealingu – 55-65°C);  
elektroforeza na żelu agarozowym.

**Tabela 2.** Metoda PCR – zastosowane primery, długość produktu PCR, warunki reakcji.

Gen	SNP	Sekwencja primerów	produkt (pz)	Tm, czas elongacji, obj. MgCl <sub>2</sub>
CCR 7	rs 17708087	(F) 5'-BiotinCGTGCTCCCACTTGCTAGA-3' (R) 5'-CCTGAACCCACTTTCTAAACTCA-3'	104	56°C; 30s; 1,1µl
	rs 16965880	(F) 5'-BiotinAGTGCAGCTGGTGGACAAAG3' (R) 5'-CAATGTCATCACGCTTCTACAAA-3'	476	55°C; 30s; 1,1µl
	rs 645991	(F) 5'- BiotinGCCTTGTAGGTCAGGTGAGG3' (R) 5'-ATCGCCAAGCAAAGAAACAT-3'	282	55°C; 30s; 0,45µl
	rs 9675320	(F) 5'- BiotinTCCTCTTGGCATCTTGTCCT-3' (R) 5'-AAGAAGTGGGAGGGAAGGAA-3'	270	60°C; 45s; 0,45µl
	rs 2023906	(F) 5'- BiotinACCAGGAACCAGATTCAGCA3' (R) 5'-GGTTGCCACTGACTTTTCGT-3'	207	53°C; 45s; 0,9µl
	rs 3136685	(F) 5'- BiotinCAACTTGAGAGAGCCCCAAC3' (R) 5'-TGCTCATTCAAACCGTGAAA-3'	245	55°C; 30s; 0,9µl
CCI 19	rs 3176818	(F) 5'- BiotinCTTGCTTGGGAAGAGAGGTG-3' (R) 5'-TGTCCTGGCACTGAGAAGG-3'	510	60°C; 45s; 1,1µl
	rs 3176820	(F) 5'-BiotinTCCATGTCCTCCCTCCTTC-3' (R) 5'-CCACCAGCTTCCTCTCTTGT-3'	850	60°C; 45s; 0,9µl
	RS 3176823	(F) 5'- BiotinAAGCCACTACTTTTGGGTGCT3' (R) 5'-CCAGCCCTCAGTCCAAGTG-3'	126	60°C; 45s; 1,3µl

## **Metoda PCR**

### **A) odczynniki i bufor**

- woda dejonizowana
- bufor 10x (Invitrogen)
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen)
- dNTP Mix 2mM (Fermentas)
- primer F; R 100μM (DNA-Gdansk II)
- polimeraza DNA (Platinum Taq – Invitrogen; Perpetual Taq DNA - EURx)
- DNA (Zakład Hemodynamiki i Angiokardiografii Instytutu Kardiologii CM UJ)

### **B) sprzęt**

- aparat DNA Engine®; DNA EngineTetrad®Peltier Thermal Cyclers (Bio-Rad)
- pipety CappAero Multi-Channel Pipette 25-200
- pipety nastawne o poj. 0,5-10μl
- jałowe końcówki do pipet
- rękawiczki ochronne
- oprogramowanie - Primer 3, PREMIER Biosoft International, RepeatMasker

## **Hybrydyzacja typu “reverse dot blot” [117-119]**

### **I Założenia metody**

W tej metodzie oligonukleotydowe sondy są przytwierdzone kowalencyjnie do błony nylonowej. Na powierzchni błony zachodzi hybrydyzacja produktów PCR, znakowanych biotyną o komplementarnej sekwencji nukleotydowej. Wizualizacja związanych z błoną produktów PCR jest możliwa dzięki reakcji chemiluminescencji biotyny ze streptawidyną znakowaną peroksydazą. Błona z przytwierdzonymi sondami po regeneracji, może zostać ponownie wykorzystana. Podział błony na sektory („dot”), umożliwia hybrydyzację produktów PCR z 96 próbek, w jednym doświadczeniu.

## **II Przytwierdzane kowalencyjnie sondy oligonukleotydojowej do błony nylonowej**

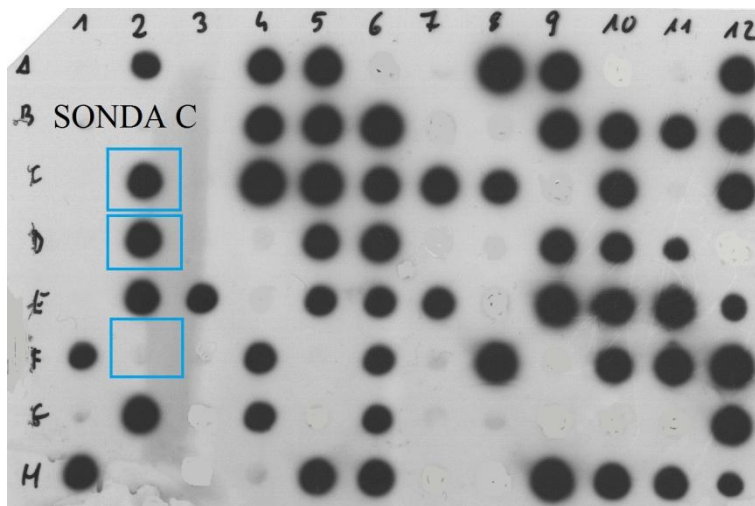
1. Przygotowanie roztworu sondy oligonukleotydojowej o stężeniu 125-5000 pmol w 150 µl 500mM NaHCO<sub>3</sub> o pH 8,4.
2. Aktywowanie błony Biotyne C w świeżo przygotowanym 16% EDAC [1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl] karbodiimid] przez 10 min w temperaturze pokojowej.
3. Umieszczenie zwilżonej wodą destylowaną błony w komorze miniblota. Skręcenie komory i pokrywy miniblota. Usunięcie nadmiaru płynu z dołków komory miniblota przez aspirację pipetą.
4. Wypełnienie każdego z dołków miniblota 150 µl roztworu zawierającego sondę oligonukleotydojową.
5. Inkubacja przez 1 min w temperaturze pokojowej.
6. Usunięcie z dołków miniblota roztworu zawierającego sondy oligonukleotydojowe przez aspirację pipetą.
7. Odkręceniu pokrywy miniblota i przeniesienie błony do butelki obrotowej zawierającej 100mM NaOH.
8. Inkubacja przez 8 minut w temperaturze pokojowej, dla inaktywacji błony.
9. Płukanie błony w 250 ml 2x SSPE/0,1% SDS przez 5 min w temperaturze 60°C
10. Dla przechowania błony: płukanie w 100 ml 20 mM EDTA o pH 8 przez 15 min w temperaturze pokojowej; zabezpieczenie folią przed wyschnięciem w temperaturze 4°C.

## **III Hybrydyzacja i wykrycie produktów PCR**

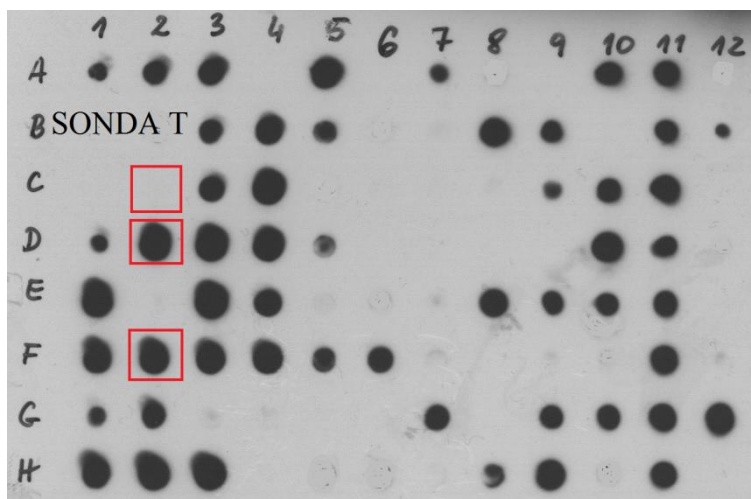
1. Rozcieńczenie produktu PCR w 2x SSPE/0,1% SDS do 150 µl.
2. Denaturacja produktu PCR przez 10 min w temperaturze 99°C, następnie schłodzenie na lodzie.
3. Inkubacja błony Biotyne C z przytwierdzonymi kowalencyjnie sondami oligonukleotydojowymi w 250 ml 2xSSPE/0,1% SDS przez 5 min w temperaturze pokojowej.
4. Umieszczenie błony w komorze miniblota. Skręcenie komory i przykrycie miniblota. Usunięcie nadmiaru płynu z dołków komory miniblota przez aspirację pipetą.
5. Wypełnienie dołków miniblota 150 µl roztworu zawierającego rozcieńczony produkt PCR .
6. Hybrydyzacja przez 60 min w temperaturze 42°C w pozycji poziomej.

7. Usunięcie z dołków miniblotera roztworu zawierającego produkt PCR przez aspirację pipetą.
8. Odkręceniu pokrywy miniblotera i przeniesienie błony do butelki obrotowej zawierającej 250 ml 2xSSPE/0,5% SDS.
9. Inkubacja przez 10 min w temperaturze 52°C. Powtórzenie inkubacji z nową porcją 250 ml 2xSSPE/0,5% SDS.
10. Inkubacja błony w butelce obrotowej zawierającej 10 ml roztworu streptawidyny znakowanej peroksydazą w 2xSSPE/0,5% SDS w stosunku 1:4000; przez 45 minut w temperaturze 42°C.
11. Przygotowanie roztworu odczynników do chemiluminescencji: 15 ml odczynnika A i 150 µl odczynnika B w temperaturze pokojowej.
12. Inkubacja błony w butelce obrotowej zawierającej 250 ml 2xSSPE/0,5% SDS przez 10min w temperaturze 42°C. Powtórzenie inkubacji z nową porcją 250 ml 2xSSPE/0,5% SDS.
13. Inkubacja błony w butelce obrotowej zawierającej 250 ml 2xSSPE przez 5 min w temperaturze pokojowej. Powtórzenie inkubacji z nową porcją 250 ml 2xSSP.
14. Inkubacja błony w 10 ml roztworu odczynników do chemiluminescencji przez 1 min w temperaturze pokojowej w ciemni.
15. Umieszczenie błony w kasecie zawierającej klisze światłoczułą na 5-30 min (zależnie od natężenia chemiluminescencji).
16. Odczytanie wzoru zacielenia kliszy. W każdej hybrydyzacji stosowano samokontrolę w postaci reagentów, bez materiału genetycznego, celem wykrycia ewentualnej przypadkowej kontaminacji próbek.

Przykładowe wyniki hybrydyzacji typu “reverse dot blot”, przedstawia rycina 5 i 6. W miejscach gdzie dochodzi do związania produktu PCR z komplementarną sondą, chemiluminescencja powoduje zacielenie kliszy światłoczułej. W miejscach gdzie nie dochodzi do hybrydyzacji, nie obserwuje się zacielenia kliszy. Dla ustalenia genotypu polimorfizmu rs645991 u 96 pacjentów, niezbędne jest wykonanie dwóch hybrydyzacji – osobno dla allelu C oraz T. Analizując wzór zacielenia można stwierdzić, że pacjent w pozycji 2C kliszy ma genotyp CC; w pozycji 2D - CT, a w pozycji 2D – TT.



**Rycina 5.** Hybrydyzacja typu “reverse dot blot”, sonda C polimorfizm rs645991.



**Rycina 6.** Hybrydyzacja typu “reverse dot blot”, sonda T polimorfizm rs645991.

#### **IV Regeneracja błony nylonowej z przytwierdzonymi kowalencyjnie sondami oligonukleotydowymi**

1. Inkubacja błony w butelce obrotowej zawierającej 1% SDS przez 30 min w temperaturze 80°C.
2. Płukanie błony w 20 mM EDTA o pH 8 przez 15 min w temperaturze pokojowej.
3. Zabezpieczenie folią przed wyschnięciem. Przechowanie w temperaturze 4°C.

**Tabela 3.** Hybrydyzacja typu “ reverse dot blot” – sekwencja sond oligonukleotydowych, warunki reakcji.

Gen	Polimorfizm	Sekwencja sond oligonukleotydowych	Tm
CCR 7	rs	sonda G 5'-GTTATTTGCCGGGTGGTGGACAAA-3'	59°C
	17708087	sonda A 5'-GTTATTTGCCAGGTGGTGGACAAA-3'	57°C
	rs	sonda G 5'-ATTTACCTTGAACAGTGGGA-3'	57°C
	16965880	sonda A 5'-ATTTACCTTGAACAGTGGGA-3'	55°C
	rs	sonda C 5'-TGCAGGCCTGCGCCCTTCCCT-3'	69°C
	645991	sonda T 5'-TGCAGGCCTGTGCCCTTCCCT-3'	67°C
	rs	sonda C 5'-CACACCCTCCCCTAGCAGCCA-3'	67°C
	9675320	sonda T 5'-CACACCCTCCTCTAGCAGCCA-3'	65°C
	rs	sonda G 5'-TTCACACCCAGGTTCTGGATT-3'	59°C
	2023906	sonda A 5'-TTCACACCCAAGTTCTGGATT-3'	57°C
	rs	sonda G 5'-AGAGGTGGGTGAGGAGGGAGG-3'	67°C
	3136685	sonda A 5'-AGAGGTGGGTAAGGAGGGAGG-3'	65°C
	rs	sonda T 5'-AGCTGTTTCTGCATTCATC-3'	53°C
	3176818	sonda C 5'-AGCTGTTTCCGCATTCATC-3'	55°C
CC1 19	rs	sonda A 5'-TCCAGTCAGATAACTTCCT-3'	59°C
	3176820	sonda G 5'-TCCAGTCAGGTAACTTCCT-3'	55°C
	rs	sonda G 5'-GCCATGTGCGAGTCTCCAA-3'	59°C
	3176823	sonda A 5'-GCCATGTGCAAGTCTCCAA-3'	57°C



## **Hybrydyzacja typu “reverse dot blot”**

### **A) odczynniki i bufor**

- woda dejonizowana
- sondy oligonukleotydowe (DNA-Gdańsk II, klasa HPLC)
- streptawidyna znakowana peroksydazą (Streptavidine-POD Roche Diagnostics)
- odczynniki do chemiluminescencji białek i kwasów nukleinowych - BM  
Chemiluminescence Blotting Substrate POD (Roche Diagnostics)
- 20xSSPE (9,4g EDTA+ 35,9g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O+ NaCl 175,3g w 800ml H<sub>2</sub>O, alkalizacja roztworem 10M NaOH do pH 7,4, następnie H<sub>2</sub>O do całkowitej objętości 1000ml)
- dodecylowy siarczan sodu SDS (10g SDS w 100ml H<sub>2</sub>O)
- 2xSSPE/0,1% SDS, 2xSSPE/ 0,5% SDS, 2xSSPE
- 16% EDAC (1,6g EDAC w 10ml H<sub>2</sub>O)
- 100mM NaOH (1g NaOH w 250ml H<sub>2</sub>O)
- 0,5M NaHCO<sub>3</sub> (10,5g NaHCO<sub>3</sub> w 240ml H<sub>2</sub>O, alkalizacja roztworem 2M NaOH do pH 8,4, następnie H<sub>2</sub>O do całkowitej objętości 250ml)
- 20mM EDTA (7,4g EDTA w 800ml H<sub>2</sub>O, alkalizacja roztworem 100mM NaOH do pH 8, następnie H<sub>2</sub>O do całkowitej objętości 1000ml)

### **B) sprzęt**

- minibloter (Immunetics, Cambridge, MA)
- piec do hybrydyzacji Stuart Scientific oven/shaker SI 20H
- błony nylonowe Biotodyne C (Pall Corporation)
- klisze światłoczułe
- pipety CappAero Multi-Channel Pipette 25-200
- jałowe końcówki do pipet
- rękawiczki ochronne

## Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

W trakcie genotypowania metodą cheminulimencencyjną, dla części polimorfizmów, nie uzyskano optymalnych parametrów rozdziału (czas inkubacji, temperatura), a dalszą analizę przeprowadzano metodą RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Genotypowanie odbywało się w trzech etapach: namnażanie przy pomocy PCR, fragmentów DNA okalających badane polimorfizmy, cięcie uzyskanego produktu za pomocą specyficznych enzymów restrykcyjnych, rozdział elektroforetyczny ciętych produktów PCR na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

### I Trawienie produktów PCR

Dla każdego z produktów PCR dobrano enzym restrykcyjny, na podstawie bazy RestrictionMapper wersja 3.0 (adres bazy <http://www.restrictionmapper.org/>).

**Tabela 4.** Zastosowane enzymy restrykcyjne, długość uzyskanych fragmentów trawienia, warunki reakcji). Czas trawienia – 16 godzin.

SNP	enzym restrykcyjny	sekwencja rozpoznawana przez enzym	genotyp	długość fragmentów restrykcyjnych (pz)	Bufor 10x, temperatura inkubacji
rs3136685	HphI	GGTGA	AA	245	Bufor B; 37°C
			AG	70, 175, 245	
			GG	70, 175	
rs2023906	AlwNI	CAGNNCTG	AA	207	Bufor Tango; 37°C
			AG	102, 105, 207	
			GG	102, 105	
rs9675320	BsERI	GAGGAG	TT	41, 81, 148	NEBufor 4; 37°C
			TC	41, 81, 148, 229	
			CC	41, 229	
rs645991	BseSI	GAATGC	CC	282	Bufor G; 55°C
			TC	141, 141, 282	
			TT	141, 141	
rs16965880	SmII	CTYRAG	GG	50, 121, 306	NEBufor 4, BSA; 55°C
			AG	50, 121, 306, 356	
			AA	121, 356	
rs17708087	ECORII	CCWGG	AA	48, 56	Bufor 0; 37°C
			AG	48, 56, 104	
			GG	104	

## Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia produktów PCR

bufor 10x	1,3 $\mu$ l
enzym	0,1-0,375 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	do 3 $\mu$ l
produkt PCR	10,0 $\mu$ l

## II Elektroforeza na żelu agarozowym [120]

### A) Przygotowanie żelu do elektroforezy

1. W naczyniu (250 ml) umieszczano 25 g agarozy, następnie dodawano buforu do elektroforezy (TAE) do całkowitej objętości 100 ml. Zaznaczano poziom płynu na naczyniu. W przypadku odparowania uzupełniano do objętości 100 ml.
2. Roztwór agarozy umieszczano w mikrofalówce. Pracę kuchenki zatrzymywano co 30 s, aby zamieszać agarozę i rozpuścić pozostałe fragmenty agarozy z dna i ścianek naczynia. Roztwór gotowano i mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia agarozy.
3. Przed wylaniem żelu roztwór schładzano do ok. 60°C i dodawano 2,5  $\mu$ l bromku etydyny.

### B) Wylewanie żelu

1. Aparat do elektroforezy ustawiano na wypoziomowanej powierzchni. Sanki o wymiarach 15x15 cm umieszczano w komorze aparatu. Boczne krawędzie sanek zamykano zastawkami. W obrębie sanek, od strony katody, umieszczano grzebień.
2. Pomiędzy zastawki wylewano 100 ml roztworu 2,5% agarozy o temp. 60°C.
3. Agarozę pozostawiano w temp. pokojowej na 20-40 min do zastygnięcia.
4. Z zastygłego żelu usuwano grzebień, a następnie zastawki.
5. Żel o grubości 0,5cm zanurzano w buforze do elektroforezy na głębokość 2cm.

### C) Elektroforeza

1. Przygotowanie próbki do naniesienia na żel: do 10  $\mu$ l produktu PCR dodawano 3  $\mu$ l buforu obciążającego.
2. Naniesienie próbek do kieszonek żelu za pomocą standardowej pipety. Wzorec DNA 8  $\mu$ l (1,6  $\mu$ l na 1mm grubości żelu) nanoszono do pierwszej kieszonki w rzędzie.

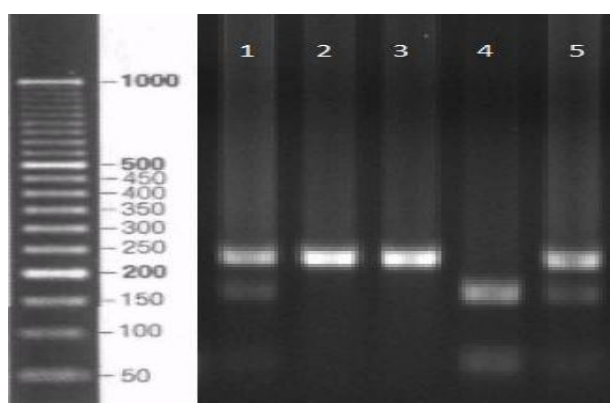
3. Komorę aparatu nakrywano pokrywą. Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem prądu elektrycznego 75V przez 30-60 min, pod kontrolą transiluminatora UV.

Wg zaleceń producenta żel o stężeniu 2,5% umożliwia rozdział fragmentów DNA o wielkości 100-500pz. Szacowane tempo migracji w żelu 15x15 cm próbek wynosi 3cm/godz. Dla wykrycia ewentualnej przypadkowej kontaminacji próbek stosowano samokontrolę w postaci reagentów bez materiału genetycznego.

### III Analiza długości fragmentów restrykcyjnych

Zdjęcia żeli po rozdziale elektroforetycznym wykonano za pomocą kamery cyfrowej w trakcie transiluminacji UV. Zdjęcia zapisano w formacie cyfrowym (IrfanView JPG File), a następnie poddano analizie.

Ocenę poszczególnych produktów rozdziału elektroforetycznego prowadzono w oparciu o wzorzec (drabinkę DNAS) DNA O'GeneRuler™ zawierającą 11 fragmentów DNA o długości 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15 i 10 par zasad (pz).



**Rycina 7.** Przykładowe rezultaty cięcia i elektroforezy oraz sposób odczytu wyników.

Polimorfizm G/A, rs3136685

nr 2,3 - Homozygota niecięta 245pz

nr 4 - Homozygota cięta 70,175pz

nr 1,5 - Heterozygota 70,175,245pz

Wyniki genotypowania metodą RFLP zapisywano w postaci plików xls.

Dane exportowano do programu SAS.

## **IV Metoda RFLP**

### **A) odczynniki i bufor**

- woda dejonizowana
- enzymy restrykcyjne: Hph1, AlwNI, BseRI, BseSI, SmaI, EcoRI (New England BioLabs Inc.)
- Bufor B, Bufor Tango, NEB buffer 4, Bufor G, NEB buffer 4, BSA, Bufor 0 (New England BioLabs Inc.)
- agaroz (Fermentas)
- bufor octanowy 50xTAE Tris-Acetate-EDTA (Tris-Base 242g+100ml 0,5M EDTA pH 8,0+57,1 ml lodowego kwasu octowego w 600ml, następnie H<sub>2</sub>O do całkowitej objętości 1000ml)
- bromek etydyny do barwienia żeli agarozowych 0,5mg/ml (Fermentas)
- bufor obciążający 6xMassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas)
- wzorzec DNA O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (Fermentas)

### **B) sprzęt**

- aparat do elektroforezy w żelu agarozowym Sub-Cell®GT Bio Rad
- zasilacz do elektroforezy
- transiluminator UV
- pipety nastawne o poj. 0,5-10µl
- jałowe końcówki do pipet
- rękawiczki ochronne
- oprogramowanie: program RestrictionMapper wersja 3.0

## **Analiza statystyczna**

Analiza statystyczna wpływu czynników genetycznych została przeprowadzona osobno w każdej z wyodrębnionych klinicznie i angiograficznie grup (oprogramowanie SAS Genetics v.9.1). Wykaz przeprowadzonych analiz znajduje się w rozdziale „wyniki”. Projekt analizowano przy zastosowaniu metodyki badania osób niespokrewnionych. Analizę przeprowadzono dla modelu addytywnego, recesywnego i dominującego z zastosowaniem testu chi-kwadrat, testu Fishera, testu trendu Cochran-Armitage. W analizie wieloczynnikowej stosowano model regresji liniowej i regresji logistycznej. Cechy ilościowe opisano z wykorzystaniem średniej arytmetycznej i zakresu wartości.

Przy użyciu programu Haploview 4.2 wykonano także analizę wpływu najczęstszych haplotypów, utworzonych przez zgenotypowane polimorfizmy, na wystąpienie miażdżycy lub jej powikłań. Analiza haplotypów umożliwia łączną ocenę kilku polimorfizmów w celu opisania kombinacji alleli, których dziedziczenie warunkuje podatność do rozwoju miażdżycy w większym stopniu niż pojedynczy polimorfizm.

Wartości  $p < 0.05$  uznawano za znamienne statystycznie.

## WYNIKI

### Wykaz analiz zamieszczonych w rozdziale

**I** Analiza zgodności równowagi Hardy'ego-Weinberga (tabela 1.)

**II** Charakterystyka kliniczna badanej populacji (tabela 2a, 2b, 2c)

**III** Analiza danych angiograficznych

1. Częstość występowania zmian miażdżycowych o różnym stopniu redukcji średnicy światła tętnicy wieńcowej (tabela 3a i 3b)
2. Lokalizacja zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych (tabela 3c-d)

**IV** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 na:

1. ryzyko zawału serca (tabela 4)
2. obecność zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych:
  - a. redukujących średnicę światła naczynia
    - i. od 10 do 100% (tabela 5)
    - ii. od 50 do 100% (tabela 6)
    - iii. o 100% (nieδροżność) (tabela 7)
  - b. wielonaczyniowych (tabela 8)
  - c. w odcinkach proksymalnych lub dystalnych (tabela 9 i 10)
3. częstość występowania wybranych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, objawów i chorób towarzyszących takich jak:
  - a. nadciśnienie tętnicze (tabela 11)
  - b. cukrzyca (tabela 12)
  - c. hipercholesterolemia (tabela 13)
  - d. otyłość (tabela 14)
  - e. dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby niedokrwiennej serca (tabela 15)
  - f. zaburzenia rytmu serca (tabela 16)
  - g. migotanie przedsionków (tabela 17)
  - h. chromanie przestankowe (tabela 18)
  - i. stopień nasilenia dolegliwości dławicowych (tabela 19)
4. wartość wybranych zmiennych ciągłych - BMI, parametrów laboratoryjnych i echokardiograficznych (tabela 20)

V Analiza związku między przebytym zawałem serca a stosowanym leczeniem farmakologicznym (tabela 21)

VI Analiza wieloczynnikowa (tabela 22)

VI Analiza haplotypów (tabela 23,24,25)

**Tabela 1a, 1b.** Analiza zgodności równowagi Hardy’ego-Weinberga.

Rozkład genotypów badanych polimorfizmów z okolic locus genu CCR7 i CCL19 nie odbiegał od równowagi Hardy’ego-Weinberga. Gen dla CCR7 zajmuje fizycznie miejsce od nukleotydu w pozycji 38 710 022 (koniec 3’) do 38 721 736 (koniec 5’) na chromosomie 17, a gen dla CCL19 34 689 567 (koniec 3’) do 34 691 274 (koniec 5’) na chromosomie 9, według UCSC Genome Browser (wersja 34) i e-Ensembl Genome Browser.

<b>Polimorfizm CCR7</b>	<b>Fizyczna lokalizacja na chromosomie 17</b>	<b>Wartość P dla równowagi Hardy’ego-Weinberga</b>
rs17708087	A/G	0,14
rs16965880	A/G	0,60
rs645991	C/T	0,55
rs9675320	C/T	0,42
rs2023906	G/A	0,44
rs3136685	A/G	0,40

<b>Polimorfizm CCL 19</b>	<b>Fizyczna lokalizacja na chromosomie 17</b>	<b>Wartość P dla równowagi Hardy’ego-Weinberga</b>
rs3176818	A/G	0,32
rs3176820	C/T	0,34
rs3176823	C/T	0,11

Wartość P dla odchylenia od równowagi Hardy’ego – Weinberga obliczono na podstawie zmodyfikowanego testu chi-kwadrat (oprogramowanie SAS Genetics, wersja .9.1) używając genotypów 78 zdrowych osób, nie wchodzących w skład późniejszej analizy asocjacji polimorfizmów z parametrami klinicznymi pacjentów z podejrzeniem choroby wieńcowej.



**Tabela 2a, 2b.** Wartości istotnych z klinicznego punktu widzenia zmiennych, obserwowanych w kohorcie 300 pacjentów z podejrzeniem choroby wieńcowej, przyjętych celem wykonania planowej angiografii naczyń wieńcowych w Zakładzie Hemodynamiki Instytutu Kardiologii CM UJ Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II.

Zmienna kliniczna	Wartość średnia	Zakres wartości
wiek	60,2	35 - 84
BMI	27,9	18,3 - 41,2
Glukoza [mmol/l]	4-12,5	5,7
Cholesterol całkowity [mmol/l]	5,1	2,1 - 9,1
LDL [mmol/l]	3,2	1,2 - 6,5
HDL [mmol/l]	1,2	0,47-2,2
TG [mmol/l]	1,7	0,5-5,5

Zmienna kliniczna	Wartość		Brak danych
Płeć męska	n = 226	75,3 %	n = 0
Choroby towarzyszące i czynniki ryzyka:			
nadciśnienie tętnicze	n = 226	76,3 %	n = 4
cukrzyca w wywiadzie	n = 58	19,6 %	n = 4
hipercholesterolemia	n = 227	78 %	n = 9
otyłość	n = 94	37,1 %	n = 47
palenie			
- w wywiadzie	n = 120	46,5 %	n = 42
- obecnie	n = 35	13,5 %	n = 42
dodatni wywiad rodzinny w kierunku ch.n.s	n = 126	62,4 %	n = 98
migotanie przedsionków	n = 23	8,2 %	n = 22
inne zaburzenia rytmu	n = 47	16,6 %	n = 18
chromanie przestankowe	n = 29	11,6 %	n = 52
przebyty zawał serca	n = 148	50,3 %	n = 6

**Tabela 2c.** Wartości istotnych z klinicznego punktu widzenia zmiennych, obserwowanych w kohorcie 300 pacjentów z podejrzeniem choroby wieńcowej, przyjętych celem wykonania planowej angiografii naczyń wieńcowych w Zakładzie Hemodynamiki Instytutu Kardiologii CM UJ Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II.

Zmienna kliniczna	Wartość		Brak danych
Ilość przebytych zawałów serca:			
0	n = 146	50,2 %	n = 9
1	n = 122	41,9 %	
2	n = 21	7,2 %	
3	n = 2	0,7 %	
Klasa CCS:			
I	n = 20	9,2 %	n = 83
I/II	n = 10	4,6 %	
II	n = 74	34,1 %	
II/III	n = 27	12,4 %	
III	n = 57	26,3 %	
III/IV	n = 18	8,3 %	
IV	n = 11	5,1 %	
Terapia:			
aspiryna	n = 265	88,3 %	n = 0
pochodne tienopirydyny	n = 101	33,8 %	n = 1
acenokumarol	n = 14	4,7 %	n = 1
statyny	n = 264	88 %	n = 0
inhibitory konwertazy	n = 228	76 %	n = 0
diuretyki pętlowe lub tiazydowe	n = 50	16,7 %	n = 1
spironolakton	n = 43	14,4 %	n = 1
beta-blokery	n = 247	82,7%	n = 0
blokery kanału wapniowego	n = 55	18,4 %	n = 1
azotany	n = 130	43,3 %	n = 0

**Tabela 3a.** Zaawansowanie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych. Częstość występowania zmian miażdżycowych o określonym stopniu redukcji średnicy światła naczyń wśród chorych.

Zaawansowanie zmian miażdżycowych	Liczba zmian	Częstość występowania	Brak danych
Brak zmian w jakimkolwiek naczyniu	n = 37	12,3 %	n = 0
Zmiany w naczyniach redukujące światło naczynia < 50 %	n = 20	6,7 %;	
Zmiany w naczyniach redukujące światło naczynia ≥ 50 %	n = 243	81 %;	
Zmiany w naczyniach redukujące światło naczynia ≥ 70 %	n= 234	78%	
Niedrożność naczyń	n= 190	63,3%	

**Tabela 3b.** Zaawansowanie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych. Częstość występowania zmian miażdżycowych o określonym stopniu redukcji średnicy światła naczyń wśród chorych.

stopień zwężenia	10%	15%	20%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%
liczba chorych	4	3	3	4	1	4	2	3	1	3
częstość występowania	1,3%	1 %	1%	1,3%	0,3%	1,3%	0,7%	1%	0,3%	1%
stopień zwężenia	65%	70%	75%	80%	85%	90%	95%	99%	100	Suma
liczba chorych	1	13	1	26	3	27	14	22	128	263
częstość występowania	0,3%	4,3%	0,3%	8,7%	1%	9%	4,7%	7,3%	48%	100%

**Tabela 3c.** Zaawansowanie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych.

Liczba zajętych naczyń.

Zaawansowanie zmian miażdżycowych Liczba zajętych naczyń	Liczba chorych	Częstość	Brak danych
Brak zmian	n= 37	13%	n=16
Choroba jednonaczyniowa	n= 92	32,4%	
Choroba dwunaczyniowa	n= 71	25%	
Choroba wielonaczyniowa	n= 84	29,6%	

**Tabela 3d.** Lokalizacja zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych

Lokalizacja zmian miażdżycowych:	Liczba chorych	Częstość	Brak danych
odcinki proksymalne naczyń	n= 220	73,3%	n=0
odcinki dystalne naczyń	n= 211	70,3%	
Lokalizacja zmian miażdżycowych:	Liczba chorych	Częstość	Brak danych
pień lewej tętnicy wieńcowej	n= 40	13,3%	n=0
gałąź międzykomorowa przednia			
odcinek proksymalny	n= 178	59,3%	
pozostałe odcinki	n= 80	26,7%	
gałąź przekątna pierwsza	n= 28	9,3%	
gałąź przekątna druga	n= 8	2,7%	
peforatory	n= 3	1%	
gałąź okalająca			
odcinek proksymalny	n= 79	26,3%	
pozostałe odcinki	n= 80	26,7%	
gałąź brzeżna pierwsza	n= 41	13,7%	
gałąź brzeżna druga	n= 12	4%	
gałąź brzeżna trzecia	n= 3	1%	
prawa tętnica wieńcowa			
odcinek proksymalny	n= 93	31%	
pozostałe odcinki	n= 150	50%	

#### Tabele 4 - 19

Kolejność kolumn w tabeli:

1. nr porządkowy polimorfizmu wg HapMap (faza 3)
2. badane allele danego polimorfizmu
3. badany genotyp
4. liczba genotypów w badanej populacji, wg wybranej zmiennej klinicznej
5. wartość „p” dla
  - \* - modelu addytywnego - test chi-kwadrat lub test Fishera;
  - \*\* - modelu addytywnego- testu trendu Cochran-Armitage;
  - # - modelu dominacji allelu 1- test chi-kwadrat lub test Fishera;
  - ## - modelu dominacji allelu 2 -testu chi-kwadrat lub test Fishera;
6. brakujące dane

Fenotyp dominujący pojawia się u pacjentów heterozygotycznych, natomiast recesywny tylko w przypadku obecności dwóch alleli w locus.

**Tabela 4.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na ryzyko zawału serca.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko zawału serca zwiększała obecność:

- allelu A rs16965880 (*test trendu*  $p=0,034$ , *dominujący allel A*  $p=0,044$ )
- allelu A rs17708087 (*model addytywny*  $p=0,01$ , *test trendu*  $p=0,025$ , *dominujący allel A*  $p=0,003$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Przebyty zawał serca		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 9	n = 5	*p= 0,74	n= 61; 20%
			AG	n = 28	n = 26	**p= 0,64	
			GG	n = 91	n = 80	#p= 0,88 ##p= 0,58	
rs2023906	A	G	AA	n = 85	n = 79	*p= 0,55	n= 32; 11%
			AG	n = 43	n = 48	**p= 0,29	
			GG	n = 5	n = 8	#p= 0,57 ##p= 0,38	
rs9675320	T	C	TT	n = 82	n = 82	*p= 0,70	n= 65; 22%
			TC	n = 30	n = 23	**p= 0,65	
			CC	n = 9	n = 9	#p= 0,90 ##p= 0,49	
rs645991	C	T	CC	n = 50	n = 50	*p= 0,26	n= 47; 16%
			TC	n = 60	n = 46	**p= 0,63	
			TT	n = 20	n = 27	#p= 0,18 ##p= 0,72	
rs16965880	G	A	GG	n = 89	n = 94	*p= 0,10	n= 51; 17%
			AG	n = 37	n = 22	**p= <b>0,034</b>	
			AA	n = 5	n = 2	#p= 0,45 ##p= <b>0,044</b>	
rs17708087	A	G	AA	n = 39	n = 34	*p= <b>0,010</b>	n= 13; 4%
			AG	n = 69	n = 51	**p= <b>0,025</b>	
			GG	n = 35	n = 59	#p= <b>0,003</b> ##p= 0,48	
rs3176818	A	G	AA	n = 70	n = 85	*p= 0,23	n= 60; 20%
			AG	n = 40	n = 32	**p= 0,09	
			GG	n = 8	n = 5	#p= 0,35 ##p= 0,09	
rs3176820	C	T	TT	n = 73	n = 76	* p= 0,54	n= 50; 17%
			CT	n = 49	n = 40	**p= 0,73	
			CC	n = 5	n = 7	#p= 0,52 ##p= 0,48	
rs3176823	C	T	CC	n = 119	n = 122	*p= 0,47	n= 27; 9%
			CT	n = 18	n = 14	**p= 0,47	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,46	

**Tabela 5.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, redukujących średnicę światła od 10 do 100%.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko zmian, redukujących średnicę światła naczyń od 10 do 100% zwiększała obecność:

- allelu A rs3136685 (*model addytywny p= 0,033, test trendu p= 0,049, dominujący allel A p= 0,027*)
- allelu C rs3176823 (*test trendu p=0,039, dominujący allel C p= 0,039*)

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Zmiana redukująca średnicę 10-100%		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 12	n = 2	*p= 0,033	n= 57; 19%
			AG	n = 42	n = 12	**p= 0,049	
			GG	n = 159	n = 16	#p= 0,027 ##p= 0,68	
rs2023906	A	G	AA	n = 147	n = 21	*p= 0,26	n= 26; 9%
			AG	n = 77	n = 15	**p= 0,81	
			GG	n = 14	n = 0	#p= 0,22 ##p= 0,71	
rs9675320	T	C	TT	n = 143	n = 23	*p= 0,34	n= 63; 21%
			TC	n = 49	n = 5	**p= 0,78	
			CC	n = 14	n = 4	#p= 0,27 ##p= 0,83	
rs645991	C	T	CC	n = 88	n = 14	*p= 0,43	n= 41; 14%
			TC	n = 100	n = 9	**p= 0,60	
			TT	n = 42	n = 6	#p= 0,71 ##p= 0,30	
rs16965880	G	A	GG	n = 162	n = 25	*p= 0,31	n= 45; 15%
			AG	n = 57	n = 4	**p= 0,28	
			AA	n = 6	n = 1	#p= 0,59 ##p= 0,27	
rs17708087	A	G	AA	n = 66	n = 9	*p= 0,90	n= 9; 3%
			AG	n = 108	n = 14	**p= 0,74	
			GG	n = 83	n = 13	#p= 0,65 ##p= 0,93	
rs3176818	A	G	AA	n = 138	n = 20	*p= 0,94	n= 56; 18%
			AG	n = 63	n = 10	**p= 0,74	
			GG	n = 11	n = 2	#p= 0,80 ##p= 0,77	
rs3176820	C	T	TT	n = 123	n = 23	*p= 0,07	n= 44; 14%
			CT	n = 83	n = 6	**p= 0,49	
			CC	n = 9	n = 3	#p= 0,18 ##p= 0,16	
rs3176823	C	T	CC	n = 218	n = 27	*p= 0,051	n= 21; 7%
			CT	n = 26	n = 8	**p= 0,039	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,039	

**Tabela 6.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian krytycznych miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, redukujących średnicę światła naczyń od 50 do 100%.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko krytycznych zmian, redukujących średnicę światła naczyń powyżej 50% zwiększała obecność:

- allelu A rs17708087 (*dominujący allel A p= 0,015*)
- alelu C rs3176823 (*test trendu p=0,034, dominujący allel C p= 0,034*)

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Zmiana redukująca średnicę 50-100%		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 12	n = 2	*p= 0,08	n= 57; 19%
			AG	n = 39	n = 15	**p= 0,15	
			GG	n = 150	n = 25	#p= 0,06 ##p= 1,00	
rs2023906	A	G	AA	n = 139	n = 29	*p= 0,41	n= 26; 9%
			AG	n = 70	n = 22	**p= 0,47	
			GG	n = 12	n = 2	#p= 1,00 ##p= 0,27	
rs9675320	T	C	TT	n = 128	n = 38	*p= 0,16	n= 62; 21%
			TC	n = 48	n = 6	**p= 0,28	
			CC	n = 14	n = 4	#p= 0,76 ##p= 0,16	
rs645991	C	T	CC	n = 83	n = 19	*p= 0,30	n= 41; 14%
			TC	n = 93	n = 16	**p= 0,58	
			TT	n = 36	n = 12	#p= 0,17 ##p= 0,87	
rs16965880	G	A	GG	n = 148	n = 39	*p= 0,27	n= 45; 15%
			AG	n = 54	n = 7	**p= 0,13	
			AA	n = 6	n = 1	#p= 1,00 ##p= 0,10	
rs17708087	A	G	AA	n = 63	n = 12	*p= 0,052	n= 7; 2%
			AG	n = 104	n = 18	**p= 0,051	
			GG	n = 70	n = 26	#p= <b>0,015</b> ##p= 0,43	
rs3176818	A	G	AA	n = 128	n = 30	*p= 0,84	n= 56; 18%
			AG	n = 57	n = 16	**p= 0,56	
			GG	n = 10	n = 3	#p= 0,78 ##p= 0,56	
rs3176820	C	T	TT	n = 120	n = 35	*p= 0,08	n= 44; 15%
			CT	n = 79	n = 10	**p= 0,15	
			CC	n = 9	n = 3	#p= 0,57 ##p= 0,51	
rs3176823	C	T	CC	n = 203	n = 42	*p= 0,058	n= 21; 7%
			CT	n = 23	n = 11	**p= <b>0,034</b>	
			TT	n = 0	n = 0	#p= <b>0,034</b>	



**Tabela 7.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian miażdżycowych, redukujących średnicę światła naczynia o 100% (nieodróżność).

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko przewlekłej nieodróżności naczynia zwiększała obecność:

- allelu C rs9675320 (*model addytywny p= 0,034, test trendu p= 0,02, dominujący allel C p= 0,013*)
- allelu A rs16965880 (*test trendu p= 0,025, dominujący allel A p= 0,038*)
- allelu T rs3176820 (*model addytywny p= 0,022, dominujący allel A p= 0,014*)

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Zmiana redukująca średnicę o 100%		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 10	n = 4	*p= 0,87	n= 57; 19%
			AG	n = 34	n = 20	**p= 0,87	
			GG	n = 114	n = 61	#p= 1,00 ##p= 0,78	
rs2023906	A	G	AA	n = 104	n = 64	*p= 0,43	n= 26; 9%
			AG	n = 61	n = 31	**p= 0,20	
			GG	n = 11	n = 3	#p= 0,39 ##p= 0,36	
rs9675320	T	C	TT	n = 95	n = 71	<b>*p= 0,034</b>	n= 62; 21%
			TC	n = 41	n = 13	<b>**p= 0,02</b>	
			CC	n = 13	n = 5	#p= 0,45 <b>##p= 0,013</b>	
rs645991	C	T	CC	n = 62	n = 40	*p= 0,32	n= 41; 14%
			TC	n = 74	n = 35	**p= 0,86	
			TT	n = 27	n = 21	#p= 0,29 ##p= 0,56	
rs16965880	G	A	GG	n = 113	n = 74	*p= 0,08	n= 45; 15%
			AG	n = 45	n = 16	<b>**p= 0,025</b>	
			AA	n = 6	n = 1	#p= 0,43 <b>##p= 0,038</b>	
rs17708087	A	G	AA	n = 48	n = 27	*p= 0,40	n= 7; 2%
			AG	n = 82	n = 40	**p= 0,40	
			GG	n = 56	n = 40	#p= 0,20 ##p= 0,91	
rs3176818	A	G	AA	n = 104	n = 54	*p= 0,56	n= 56; 18%
			AG	n = 43	n = 30	**p= 0,38	
			GG	n = 8	n = 5	#p= 0,87 ##p= 0,31	
rs3176820	C	T	TT	n = 92	n = 63	<b>*p= 0,023</b>	n= 44; 15%
			CT	n = 68	n = 21	**p= 0,062	
			CC	n = 7	n = 5	#p= 0,60 <b>##p= 0,014</b>	
rs3176823	C	T	CC	n = 158	n = 87	*p= 0,25	n= 21; 7%
			CT	n = 18	n = 16	**p= 0,19	
			TT	n = 0	n = 0	#p= 0,19	

**Tabela 8.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian wielonaczyniowych.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko zmian wielonaczyniowych zwiększała obecność allelu G rs2023906 (*model addytywny*  $p = 0,04$ , *dominujący allel A*  $p = 0,013$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Zmiany wielonaczyniowe		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 8	n = 6	*p= 0,37	n= 57; 19%
			AG	n = 25	n = 29	**p= 0,39	
			GG	n = 100	n = 75	#p= 0,22 ##p= 0,85	
rs2023906	A	G	AA	n = 86	n = 82	*p= 0,04	n= 26; 9%
			AG	n = 47	n = 45	**p= 0,12	
			GG	n = 12	n = 2	#p= 0,013 ##p= 0,54	
rs9675320	T	C	TT	n = 88	n = 78	*p= 0,78	n= 62; 21 %
			TC	n = 30	n = 24	**p= 0,50	
			CC	n = 11	n = 7	#p= 0,54 ##p= 0,58	
rs645991	C	T	CC	n = 55	n = 47	*p= 0,50	n= 41; 14%
			TC	n = 61	n = 48	**p= 0,47	
			TT	n = 22	n = 26	#p= 0,25 ##p= 0,87	
rs16965880	G	A	GG	n = 97	n = 90	*p= 0,38	n= 45; 15%
			AG	n = 38	n = 23	**p= 0,20	
			AA	n = 4	n = 3	#p= 1,00 ##p= 0,20	
rs17708087	A	G	AA	n = 39	n = 36	*p= 0,66	n= 7; 2%
			AG	n = 70	n = 52	**p= 0,95	
			GG	n = 50	n = 46	#p= 0,60 ##p= 0,65	
rs3176818	A	G	AA	n = 89	n = 69	*p= 0,68	n= 56; 19%
			AG	n = 38	n = 35	**p= 0,38	
			GG	n = 6	n = 7	#p= 0,53 ##p= 0,43	
rs3176820	C	T	TT	n = 75	n = 80	*p= 0,12	n= 44; 15%
			CT	n = 55	n = 34	**p= 0,13	
			CC	n = 6	n = 6	#p= 0,82 ##p= 0,06	
rs3176823	C	T	CC	n = 109	n = 136	*p= 0,21	n= 21; 7%
			CT	n = 89	n = 69	**p= 0,21	
			TT	n = 38	n = 35	##p= 0,21	

**Tabela 9.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian miażdżycowych w proksymalnych odcinkach tętnic wieńcowych.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej obecność allelu G rs3136685, zwiększała ryzyko zmian w proksymalnych odcinkach tętnic (*dominujący allel A*  $p=0,024$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Obecność zmiany w odcinku proksymalnym		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 10	n = 4	*p=0,064	n= 57; 19%
			AG	n = 33	n = 21	**p= 0,06	
			GG	n = 136	n = 39	#p= <b>0,024</b> ##p= 0,76	
rs2023906	A	G	AA	n = 118	n = 50	*p= 0,53	n= 26; 9%
			AG	n = 66	n = 26	**p= 0,36	
			GG	n = 12	n = 2	#p= 0,22 ##p= 0,59	
rs9675320	T	C	TT	n = 122	n = 44	*p= 0,46	n= 62; 21%
			TC	n = 41	n = 13	**p= 0,51	
			CC	n = 11	n = 7	#p= 0,23 ##p= 0,84	
rs645991	C	T	CC	n = 71	n = 31	*p= 0,45	n= 41; 14%
			TC	n = 84	n = 25	**p= 0,35	
			TT	n = 36	n = 12	#p= 0,83 ##p= 0,22	
rs16965880	G	A	GG	n = 135	n = 52	*p= 0,37	n= 45; 15%
			AG	n = 48	n = 13	**p= 0,78	
			AA	n = 4	n = 3	#p= 0,38 ##p= 0,53	
rs17708087	A	G	AA	n = 51	n = 24	*p= 0,44	n= 7; 2%
			AG	n = 93	n = 29	**p= 0,42	
			GG	n = 71	n = 25	#p= 0,88 ##p= 0,22	
rs3176818	A	G	AA	n = 114	n = 44	*p= 0,70	n= 56; 19%
			AG	n = 56	n = 17	**p= 0,73	
			GG	n = 9	n = 4	#p= 0,73 ##p= 0,56	
rs3176820	C	T	TT	n = 110	n = 45	*p= 0,27	n= 44; 15%
			CT	n = 69	n = 20	**p= 0,82	
			CC	n = 7	n = 5	#p= 0,25 ##p= 0,45	
rs3176823	C	T	CC	n = 183	n = 62	*p= 0,06	n= 21; 7%
			CT	n = 20	n = 14	**p= 0,051	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,051	

**Tabela 10.** Analiza wpływu polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 na obecność zmian miażdżycowych w dystalnych odcinkach tętnic wieńcowych.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej ryzyko zmian w dystalnych odcinkach tętnic zwiększała obecność:

- allelu G rs3136685 (*dominujący allel A*  $p= 0,042$ )
- allelu A rs3176818 (*model addytywny*  $p=0,04$ ; *dominujący allel A*  $p= 0,048$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Obecność zmiany w odcinku dystalnym		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 10	n = 4	*p=0,057	n= 57; 19%
			AG	n = 31	n = 23	**p= 0,11	
			GG	n = 130	n = 45	#p= <b>0,042</b> ##p= 1,00	
rs2023906	A	G	AA	n = 117	n = 51	*p= 0,33	n= 26; 9%
			AG	n = 60	n = 32	**p= 0,79	
			GG	n = 12	n = 2	#p= 0,23 ##p= 0,79	
rs9675320	T	C	TT	n = 117	n = 49	*p= 0,26	n= 62; 21%
			TC	n = 41	n = 13	**p= 0,56	
			CC	n = 10	n = 8	#p= 0,15 ##p= 0,66	
rs645991	C	T	CC	n = 75	n = 27	*p= 0,64	n= 41; 14%
			TC	n = 80	n = 29	**p= 0,44	
			TT	n = 32	n = 16	#p= 0,34 ##p= 0,70	
rs16965880	G	A	GG	n = 127	n = 60	*p= 0,51	n= 45; 15%
			AG	n = 46	n = 15	**p= 0,33	
			AA	n = 5	n = 2	#p= 1,00 ##p= 0,35	
rs17708087	A	G	AA	n = 52	n = 23	*p= 0,51	n= 7; 2%
			AG	n = 90	n = 32	**p= 0,64	
			GG	n = 64	n = 32	#p= 0,34 ##p= 0,83	
rs3176818	A	G	AA	n = 115	n = 43	*p= 0,12	n= 44; 15%
			AG	n = 45	n = 28	**p= <b>0,04</b>	
			GG	n = 7	n = 6	#p= 0,24 ##p= <b>0,048</b>	
rs3176820	C	T	TT	n = 107	n = 48	*p= 0,53	n= 44; 15%
			CT	n = 67	n = 22	**p= 0,53	
			CC	n = 8	n = 4	#p= 0,73 ##p= 0,37	
rs3176823	C	T	CC	n = 174	n = 71	*p= 1,00	n= 21; 7%
			CT	n = 24	n = 10	**p= 0,96	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,96	

**Tabela 11.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością nadciśnienia tętniczego.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej nie obserwowano asocjacji pomiędzy obecnością polimorfizmów genu CCR7, a występowaniem nadciśnienia tętniczego

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Nadciśnienie tętnicze		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 11	n = 3	*p= 0,45	n=60; 20 %
			AG	n = 38	n = 16	**p= 0,45	
			GG	n = 135	n = 37	#p= 0,31 ##p= 1,00	
rs2023906	A	G	AA	n = 119	n = 45	*p= 0,47	n= 30; 11%
			AG	n = 73	n = 19	**p= 0,25	
			GG	n = 11	n = 3	#p= 1,00 ##p= 0,25	
rs9675320	T	C	TT	n = 131	n = 33	*p= 0,21	n= 64; 21%
			TC	n = 37	n = 17	**p= 0,13	
			CC	n = 13	n = 5	#p= 0,64 ##p= 0,08	
rs645991	C	T	CC	n = 75	n = 25	*p= 0,96	n= 45; 15%
			TC	n = 81	n = 26	**p= 0,79	
			TT	n = 37	n = 11	#p= 0,80 ##p= 0,84	
rs16965880	G	A	GG	n = 144	n = 40	*p= 0,70	n= 49; 16%
			AG	n = 45	n = 15	**p= 0,52	
			AA	n = 5	n = 2	#p= 0,71 ##p= 0,61	
rs17708087	A	G	AA	n = 55	n = 19	*p= 0,20	n= 11; 4%
			AG	n = 86	n = 34	**p= 0,20	
			GG	n = 78	n = 17	#p= 0,08 ##p= 0,74	
rs3176818	A	G	AA	n = 119	n = 37	*p= 0,59	n= 60, 20%
			AG	n = 51	n = 20	**p= 0,97	
			GG	n = 11	n = 2	#p= 0,43 ##p= 0,67	
rs3176820	C	T	TT	n = 114	n = 38	*p= 0,87	n= 48; 16%
			CT	n = 67	n = 21	**p= 0,60	
			CC	n = 10	n = 2	#p= 0,53 ##p= 0,71	
rs3176823	C	T	CC	n = 185	n = 57	*p= 0,67	n= 25; 8%
			CT	n = 24	n = 9	**p= 0,64	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,64	

**Tabela 12.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością cukrzycy w wywiadzie.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej nie obserwowano asocjacji pomiędzy obecnością polimorfizmów genu CCR7, a występowaniem cukrzycy

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Cukrzyca		Wartość p	Brak danych
				----- tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 3	n = 11	*p= 0,92	n= 60; 20%
			AG	n = 10	n = 44	**p= 0,78	
			GG	n = 31	n = 141	#p= 0,85 ##p= 0,73	
rs2023906	A	G	AA	n = 33	n = 132	*p= 0,69	n= 30; 11%
			AG	n = 18	n = 73	**p= 0,65	
			GG	n = 4	n = 10	#p= 0,49 ##p= 0,88	
rs9675320	T	C	TT	n = 28	n = 137	*p= 0,74	n= 63; 21%
			TC	n = 8	n = 46	**p= 0,82	
			CC	n = 4	n = 14	#p= 0,52 ##p= 1,00	
rs645991	C	T	CC	n = 18	n = 82	*p= 0,68	n= 45; 15%
			TC	n = 24	n = 84	**p= 0,93	
			TT	n = 8	n = 39	#p= 0,69 ##p= 0,63	
rs16965880	G	A	GG	n = 35	n = 149	*p= 0,31	n= 49; 16%
			AG	n = 15	n = 45	**p= 0,94	
			AA	n = 0	n = 7	#p= 0,35 ##p= 0,59	
rs17708087	A	G	AA	n = 17	n = 57	*p= 0,59	n= 11; 4%
			AG	n = 21	n = 100	**p= 0,84	
			GG	n = 20	n = 74	#p= 0,72 ##p= 0,47	
rs3176818	A	G	AA	n = 33	n = 122	*p= 0,56	n= 60; 20%
			AG	n = 16	n = 56	**p= 0,51	
			GG	n = 1	n = 12	#p= 0,23 ##p= 0,81	
rs3176820	C	T	TT	n = 27	n = 124	*p= 0,78	n= 48; 16%
			CT	n = 17	n = 72	**p= 0,59	
			CC	n = 3	n = 9	#p= 0,56 ##p= 0,70	
rs3176823	C	T	CC	n = 50	n = 192	*p= 0,15	n= 25; 8%
			CT	n = 3	n = 30	**p= 0,11	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,11	

**Tabela 13.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością hypercholesterolemii.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej nie obserwowano asocjacji pomiędzy obecnością polimorfizmów genu CCR7, a występowaniem hypercholesterolemii

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Hypercholesterolemia		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 12	n = 1	*p= 0,24	n= 65; 22%
			AG	n = 37	n = 16	**p= 0,82	
			GG	n = 130	n = 39	#p= 0,74 ##p= 0,31	
rs2023906	A	G	AA	n = 122	n = 39	*p= 0,85	n= 35; 12%
			AG	n = 70	n = 21	**p= 0,73	
			GG	n = 11	n = 2	#p= 0,48 ##p= 0,77	
rs9675320	T	C	TT	n = 131	n = 32	*p= 0,38	n= 67; 22%
			TC	n = 40	n = 12	**p= 0,19	
			CC	n = 12	n = 6	#p= 0,20 ##p= 0,30	
rs645991	C	T	CC	n = 73	n = 24	*p= 0,51	n= 50; 17%
			TC	n = 85	n = 21	**p= 0,25	
			TT	n = 39	n = 8	#p= 0,44 ##p= 0,28	
rs16965880	G	A	GG	n = 146	n = 35	*p= 0,53	n= 52; 17%
			AG	n = 45	n = 15	**p= 0,29	
			AA	n = 5	n = 2	#p= 0,64 ##p= 0,30	
rs17708087	A	G	AA	n = 54	n = 19	*p= 0,55	n= 16; 6%
			AG	n = 96	n = 23	**p= 0,55	
			GG	n = 72	n = 20	#p= 0,98 ##p= 0,31	
rs3176818	A	G	AA	n = 118	n = 36	*p= 0,89	n= 64; 21%
			AG	n = 55	n = 14	**p= 0,72	
			GG	n = 10	n = 3	#p= 0,96 ##p= 0,65	
rs3176820	C	T	TT	n = 117	n = 33	*p= 0,19	n= 51; 17%
			CT	n = 68	n = 19	**p= 0,26	
			CC	n = 12	n = 0	#p= 0,07 ##p= 0,60	
rs3176823	C	T	CC	n = 180	n = 58	*p= 0,10	n= 30; 11%
			CT	n = 28	n = 4	**p= 0,13	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,13	

**Tabela 14.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością otyłości.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej otyłość częściej występowała wśród nosicieli:

- allelu T rs9675320, (*test trendu*  $p = 0,032$ , *dominujący allel T*  $p = 0,029$ )
- allelu T rs645991, (*dominujący allel C*  $p = 0,022$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Otyłość		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 5	n = 6	*p= 0,09	n= 96; 32%
			AG	n = 12	n = 37	**p= 0,27	
			GG	n = 59	n = 85	#p= 0,11 ##p= 0,55	
rs2023906	A	G	AA	n = 48	n = 96	*p= 0,23	n= 68; 23%
			AG	n = 34	n = 43	**p= 0,38	
			GG	n = 3	n = 8	#p= 0,75 ##p= 0,21	
rs9675320	T	C	TT	n = 64	n = 83	*p=0,062	n= 95; 32%
			TC	n = 16	n = 27	**p=0,030	
			CC	n = 2	n = 13	#p=0,029 ##p= 0,11	
rs645991	C	T	CC	n = 29	n = 57	*p= 0,07	n= 82; 27%
			TC	n = 32	n = 59	**p=0,054	
			TT	n = 22	n = 19	#p=0,022 ##p= 0,29	
rs16965880	G	A	GG	n = 58	n = 107	*p= 0,27	n= 80; 27%
			AG	n = 21	n = 27	**p= 0,90	
			AA	n = 1	n = 6	#p= 0,42 ##p= 0,52	
rs17708087	A	G	AA	n = 24	n = 42	*p= 0,97	n= 52; 17%
			AG	n = 36	n = 62	**p= 0,82	
			GG	n = 32	n = 52	#p= 0,82 ##p= 0,89	
rs3176818	A	G	AA	n = 46	n = 91	*p= 0,32	n= 90; 30%
			AG	n = 27	n = 35	**p= 0,52	
			GG	n = 3	n = 8	#p= 0,53 ##p= 0,28	
rs3176820	C	T	TT	n = 51	n = 77	*p= 0,83	n= 85; 28%
			CT	n = 27	n = 49	**p= 0,57	
			CC	n = 4	n = 7	#p= 0,90 ##p= 0,53	
rs3176823	C	T	CC	n = 78	n = 132	*p= 0,61	n= 64; 21%
			CT	n = 11	n = 15	**p= 0,61	
			TT	n = 0	n = 0	#p= 0,61	



**Tabela 15.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku choroby niedokrwiennej serca.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej dodatni wywiad rodzinnego w kierunku choroby niedokrwiennej serca występował częściej wśród nosicieli allelu G rs3176818 (*model addytywny*  $p=0,046$ , *test trendu*  $p=0,013$ , *dominujący allel G*  $p=0,012$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Dodatni wywiad rodzinny ch.n.s.		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 4	n = 4	*p= 0,24	n= 137; 46%
			AG	n = 29	n = 11	**p= 0,51	
			GG	n = 68	n = 47	#p= 0,29 ##p= 0,48	
rs2023906	A	G	AA	n = 69	n = 44	*p= 0,60	n= 115; 38%
			AG	n = 41	n = 21	**p= 0,99	
			GG	n = 5	n = 5	#p= 0,51 ##p= 0,75	
rs9675320	T	C	TT	n = 65	n = 41	*p= 0,75	n= 142; 47%
			TC	n = 25	n = 13	**p= 0,41	
			CC	n = 10	n = 4	#p= 0,58 ##p= 0,49	
rs645991	C	T	CC	n = 43	n = 24	*p= 0,93	n= 128; 43%
			TC	n = 47	n = 28	**p= 0,88	
			TT	n = 20	n = 10	#p= 0,73 ##p= 0,97	
rs16965880	G	A	GG	n = 81	n = 50	*p= 0,09	n= 126; 42%
			AG	n = 27	n = 11	**p= 0,74	
			AA	n = 1	n = 4	#p=0,065 ##p= 0,72	
rs17708087	A	G	AA	n = 30	n = 23	*p= 0,53	n= 102; 34%
			AG	n = 53	n = 27	**p= 0,63	
			GG	n = 40	n = 25	#p= 0,91 ##p= 0,33	
rs3176818	A	G	AA	n = 62	n = 48	*p=0,046	n= 132; 44%
			AG	n = 35	n = 12	**p=0,013	
			GG	n = 9	n = 2	#p= 0,18 ##p=0,012	
rs3176820	C	T	TT	n = 58	n = 48	*p= 0,21	n= 130; 43%
			CT	n = 38	n = 28	**p= 0,07	
			CC	n = 5	n = 1	#p= 0,12 ##p= 0,11	
rs3176823	C	T	CC	n = 99	n = 61	*p= 0,82	n= 116; 39%
			CT	n = 16	n = 8	**p= 0,65	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,65	

**Tabela 16.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością zaburzeń rytmu serca.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej zaburzenia rytmu serca występowały częściej wśród nosicieli:

- allelu T rs9675320 (*dominacja allelu C p= 0,028*)
- allelu C rs3176820 (*model addytywny p=0,018, dominacja allelu T p= 0,014*)

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Zaburzenia rytmu serca		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 1	n = 12	*p= 0,24	n= 71; 24%
			AG	n = 5	n = 48	**p= 0,09	
			GG	n = 30	n = 133	#p= 0,11 ##p= 0,70	
rs2023906	A	G	AA	n = 23	n = 136	*p= 0,65	n= 42; 14%
			AG	n = 16	n = 71	**p= 0,81	
			GG	n = 1	n = 11	#p= 0,69 ##p= 0,59	
rs9675320	T	C	TT	n = 31	n = 127	*p=0,061	n= 76; 25%
			TC	n = 3	n = 45	**p= 0,06	
			CC	n = 2	n = 16	#p= 0,75 ##p=0,028	
rs645991	C	T	CC	n = 12	n = 83	*p= 0,21	n= 58; 19%
			TC	n = 23	n = 81	**p= 0,34	
			TT	n = 7	n = 36	#p= 0,83 ##p= 0,12	
rs16965880	G	A	GG	n = 26	n = 150	*p= 0,42	n= 60; 20%
			AG	n = 9	n = 49	**p= 0,43	
			AA	n = 2	n = 4	#p= 0,23 ##p= 0,68	
rs17708087	A	G	AA	n = 9	n = 63	*p= 0,33	n= 25; 9%
			AG	n = 23	n = 91	**p= 0,80	
			GG	n = 13	n = 76	#p= 0,59 ##p= 0,30	
rs3176818	A	G	AA	n = 22	n = 128	*p= 0,57	n= 67; 22%
			AG	n = 14	n = 56	**p= 0,49	
			GG	n = 2	n = 11	#p= 0,93 ##p= 0,36	
rs3176820	C	T	TT	n = 18	n = 126	*p= 0,018	n= 59; 20%
			CT	n = 21	n = 63	**p= 0,07	
			CC	n = 1	n = 10	#p= 0,46 ##p= 0,14	
rs3176823	C	T	CC	n = 37	n = 195	*p= 1,00	n= 38; 12%
			CT	n = 4	n = 26	**p= 0,71	
			TT	n = 0	n = 0	#p= 0,71	

**Tabela 17.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością migotania przedsionków.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej migotanie przedsionków występowało częściej wśród nosicieli allelu T rs3176820 (*model addytywny*  $p=0,014$ ; *dominacja allelu T*  $p=0,01$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Migotanie przedsionków		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 0	n = 13	*p= 0,77	n= 74; 25%
			AG	n = 5	n = 47	**p= 0,45	
			GG	n = 15	n = 146	#p= 0,80 ##p= 0,61	
rs2023906	A	G	AA	n = 10	n = 146	*p= 0,39	n= 45; 15%
			AG	n = 11	n = 76	**p= 0,47	
			GG	n = 0	n = 12	#p= 0,61 ##p= 0,24	
rs9675320	T	C	TT	n = 16	n = 139	*p= 0,69	n= 79; 26%
			TC	n = 3	n = 35	**p= 0,72	
			CC	n = 2	n = 16	#p= 0,68 ##p= 0,61	
rs645991	C	T	CC	n = 4	n = 88	*p= 0,14	n= 62; 21%
			TC	n = 12	n = 91	**p= 0,09	
			TT	n = 5	n = 38	#p= 0,55 ##p= 0,06	
rs16965880	G	A	GG	n = 17	n = 157	*p= 0,34	n= 63; 21%
			AG	n = 3	n = 54	**p= 0,61	
			AA	n = 1	n = 5	#p= 0,43 ##p= 0,61	
rs17708087	A	G	AA	n = 5	n = 65	*p= 0,36	n= 29; 11%
			AG	n = 13	n = 100	**p= 0,66	
			GG	n = 5	n = 83	#p= 0,35 ##p= 0,80	
rs3176818	A	G	AA	n = 12	n = 135	*p= 0,54	n= 69; 23%
			AG	n = 5	n = 65	**p= 0,65	
			GG	n = 2	n = 11	#p= 0,34 ##p= 0,93	
rs3176820	C	T	TT	n = 6	n = 135	*p= <b>0,014</b>	n= 62; 21%
			CT	n = 13	n = 73	**p= 0,07	
			CC	n = 0	n = 11	#p= 0,32 ##p= <b>0,01</b>	
rs3176823	C	T	CC	n = 17	n = 210	*p= 0,71	n= 43; 14%
			CT	n = 3	n = 27	**p= 0,62	
			TT	n = 0	n = 0	#p= 0,62	

**Tabela 18.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością chromania przestankowego.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej chromanie przestankowe występowało częściej wśród nosicieli:

- allelu G rs3136685 (*model addytywny*  $p=0,02$ , *test trendu*  $p=0,032$ , *dominujący allel A*  $p=0,01$ )
- allelu A rs17708087 (*model addytywny*  $p=0,024$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Chromanie przestankowe		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 1	n = 10	*p= 0,02	n= 101; 34 %
			AG	n = 1	n = 45	**p=0,032	
			GG	n = 24	n = 118	#p= 0,01 ##p= 0,69	
rs2023906	A	G	AA	n = 14	n = 129	*p= 0,35	n= 73; 24%
			AG	n = 10	n = 64	**p= 0,23	
			GG	n = 2	n = 8	#p= 0,32 ##p= 0,31	
rs9675320	T	C	TT	n = 18	n = 119	*p= 0,34	n= 104; 35%
			TC	n = 2	n = 40	**p= 0,37	
			CC	n = 2	n = 15	#p= 1,00 ##p= 0,20	
rs645991	C	T	CC	n = 6	n = 80	*p= 0,20	n= 91; 30%
			TC	n = 13	n = 72	**p= 0,32	
			TT	n = 4	n = 34	#p= 1,00 ##p= 0,12	
rs16965880	G	A	GG	n = 19	n = 132	*p= 0,64	n= 93; 31%
			AG	n = 8	n = 42	**p= 0,53	
			AA	n = 1	n = 5	#p= 0,58 ##p= 0,51	
rs17708087	A	G	AA	n = 6	n = 59	*p=0,024	n= 59; 20%
			AG	n = 18	n = 76	**p= 0,44	
			GG	n = 5	n = 77	#p=0,058 ##p= 0,42	
rs3176818	A	G	AA	n = 13	n = 122	*p= 0,16	n= 93; 31%
			AG	n = 9	n = 51	**p= 0,08	
			GG	n = 3	n = 9	#p= 0,16 ##p= 0,14	
rs3176820	C	T	TT	n = 12	n = 116	*p= 0,30	n= 87; 29%
			CT	n = 10	n = 66	**p= 0,19	
			CC	n = 2	n = 7	#p= 0,28 ##p= 0,28	
rs3176823	C	T	CC	n = 27	n = 177	*p= 0,87	n= 70; 23%
			CT	n = 2	n = 24	**p= 0,42	
			TT	n = 0	n = 0	#p= 0,42	

**Tabela 19.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z obecnością dolegliwości dławicowych w klasie CCS II/III-IV.

**Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej wśród nosicieli allelu G rs2023906, częściej występowały dolegliwości dławicowe w klasie CCS II/III-IV (*model addytywny*  $p=0,002$ , *test trendu*  $p=0,027$ , *dominacja allelu A*  $p=8 \times 10^{-4}$ )

SNP	Allel 1	Allel 2	Genotyp	Klasa CCS II/III-IV		Wartość p	Brak danych
				tak	nie		
rs3136685	A	G	AA	n = 5	n = 3	*p= 0,96	n= 123; 41%
			AG	n = 22	n = 18	**p= 0,79	
			GG	n = 71	n = 58	#p= 1,00 ##p= 0,73	
rs2023906	A	G	AA	n = 58	n = 60	*p=0,002	n= 106; 35%
			AG	n = 33	n = 32	*p=8x10 <sup>-4</sup>	
			GG	n = 11	n = 0	#p=0,001 ##p= 0,24	
rs9675320	T	C	TT	n = 61	n = 57	*p= 0,14	n= 124; 41%
			TC	n = 28	n = 13	**p= 0,54	
			CC	n = 8	n = 9	#p= 0,48 ##p= 0,19	
rs645991	C	T	CC	n = 42	n = 33	*p= 0,51	n= 113; 38%
			TC	n = 39	n = 42	**p= 0,89	
			TT	n = 18	n = 13	#p= 0,53 ##p= 0,49	
rs16965880	G	A	GG	n = 75	n = 57	*p= 0,32	n= 115; 38%
			AG	n = 24	n = 22	**p= 0,24	
			AA	n = 2	n = 5	#p= 0,16 ##p= 0,41	
rs17708087	A	G	AA	n = 27	n = 33	*p= 0,36	n= 89; 30%
			AG	n = 47	n = 39	**p= 0,19	
			GG	n = 37	n = 28	#p= 0,40 ##p= 0,16	
rs3176818	A	G	AA	n = 58	n = 58	*p= 0,58	n= 117; 39%
			AG	n = 26	n = 30	**p= 0,76	
			GG	n = 7	n = 4	#p= 0,34 ##p= 0,93	
rs3176820	C	T	TT	n = 62	n = 47	*p= 0,23	n= 114; 38%
			CT	n = 32	n = 36	**p= 0,09	
			CC	n = 3	n = 6	#p= 0,24 ##p= 0,12	
rs3176823	C	T	CC	n = 93	n = 82	*p= 0,08	n= 102; 34%
			CT	n = 9	n = 14	**p= 0,20	
			TT	n = 0	n = 0	##p= 0,20	

**Tabela 20.** Analiza związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z wybranymi zmiennymi ciągłymi (BMI, stężenie glukozy, cholesterolu całkowitego - TC, frakcji LDL, frakcji HDL i trójglicerydów - TG, wartością frakcji wyrzutowej lewej komory w badaniu echokardiograficznym- EF). Przedstawiono wybrane wyniki (\*Test Kruskala-Wallis).

SNP	Zmienna kliniczna	Genotyp	Liczba chorych	Średnia, wartość, SD	Wartość p	Brak danych
rs2023906	stężenie glukozy [mmol/l]	AA	n= 158	5,7 +/- 1,1	<b>*p=0,029</b>	n= 45 ; 15%
		AG	n= 84	5,6 +/- 1,2		
		GG	n=13	5,1 +/- 0,7		
rs9675320	BMI	TT	n= 143	28,5 +/- 3,8	<b>*p= 0,028</b>	n= 101;33%
		TC	n=41	28,5 +/- 4,1		
		CC	n= 15	25,9 +/- 3,5		
rs9675320	stężenie glukozy [mmol/l]	TT	n= 153	5,8 +/- 1,4	<b>*p= 0,028</b>	n= 78; 26%
		TC	n= 51	5,4 +/- 0,8		
		CC	n= 18	5,0 +/- 1,5		
		TC	n= 89	27,5 +/- 4,1		
		TT	n= 39	29,5 +/- 3,9		
rs16965880	BMI	GG	n= 161	28 +/- 4,1	<b>*p= 0,016</b>	n= 53; 18%
		AG	n= 47	28,6 +/- 3,3		
		AA	n= 6	23,5 +/- 4,1		
rs17708087	HDL [mmol/l]	AA	n= 68	1,26 +/- 0,3	<b>*p= 0,024</b>	n=40; 13%
		AG	n= 112	1,15 +/- 0,3		
		GG	n= 80	1,19 +/- 0,3		
rs3176820	EF [%]	TT	n= 119	59,3 +/- 12,2	<b>*p= 0,01</b>	n=104; 34%
		CT	n= 68	54,5 +/- 12,2		
		CC	n= 9	59,4 +/- 10,3		

**Wniosek:**

- Nosiciele allelu A rs2023906; allelu T rs9675320, mieli wyższe stężenie glukozy we krwi (*test Kruskala-Wallis odpowiednio p= 0,028; p=0,029*)
- Nosiciele allelu T rs9675320, allelu G rs16965880, mieli wyższe wartości BMI (*test Kruskala-Wallis odpowiednio p= 0,028; p= 0,016*)
- Nosiciele allelu G rs17708087, mieli wyższe stężenie cholesterolu frakcji HDL (*test Kruskala-Wallis p= 0,024*)
- Heterozygoty CT rs3176820, miały niższą frakcję wyrzutową lewej komory (*test Kruskala-Wallis p= 0,01*)

**Analiza wieloczynnikowa związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z wybranymi zmiennymi ciągłymi (model regresji liniowej)**

W modelu regresji liniowej genotyp TT rs9675320 korelował ze stężeniem glukozy ( $p=0,039$ ) i wiązał się z wyższym stężeniem glukozy ( $5,8 \pm 1,4$  vs  $5,0 \pm 1,5$  mmol/l) w porównaniu z genotypem CC.

**Tabela 21.** Analiza związku między przebyłym zawałem serca a stosowanym leczeniem farmakologicznym.

- **Wniosek:** W analizie jednoczynnikowej w grupie chorych po zawałe serca, częściej stosowane były: aspiryna ( $p=0,0003$ ), pochodne tienopirydyny ( $p=0,0018$ ), acenokumarol ( $p=0,034$ ), spironolakton ( $p=0,036$ ), azotany ( $p=0,0065$ )

Lek	Przebyty zawał serca				Wartość p	Brak danych
	tak		nie			
	stosowanie leku		stosowanie leku			
	tak	nie	tak	nie		
aspiryna	n = 142	n = 6	n = 121	n = 25	* $p=0,0003$ ** $p=0,0002$	n= 6; 2%
pochodne tienopirydyny	n = 63	n = 85	n = 37	n = 109	* $p=0,0018$ ** $p=0,0021$	n= 6; 2%
acenokumarol	n = 11	n = 137	n = 3	n = 149	* $p=0,034$ ** $p=0,051$	n= 6; 2%
statyny	n = 135	n = 13	n = 126	n = 20	* $p=0,18$ ** $p=0,20$	n= 6; 2%
inhibitory konwertazy	n = 116	n = 32	n = 109	n = 37	* $p=0,45$ ** $p=0,49$	n= 6; 2%
diuretyki pętlowe lub tiazydowe	n = 26	n = 122	n = 23	n = 123	* $p=0,68$ ** $p=0,76$	n= 6; 2%
spironolakton	n = 28	n = 120	n = 15	n = 131	* $p=0,036$ ** $p=0,047$	n= 6; 2%
beta-blokery	n = 128	n = 20	n = 117	n = 29	* $p=0,14$ ** $p=0,16$	n= 6; 2%
blokery kanału wapniowego	n = 24	n = 124	n = 31	n = 115	* $p=0,27$ ** $p=0,30$	n= 6; 2%
azotany	n = 76	n = 72	n = 52	n = 94	* $p=0,0065$ ** $p=0,007$	n= 6; 2%

\*test chi-kwadrat lub test Fishera; \*\* test trendu Cochran-Armitage;

**Tabela 22.** Analiza wieloczynnikowa związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z ryzykiem zawału serca, lokalizacją i stopniem nasilenia zmian miażdżycowych.

Polimorfizm	Zmienna kliniczna	Adjustacja względem	Iloraz szans (OR)	Wartość p 95% przedział ufności (CI)
rs17708087 A/G	ryzyko zawału serca	płci, wieku, palenia w wywiadzie, hipercholesterolemii, stosowania ASA, pochodnych tienopirydyny, acenokumarolu, azotanów	2,13	p= 0,01; CI 1,13-3,86
rs16965880 A/G	ryzyko zawału serca	rs17708087	-	p = 0,076 CI 0,95-2,68
rs3176820 C/T	ryzyko zmian, redukujących średnicę światła naczyń od 10 do 100%	płci, wieku	1,73	p= 0,0279 CI 1,06-2,80
rs3136685 A/G	światła naczyń od 10 do 100%	płci	-	p = 0,061 CI 0,30-3,37
rs3176823 C/T		płci, wieku	-	p= 0,09 CI 0,16-1,13
rs17708087 A/G	obecność zmian, redukujących średnicę światła naczyń od 50%	płci	0,63	p= 0,03; 0,42-0,96
rs3176823 C/T	obecność zmian, redukujących średnicę światła naczyń o 100%	płci, wieku	-	p= 0,09 CI 0,20-1,12
rs9675320 C/T		płci	1,79	p= 0,018; CI 1,1-2,92
rs2023906 A/G	ryzyko zmian wielonaczyniowych	płci	-	p= 0,19 CI 0,23-2,97
rs3136685 A/G	ryzyko zmian proksymalnych	płci	-	p=0,06 CI 0,97-2,44
rs3136685 A/G	ryzyko zmian dystalnych	płci	-	p= 0,11 CI 0,92- 2,28
rs3176818 A/G		płci, wieku	-	p= 0,06 CI 0,40-1,12

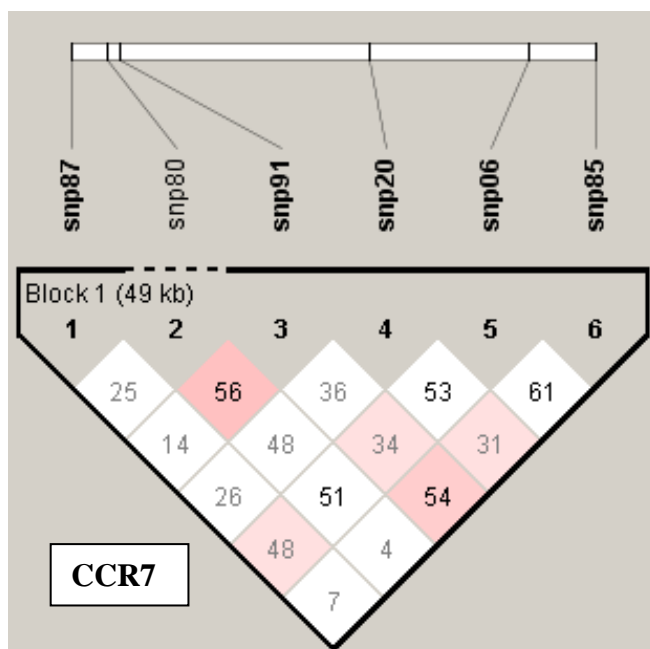


- **Wniosek:** W analizie wieloczynnikowej uwzględniającej oprócz samego polimorfizmu, wpływ płci, wieku, palenia w wywiadzie, hipercholesterolemii, stosowania ASA, pochodnych tienopirydyny, acenokumarolu, azotanów, przy mocy badania wystarczającej dla wykrycia wariantów zwiększających szansę zdarzenia 2-krotnie (iloraz szans, OR=2), istotny statystycznie pozostał związek pomiędzy allelem A rs17708087, a ryzykiem zawału serca.
- Przy założonej mocy badania, stwierdzone korelacje między: allelem A rs17708087, a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczynia powyżej 50% (p=0,03); allelem C rs9675320, a obecnością jakichkolwiek zmian miażdżycowych (p=0,028), allelem C rs9675320, a przewlekłą niedrożnością naczynia (p=0,018), są prawdopodobnie przypadkowe.
- Odstąpiono od analizy wieloczynnikowej związku polimorfizmów genu CCR7 i CCL 19, z wybranymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, objawami i chorobami towarzyszącymi, ze względu na nierównowagę liczebności porównywanych grup i niepełne dane o częstości badanej cechy klinicznej.

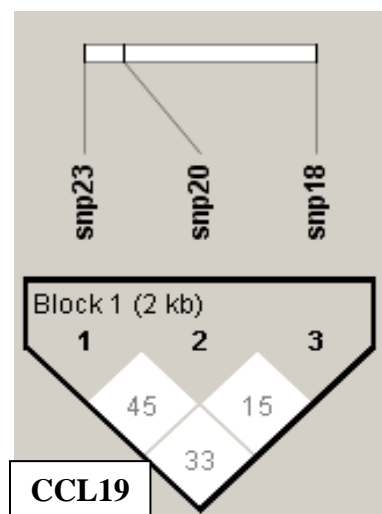
## Analiza haplotypów

Badane polimorfizmy genu CCR7 i CCL19 znajdowały się w obszarze stosunkowo słabej nierównowagi sprzężeń, co powoduje brak możliwości wyodrębnienia bloku haplotypowego (rycina 8,9). Dla zademonstrowania możliwości metody przeprowadzono analizę wymuszonego haplotypu na bazie polimorfizmów genu CCR7.

**Rycina 8,9.** Mapa nierównowagi sprzężeń (Linkage Disequilibrium-plot) polimorfizmów genu CCR7 i CCL19. Podano wartości współczynnika korelacji Lewontin's D prime ( $D' \cdot 100\%$ ).



snp87 = rs17708087,  
snp80 = rs16965880,  
snp91 = rs645991,  
snp20 = rs9675320,  
snp06 = rs2023906,  
snp85 = rs3136685,  
snp23 = rs3176823,  
snp20 = rs3176820,  
snp18 = rs3176818).



**Tabela 23,24.** Częstość występowania haplotypów CCR7 i CCL19.

Zaobserwowano różnicę w częstości występowania poszczególnych haplotypów genu CCR 7 oraz CCL19 w ocenianej populacji i wzorcowej populacji projektu HapMap (faza 3) [18].

CCR7	snp87	snp91	snp20	snp06	snp85	częstość
1	A	C	T	A	G	18,5%
2	G	C	T	A	G	14,3%
3	A	T	T	A	G	10,8%
4	G	T	T	G	G	10,2%
5	G	T	T	A	G	9,9%
6	G	C	T	G	G	5,8%
7	A	C	C	A	A	4,4%
8	G	C	T	A	A	3,7%
9	G	C	C	A	A	3,4%
						R=81%

CCL19	snp23	snp20	snp18	częstość
1	C	T	A	56,5%
2	C	C	A	18%
3	C	T	G	15,9%
4	T	T	A	4,5%
5	C	C	G	3,6%
				R=98,5%

**Tabela 25.** Testy permutacji wybranych genotypów i haplotypów CCR7 z ryzykiem zawału serca.

haplotyp	wartość p permutacji	haplotyp	wartość p permutacji
ATTAG	0,59	GCCAA	0,99
ACCAA	0,97	GTTGG	1,00
GTTAG	0,97	ACTAG	1,00
GCTGG	0,99	GCTAG	1,00
GCTAA	0,99		

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

W niniejszej pracy badano, czy polimorfizmy w genach dla CCR7 i CCL19 oraz skonstruowane na ich bazie haplotypy, mają wpływ na rozwój, nasilenie, lokalizację zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych i ryzyko zawału serca, u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, u których wykonano koronarografię w trybie planowym. Oceniano również wpływ polimorfizmów na częstość występowania wybranych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, objawów i chorób towarzyszących.

**W analizie jednoczynnikowej** obserwowano związek między:

- allelem A rs16965880 (CCR7), a ryzykiem zawału serca (*test trendu*  $p=0,034$ , *dominujący allel A*  $p=0,044$ )
- allelem A rs17708087 (CCR7), a ryzykiem zawału serca (*model addytywny*  $p=0,01$ , *test trendu*  $p=0,025$ , *dominujący allel A*  $p=0,003$ )
- allelem A rs3136685 (CCR7), a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczyń od 10 do 100% (*model addytywny*  $p=0,033$ , *test trendu*  $p=0,049$ , *dominujący allel A*  $p=0,027$ )
- allelem C rs3176823 (CCL19), a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczyń od 10 do 100% (*test trendu*  $p=0,039$ , *dominujący allel C*  $p=0,039$ )
- allelem A rs17708087 (CCR7), a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczyń powyżej 50% (*dominujący allel A*  $p=0,015$ )
- allelem C rs3176823 (CCL19), a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczyń powyżej 50% (*test trendu*  $p=0,034$ , *dominujący allel C*  $p=0,034$ )
- allelem C rs9675320 (CCR7), a przewlekłą niedrożnością naczyń (*model addytywny*  $p=0,034$ , *test trendu*  $p=0,02$ , *dominujący allel C*  $p=0,013$ )
- allelem A rs16965880 (CCR7), a przewlekłą niedrożnością naczyń (*test trendu*  $p=0,025$ , *dominujący allel A*  $p=0,038$ )
- allelem T rs3176820 (CCL19), a przewlekłą niedrożnością naczyń (*model addytywny*  $p=0,022$ , *dominujący allel A*  $p=0,014$ )
- allelem G rs2023906 (CCR7), a obecnością zmian wielonaczyniowych (*model addytywny*  $p=0,04$ , *dominujący allel A*  $p=0,013$ )
- allelem G rs3136685 (CCR7), a obecnością zmian w proksymalnych odcinkach tętnic (*dominujący allel A*  $p=0,024$ )

- allelem G rs3136685 (CCR7), a obecnością zmian w dystalnych odcinkach tętnic (*dominujący allele A p= 0,042*)
- allelem A rs3176818 (CCL19), a obecnością zmian w dystalnych odcinkach tętnic (*model addytywny p=0,04; dominujący allele A p= 0,048*)
- allelem T rs9675320 (CCR7), a obecnością otyłości (*test trendu p = 0,032, dominujący allele T p= 0,029*)
- allelem T rs645991 (CCR7), a obecnością otyłości (*dominujący allele C p= 0,022*)
- allelem T rs9675320 (CCR7), a obecnością zaburzeń rytmu serca (*dominacja allelu C p= 0,028*)
- allelem C rs3176820 (CCL19), a obecnością zaburzeń rytmu serca (*model addytywny p=0,018, dominacja allelu T p= 0,014*)
- allelem T rs3176820 (CCL19), a obecnością migotania przedsionków (*model addytywny p=0,014; dominacja allelu T p=0,01*)
- allelem G rs3176818 (CCL19), a obecnością dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku choroby niedokrwiennej serca (*model addytywny p=0,046, test trendu p=0,013, dominujący allele G p=0,012*)
- allelem G rs3136685 (CCR7), a obecnością chromania przestankowego (*model addytywny p= 0,02, test trendu p= 0,032, dominujący allele A p=0,01*)
- allelem A rs17708087 (CCR7), a obecnością chromania przestankowego (*model addytywny p= 0,024*)
- allelem G rs2023906 (CCR7), a obecnością dolegliwości dławicowych w klasie CCS II/III-IV (*model addytywny p= 0,002, test trendu p=0,027, dominacja allelu A p=  $8 \times 10^{-4}$* )
- allelem A rs2023906 (CCR7), a stężeniem glukozy (*test Kruskala-Wallis p=0,029*)
- allelem T rs9675320 (CCR7), a stężeniem glukozy (*test Kruskala-Wallis (p= 0,028)*)
- allelem T rs9675320 (CCR7), a wartością BMI (*test Kruskala-Wallis p= 0,028*)
- allelem G rs16965880 (CCR7), a wartością BMI (*test Kruskala-Wallis p= 0,016*)
- allelem G rs17708087 (CCR7), a stężeniem HDL (*test Kruskala-Wallis p= 0,024*)
- genotypem CT rs3176820 (CCL19), a frakcją wyrzutową lewej komory (*test Kruskala-Wallis p= 0,01*)

**Analiza wieloczynnikowa** uwzględniająca jako zmienne niezależne: płeć, wiek, palenie w wywiadzie, hipercholesterolemię, stosowanie ASA, pochodnych tienopirydyny, acenokumarolu, azotanów, wykazała, że allel A rs17708087, jest niezależnym czynnikiem ryzyka zawału serca ( $p=0,01$ ). Obecność genotypu AA rs17708087 zwiększała ponad 2-krotnie szanse wystąpienia zawału serca (iloraz szans - OR 2,13, przedział ufności - CI 1,13-3,86). Częstość występowania 1 lub więcej kopii allelu A wśród pacjentów, którzy przeżyli zawał serca wynosiła 75,5%, a w grupie kontrolnej 59%.

W modelu regresji liniowej genotyp TT rs9675320 korelował ze stężeniem glukozy ( $p=0,039$ ) i wiązał się z wyższym stężeniem glukozy ( $5,8 \pm 1,4$  vs  $5,0 \pm 1,5$  mmol/l) w porównaniu z genotypem CC.

Analizy związku (association study, case-control study) stanowią najczęstszy typ badań nad podłożem genetycznym powszechnych chorób układu krążenia. Stosowane kryteria wiarygodności badań i wiarygodności związku polimorfizmu z ryzykiem sercowo-naczyniowym, zmniejszają ryzyko poważnych błędów metodologicznych [30,33,121].

Kryteria wiarygodności badań obejmują: dobrze zdefiniowany fenotyp, postawienie hipotezy i przeprowadzenie analizy mocy statystycznej badania a priori, dużą liczebność badanej grupy, biologiczną wiarygodność hipotezy, powtórzenie wyników w różnych populacjach oraz w badaniach rodzinnych, przy zastosowaniu polimorfizmów, zlokalizowanych w tym samym genie [121].

Kryteria wiarygodności korelacji polimorfizmu z ryzykiem sercowo – naczyniowym obejmują: ściśle zdefiniowanie fenotypu, odpowiednią moc statystyczną badania, wykluczenie wpływu czynników zakłócających, wykazanie funkcjonalności polimorfizmu in vitro oraz in vivo [121]. Wyniki mojej pracy przedstawiam w kontekście wymienionych kryteriów.

### **Kryteria wiarygodności badania - zdefiniowanie fenotypu**

Miażdżyca jest chorobą złożoną, wywoływaną przez liczne czynniki genetyczne, środowiskowe oraz ich wzajemne interakcje [6,7,76]. Patofizjologicznie stanowi zbiór wielu procesów takich jak: dysfunkcja śródbłonna, zapalenie, reakcje immunologiczne, zaburzenia układu krzepnięcia [76,79]. Jako proces ogólnoustrojowy, obejmuje niemal wszystkie łożyska naczyniowe, w tym wieńcowe i mózgowie, prowadząc do zaburzenia perfuzji zaopatrywanych narządów.

Choroba naczyń wieńcowych jest główną przyczyną choroby niedokrwiennej serca. Manifestacja kliniczna niedokrwienia mięśnia sercowego jest złożona - obejmuje zarówno stabilną dławicę piersiową jak i ostre zespoły wieńcowe i nagły zgon sercowy; niedokrwienie może również pozostać nieme klinicznie [7].

W diagnostyce choroby niedokrwiennej serca, obok objawów podmiotowych, kluczową rolę odgrywają badania obciążeniowe, umożliwiające wykrycie niedokrwienia mięśnia sercowego w trakcie wysiłku oraz badania obrazowe (koronarografia lub tomografia naczyń wieńcowych), które pozwalają na ocenę morfologii tętnic wieńcowych [73]. Liczne badania nad uwarunkowaniami genetycznymi choroby niedokrwiennej serca, nie uwzględniają w kryteriach włączenia do badania, oceny angiograficznej tętnic wieńcowych, opierając się wyłącznie na wynikach prób obciążeniowych lub w przypadku ostrego zespołu wieńcowego na stwierdzeniu obecności biomarkerów martwicy mięśnia sercowego we krwi [29,39]. Takie podejście, wiąże się z ryzykiem pominięcia, istotnych zmian miażdżycowych, ze względu na ograniczoną czułość badań obciążeniowych, która w przypadku elektrokardiograficznego testu wysiłkowego wynosi jedynie 68% oraz pominięcia zmian nieistotnych hemodynamicznie, które ze względu na brak manifestacji klinicznej, są możliwe do wykrycia jedynie w badaniach obrazowych [122]. Badania nad naturalnym przebiegiem miażdżycy tętnic wieńcowych, wykazują, że za znaczną część przypadków ostrych zespołów wieńcowych, odpowiada progresja zmian pierwotnie nieistotnych hemodynamicznie [123].

Najczęściej stosowanymi wskaźnikami zaawansowania miażdżycy i ryzyka niedokrwienia w ocenie angiograficznej są: stopień redukcji światła naczynia, lokalizacja i morfologia zmian miażdżycowych oraz liczba zajętych naczyń. W licznych badaniach za istotne hemodynamicznie, uznawano zmiany, powodujące redukcję światła naczynia o 70%, a w przypadku pnia lewej tętnicy wieńcowej, redukujące światło o 50% [124,125]. Aktualne zalecenia Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, obok stopnia redukcji światła naczynia (o ponad 50%), za kluczowe uznają, udokumentowanie niedokrwienia badaniami nieinwazyjnymi lub wykazanie istotnego zmniejszenia rezerwy wieńcowej metodą FFR (fractional flow reserve) [73].

Wykorzystana w badaniu baza danych klinicznych, opiera zasady rozpoznawania poszczególnych chorób, czynników ryzyka, a także zasady oceny koronarografii, o aktualne standardy postępowania Polskich Towarzystw Naukowych [3,112,113].

Do badania włączono 300 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do planowej koronarografii, w oparciu o objawy podmiotowe oraz wynik badań obciążeniowych. Obecność zmian miażdżycowych w koronarografii stwierdzono u 87,7% badanych; częstość występowania zmian redukujących światło naczynia o więcej niż 50%, wynosiła 81%, a zmian powodujących przewlekłą niedrożność naczynia 63,3%. Najczęstszą lokalizację anatomiczną stanowiła gałąź międzykomorowa przednia - 99% badanych, prawa tętnica wieńcowa - 81%, gałąź okalająca - 71,7% oraz pień lewej tętnicy wieńcowej - 13,3%. Nie obserwowano istotnej różnicy w częstości występowania zmian, pomiędzy odcinkami proksymalnymi i dystalnymi tętnic wieńcowych. Częstość występowania choroby jednonaczyniowej wynosiła 32,4%, dwunaczyniowej - 25%, a wielonaczyniowej - 29,6%.

Analizowano wpływ wybranych SNP na obecność zmian miażdżycowych o różnym stopniu redukcji światła naczynia, liczbę zajętych naczyń oraz lokalizację zmian w odcinkach proksymalnych i dystalnych. W analizie wieloczynnikowej polimorfizm rs17708087 korelował z obecnością zmian istotnych hemodynamicznie ( $\geq 50\%$  i  $70\%$ ), a polimorfizm rs9675320 z przewlekłą niedrożnością naczynia. Mimo istotnej statystycznie wartości p, obliczony iloraz szans dla stwierdzonych asocjacji, był niższy niż od mocy badania. Żaden z polimorfizmów nie wykazywał związku z liczbą zajętych naczyń oraz lokalizacją zmian w odcinkach proksymalnych.

Przebyte zawału serca przed przyjęciem do szpitala stwierdzono u 50,3% badanych. W analizie wieloczynnikowej polimorfizm rs17708087 pozostawał niezależnym czynnikiem przebytego ryzyka zawału serca.

### **Kryteria wiarygodności badania - hipoteza a priori**

Hipoteza robocza zakłada, że polimorfizmy w genach dla CCR7 oraz CCL19 lub skonstruowane na ich bazie haplotypy (zestawy alleli), mają wpływ na rozwój, nasilenie i lokalizację zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, poprzez zmianę poziomu ekspresji lub funkcji białek regulujących zawartość komórek dendrytycznych w blaszce miażdżycowej. Badane polimorfizmy mogą determinować typ zmiany, stopień krytyczności zwężenia i pośrednio stabilność blaszki miażdżycowej.



## **Kryteria wiarygodności badania - liczebność badanej grupy i analiza mocy statystycznej badania a priori**

Prawdopodobieństwo wykrycia związku między danym allelem genu kandydata a chorobą zależy m.in. od częstości występowania allela i stopnia jego powiązania z chorobą [14,15]. Szacuje się, że dla osiągnięcia odpowiedniej mocy badania, niezbędnej dla wykrycia częstych wariantów (tj. obecnych u powyżej 5% populacji), które zwiększają ryzyko o 10-50% (OR 1,1-1,5), niezbędne jest przeprowadzanie badań z udziałem tysięcy chorych [31]. Badanie WTCCC, które wykryło polimorfizmy rejonu 9p21 (OR 1,3, częstość allelu ryzyka 46%) obejmowało 5000 osób [35]. Warianty wiążące się z wyższym ilorazem szans, wymagają odpowiednio niższej liczebności analizowanej grupy. W projekcie doktoratu wykorzystano DNA oraz bazę danych klinicznych obejmującą 300 pacjentów, założona moc badania jest wystarczająca dla wykrycia wariantów zwiększających szansę zdarzenia 2-krotnie (OR=2). Przy założonej mocy badania, stwierdzone w analizie wieloczynnikowej korelacje między: allelem A rs17708087, a obecnością zmian redukujących średnicę światła naczyń powyżej 50%; allelem C rs9675320, a obecnością jakichkolwiek zmian miażdżycowych, allelem C rs9675320, a przewlekłą niedrożnością naczyń (p=0,018), są prawdopodobnie przypadkowe.

## **Kryteria wiarygodności badania -biologiczna wiarygodność hipotezy**

Niewątpliwie w rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych i jej powikłań, czynniki genetyczne mają istotne znaczenie. Szacuje się, że 35 najlepiej udokumentowanych polimorfizmów odpowiada jedynie za ok. 13 procent dziedziczności choroby niedokrwiennej serca [33]. Ludzki genom zawiera ok. 10 milionów SNP, liczbę polimorfizmów etykietujących szacuje się na 500.000-1000.000 [18]. Badanie genów kandydatów, w przeciwieństwie do badań typu GWAS, pozwala na ocenę jedynie drobnego fragmentu materiału genetycznego, dlatego kluczowy jest wybór genu i jego polimorfizmów w oparciu o przesłanki patofizjologiczne.

Wyboru genu kandydata (CCR 7 i CCL 19) dokonano a priori, w oparciu o dane literaturowe na temat roli komórek dendrytycznych w miażdżycy tętnic wieńcowych [90-92,109-111]. Istnieją przesłanki wskazujące na zarówno na ich pro-, jak i przeciwmiażdżycowe działanie u człowieka [92-109-111].

W zwierzęcym modelu miażdżycy, w którym uzyskano regresję miażdżycy, komórki piankowe blaszki miażdżycowej, nabywały cech komórek dendrytycznych i migrowały z ładunkiem cholesterolu do węzłów chłonnych, co prowadziło do regresji blaszki miażdżycowej. W tym procesie dochodziło do silnej indukcji genu CCR7 [111].

### **Kryteria wiarygodności badania - powtórzenie wyników badania w różnych populacjach i w badaniach w modelu rodzinnym**

Brak jest danych literaturowych o badaniu w modelu rodzinnym, w którym oceniano by związek polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 z miażdżycą tętnic wieńcowych [126].

Możliwe jest, że ryzyko rozwoju zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych zwiększają inne polimorfizmy, będące w nierównowadze sprzężeń z badanym SNP. Zwiększenie gęstości markerów w sąsiedztwie rs17708087 może pozwolić na ich wykrycie.

Dominującym obecnie modelem badań nad podłożem genetycznym chorób złożonych, są Genome Wide Association Studies, które ze względu na wysoką cenę trudno zastosować w Polsce. Szacunkowy koszt genotypowania 500000 SNP z zastosowaniem mikromacierzy, w chwili planowania badania wynosił 1000 dolarów na pacjenta [23]. W największych opublikowanych badaniach GWAS, zdolnych do wykrycia polimorfizmów związanych ze wzrostem ryzyka sercowo-naczyniowego o 5%, dotychczas nie opisywano roli polimorfizmów genu CCR7 i CCL19 [26-28, 33]. Potwierdzenie roli większości opisywanych w literaturze polimorfizmów, w badaniach przeprowadzonych w innych ośrodkach, napotyka trudności, ze względu na różnie definiowany fenotyp choroby niedokrwiennej serca, znaczne zróżnicowanie badanych populacji oraz problemy w publikacji wyników negatywnych (publication bias) [14,121].

Dane z projektu HapMap wskazują, że częstość występowania badanych alleli różni się zależnie od rasy np. allel A polimorfizmu rs17708087 występuje w populacji zachodnioeuropejskiej z częstością 76%, chińskiej 93%, a w nigeryjskiej 100% [18]. Znaczenie tej zmienności jest nieznane. Badana przeze mnie grupa była jednorodna etnicznie. Zaobserwowana różnica w częstości występowania poszczególnych haplotypów genu CCR 7 i CCL19 w badanej populacji i wzorcowej populacji projektu HapMap (faza 3), jest prawdopodobnie wynikiem odmienności genetycznej obu populacji [18].

Powtórzenie badania w innych populacjach może również zredukować wpływ czynników zakłócających nie uwzględnianych w badaniu, takich jak: wzorce zachowań, tryb życia i sposób odżywiania się.

## **Kryteria wiarygodności badania - wykluczenie wpływu czynników zakłócających**

Badanie jest oparte na wstecznej analizie danych rejestrowych, co wiąże się z typowymi ograniczeniami dla badań retrospektywnych, jak preselekcja chorych w grupie badanej, brak części danych dotyczących analizowanych przypadków [3].

Do badania włączono chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do koronarografii w trybie planowym. Z badania wyłączono chorych po pomostowaniu aortalno-wieńcowym, ze względu na zmienioną anatomie krążenia wieńcowego i prawdopodobne odmienne czynniki determinujące progresję miażdżycy w tej grupie. Kryterium wykluczenia stanowiła również konieczność wykonania badania w trybie pilnym, z powodu zawału serca. Ciężkie dolegliwości dławicowe w klasie CCS III/IV i IV, charakterystyczne dla niestabilnej dławicy piersiowej, występowały u 13,4 %, przyjętych planowo chorych.

Istotnym ograniczeniem koronarografii jest możliwość oceny wyłącznie zmian miażdżycowych, redukujących światło naczynia. Zmiany powodujące ekscentryczny remodelling naczynia, bez redukcji jego światła pozostają nieme angiograficznie, dlatego nie mogą zostać ujęte w badaniu. Nowe metody diagnostyczne jak ultrasonografia wewnątrzwieńcowa (IVUS) i optyczna koherentna tomografia (OCT), umożliwiają ocenę ściany naczynia, jednak ze względu na koszt i bezpieczeństwo nie są rutynowo stosowane [5].

Częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy w badanej populacji jest zbliżona, do obserwowanej w innych badaniach. Populacja rejestru jest w znacznym stopniu obciążona hipercholesterolemią, występującą u 78% badanych, nadciśnieniem tętniczym - 76,3%, otyłością - 37%, występowaniem palenia w wywiadzie – 46,5%. Tak duża częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy była obserwowana m.in. w badaniu Dandona i wsp., w którym wykazano, że polimorfizm rejonu 9p21, wpływa na obecność zaawansowanych zmian w koronarografii - choroby trójnaczyniowej oraz zajęcia pnia lewej tętnicy wieńcowej [41]. W badaniu WOBASZ dotyczącym rozpowszechnienia czynników ryzyka miażdżycy w populacji Małopolski, przeprowadzonym wśród mężczyzn i kobiet w wieku 20–74 lat, hipercholesterolemia występowała u 68% mężczyzn i 61% kobiet, nadciśnienie tętnicze – 44 i 32%, otyłość 23,8 i 27,5%, palenie 45 i 25% [127-130].

Średnia wieku w badanej populacji wynosząca 60 lat, jest wyższa w porównaniu z większością badań nad podłożem genetycznym choroby niedokrwiennej serca, np. w badaniu INTERHEART wynosiła 55 lat, WTCC 49,8 lat [28,29].

Przedwczesne występowanie w rodzinie, chorób układu sercowo-naczyniowego, jest w znacznym stopniu uwarunkowane genetycznie [9]. Za koniecznością odnoszenia wyników badań do wieku populacji, przemawia choćby obserwacja, że zmienność w obrębie rejonu 9p21, silniej koreluje z obecnością zaawansowanych zmian w koronarografii, u chorych poniżej 56 roku życia, w porównaniu z grupą o średniej wieku 70 lat [41]. Wpływ czynników zakłócających takich jak: wzorce zachowań, tryb życia i sposób odżywiania się, nie był uwzględniany w badaniu.

Grupę kontrolną dla poszczególnych analiz wyodrębniono w oparciu o takie zmienne jak: przebyty zawał serca (tabela 4), lokalizacja i zaawansowanie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych (tabela 5-10), występowanie wybranych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, objawów i chorób towarzyszących (tabela 11-19). Charakterystyka grupy kontrolnej może różnić się od populacji osób zdrowych, ponieważ obejmuje pacjentów, u których objawy i nieprawidłowości w badaniach obrazowych były przyczyną skierowania pacjentów do diagnostyki inwazyjnej choroby niedokrwiennej serca, a częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy wyższa, niż w badaniu WOBASZ [73].

W analizie jednoczynnikowej, stwierdzono 13 asocjacji pomiędzy badanymi polimorfizmami, a ryzykiem zawału serca lub zaawansowaniem zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych, spośród których jedynie 4 pozostały istotne statystycznie w analizie wieloczynnikowej. Były nimi - związek pomiędzy allelem A rs17708087, a ryzykiem zawału serca; allelem A rs17708087, a obecnością zmian  $\geq 50\%$ ; allelem C rs9675320, a obecnością zmian  $\geq 50\%$  i niedrożnością naczynia. Moc statystyczna badania była wystarczająca jedynie dla wykrycia korelacji pomiędzy allelem A rs17708087, a ryzykiem zawału serca. Nie można wykluczyć, że obserwowane w analizie wieloczynnikowej asocjacje, są wynikiem rzeczywistych różnic w zakresie niektórych cech fenotypowych, pomiędzy badaną grupą a grupą kontrolną, które nie zostały uwzględnione w rejestrze. Część osób w grupie kontrolnej może być nosicielami alleli ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Do ujawnienia się fenotypu nie dochodzi z powodu braku obecności innych alleli ryzyka, równoważenia wpływu przez allele o znaczeniu ochronnym, niepełnej penetracji genu, różnic w narażeniu na wpływy środowiska [14]. Na zmniejszenie wiarygodności analizy wieloczynnikowej wpływa również: nierównowaga liczebności porównywanych grup i brak pełnych danych o częstości badanej cechy klinicznej w części populacji.

Każda z zastosowanych metod laboratoryjnych ma szereg ograniczeń, które decydują o wiarygodności genotypowania. W przypadku reakcji PCR, ryzyko wyników fałszywie dodatnich niesie kontaminacja materiału; ryzyko wyników fałszywie ujemnych powoduje zanieczyszczenie próbek inhibitorami reakcji, użycie niewłaściwych odczynników oraz nieoptymalne warunki reakcji. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) obok ograniczeń typowych dla PCR, w przypadku nieoptymalnych warunków trawienia, stwarza ryzyko wykrycia fałszywych heterozygot. Hybrydyzacja typu "reverse dot blot" wymaga precyzyjnego doboru warunków dla reakcji wiązania produktu PCR z sondą, reakcji chemiluminescencji oraz detekcji [131-133]. Dla wykluczenia zanieczyszczenia, w badaniu stosowano kontrolę negatywną oraz kontrolowano jakość produktu PCR metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Również zachowanie równowagi Hardy'ego-Weinberga dla genotypów badanych polimorfizmów z okolic locus genu CCR7 i CCL19, przemawia przeciw wystąpieniu istotnego błędu laboratoryjnego [16].

### **Kryteria wiarygodności badania - funkcjonalność *in vitro* polimorfizmów**

Poznanie mechanizmu w którym polimorfizm pojedynczego nukleotydu wywołuje efekt biologiczny jest jednym z kryteriów wiarygodności korelacji SNP z ryzykiem sercowo-naczyniowym. Wpływ polimorfizmu na czynność genu, jest analogiczny do roli mutacji punktowej o typie substytucji. Obecność polimorfizmu lub mutacji w sekwencjach kodujących genu może prowadzić do zmiany struktury białka i jego funkcji; a w przypadku sekwencji regulatorowych, konsekwencją może być zmiana poziomu ekspresji genu. W hipercholesterolemii rodzinnej, będącej monogenowym modelem miażdżycy, konsekwencją mutacji w genach kluczowych dla metabolizmu lipidów, jest obserwowany *in vitro* szereg patologii receptora dla LDL m.in. upośledzenie wiązania ligandu, zwiększona degradacja lub upośledzona endocytoza receptora [11,134].

Wszystkie oceniane w badaniu polimorfizmy znajdują się poza sekwencjami kodującymi genów. W sekwencjach niekodujących genu CCR 7 znajdują się rs2023906 i rs3136685, w sąsiedztwie loci CCR 7 - rs17708087, rs16965880, rs645991, rs9675320, a w sąsiedztwie loci CCL19 - rs3176818, rs3176820, rs3176823. Sekwencje niekodujące, uważane przez długi okres czasu za „śmieciowe DNA”, według nowych badań odgrywają rolę w organizacji chromatyny, składaniu genu (splicing), wiązaniu czynników transkrypcyjnych, funkcjonowaniu transpozonów typu LINEs i SINEs (long/short interspersed nucleotide elements) [135,136].

Trudność w znalezieniu mechanizmu wpływu wariantów genu na rozwój miażdżycy, jest typowa dla badań nad podłożem genetycznym chorób złożonych. Większość polimorfizmów odkrytych w badaniach GWAS nie wykazuje związku z konkretnym mechanizmem patofizjologicznym, który tłumaczyłby zwiększone ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca [33]. Również korelacja między opisywanymi SNP a poziomem ekspresji genów w komórkach jest niska [137].

Nie można również wykluczyć, że znaczenie biologiczne wykazuje inny polimorfizm sprzężony z rs17708087 oraz rs9675320 [138].

Wpływ polimorfizmu na funkcję genu receptora chemokinowego CCR7, mogą wyjaśnić badania czynnościowe *in vitro*, przeprowadzone w kolejnych badaniach [27]. W ocenie zmian w ekspresji genu, mogą znaleźć zastosowanie liczne metody np. „run-on” identyfikująca geny transkrybowane w danym momencie, badania sekwencji regulatorowych, badania wiązania białek regulatorowych (np. test opóźnionej migracji w żelu, analiza śladów z użyciem DNAzy I, test modyfikacji z użyciem czynnika metylującego), hybrydyzacja *in situ* z antysensownym RNA, Real-Time PCR, ilościowy PCR, translacja *in-vitro*, metoda typu Western, immunodetekcja, immunocytochemia, metoda phage display [139-141].

### **Kryteria wiarygodności badania -funkcjonalność *in vivo* polimorfizmów**

Badania GWAS wskazują na znaczenie dla rozwoju choroby niedokrwiennej serca polimorfizmów chromosomu 9 (rs579459, rs4977574) i chromosomu 17 (rs216172, rs12936587, rs46522), w sąsiedztwie których znajduje się gen dla CCR 7 i CCL 19 (9p13.3) [26-28, 33].

Uzyskane wyniki sugerują, że polimorfizm rs17708087 z okolic locus genu CCR7, wpływa na rozwój i nasilenie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych. Dane literaturowe sugerują, że receptor CCR7 może modyfikować liczne efekty biologiczne, w tym chemotaksję komórek dendrytycznych i makrofagów, rozwój procesu zapalnego w ścianie tętnic, w ten sposób wpływając na rozwój i nasilenie miażdżycy [88,111]. Nie można wykluczyć, że rs17708087 może wpływać na ryzyko rozwoju miażdżycy przez inne mechanizmy niż immunologiczne, jak np. poziom nasilenia klasycznych środowiskowych czynników ryzyka lub odpowiedzi na nie. W analizie wieloczynnikowej allel T rs9675320 korelował ze stężeniem glukozy ( $p=0,039$ ) oraz granicznie z wartością BMI ( $p=0,06$ ), a allel G rs17708087 ze stężeniem HDL ( $p=0,024$ ).

Nie wykazano jednak wpływu allelu T rs9675320 na ryzyko zawału serca oraz lokalizację i nasilenie zmian miażdżycowych w angiografii tętnic wieńcowych. Badania nad loci cech ilościowych (QTL Quantitative Trait Loci) m.in. stężenia lipidów (opisano dotychczas 95 QTL), wysokości ciśnienia tętniczego (opisano 43 QTL), wykazują sygnały sprzężenia również w sąsiedztwie genów dla CCR 7 i CCL 19 [46,47].

Badane polimorfizmy, w analizie wieloczynnikowej nie wykazywały związku, z obecnością choroby wielonaczyniowej i występowaniem zmian w proksymalnym odcinku naczyń wieńcowych (w tym pniu lewej tętnicy wieńcowej), w których preferowaną metodą leczenia jest pomostowanie aortalno-wieńcowe [73]. Genotypowanie rs17708087 nie pomaga więc w wyborze metody rewaskularyzacji.

Częste współistnienie zaawansowanej miażdżycy w wielu łożyskach tętniczych, u jednego chorego, stanowi przesłankę nad rozszerzeniem badania nad rolą polimorfizmów CCR7 i CCL19 w rozwoju miażdżycy wielopoziomowej [142]. W przypadku polimorfizmów rejonu 9p21, obserwowano związek z ryzykiem występowania choroby niedokrwiennej serca, jak i tętniaka aorty brzusznej i udaru niedokrwiennego mózgu [143].

### **Znaczenie badań**

Badanie sugeruje, że polimorfizm rs17708087 genu CCR 7 jest potencjalnym czynnikiem ryzyka miażdżycy tętnic wieńcowych. Określenie z większą precyzją grupy osób, obciążonych zwiększonym ryzykiem, pozwala na wyprzedzenie wystąpienia powikłań odpowiednimi działaniami prozdrowotnymi. Testy genetyczne niosą ze sobą niewielkie ryzyko powikłań i są akceptowane przez większość pacjentów. Malejący koszt genotypowania, daje nadzieję na włączenie testów genetycznych do standardowego panelu diagnostycznego. W ostatnich latach odkryto szereg polimorfizmów modyfikujących całkowite ryzyko sercowo-naczyniowe, jednak nieliczne pozwalają na zwiększenie skuteczności dotychczasowych skal ryzyka opartych na parametrach klinicznych i biochemicznych [53,55,17]. Dalsze analizy mogą wykazać czy włączenie polimorfizmów genu CCR7 w obecne skale ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych i jej powikłań, pozwoli na zwiększenie ich zdolności predykcyjnej. Potrzebne są również dalsze badania funkcjonalne komórek dendrytycznych, limfocytów T oraz substancji modyfikujących ich działanie. Potwierdzenie roli genu CCR7 w miażdżycy tętnic wieńcowych, może doprowadzić w dłuższym czasie, do rozwoju nowych terapii.

## WNIOSKI

1) W populacji pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do planowej koronarografii, w oparciu o objawy podmiotowe oraz wynik badań obciążeniowych, obecność allelu A polimorfizmu rs17708087, w genie receptora chemokinowego CCR7, stanowi niezależny czynnik ryzyka zawału serca, po uwzględnieniu płci, wieku, palenia w wywiadzie, hipercholesterolemii oraz stosowanej farmakoterapii choroby niedokrwiennej serca. Obecność genotypu AA zwiększa 2-krotnie szanse wystąpienia zawału serca w badanej populacji.

2) Nie stwierdzono związku między polimorfizmami genu receptora chemokinowego CCR7 oraz chemokiny CCL19, a lokalizacją i nasileniem zmian miażdżycowych w angiografii tętnic wieńcowych.

3) Obecność genotypu TT polimorfizmu rs9675320 w genie dla receptora chemokinowego CCR7, wiąże się z wyższym stężeniem glukozy w badanej populacji.

4) Dalsze analizy mogą wykazać czy włączenie polimorfizm rs17708087 w obecnie stosowane skale ryzyka sercowo-naczyniowego, pozwoli na zwiększenie ich zdolności predykcyjnej.

5) Badaną populację cechuje znaczna częstość występowania zaawansowanych zmian miażdżycowych - przewlekłej niedrożności naczyń oraz choroby wielonaczyniowej. Najczęstszą lokalizacją anatomiczną zmian stanowi gałąź międzykomorowa przednia.



## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Celem badania było poszukiwanie związku między polimorfizmami genu receptora chemokinowego CCR7 oraz ligandu CCL19 z obrazem angiograficznym miażdżycy tętnic wieńcowych oraz ryzykiem zawału serca w populacji małopolskiej.

**MATERIAŁ I METODY.** Analizowano materiał genetyczny 300 chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do planowej koronarografii. Metodą hybrydyzacji „dot blot” oraz RFLP wykonano genotypowanie 9 polimorfizmów etykietujących. Analizę statystyczną dla zbadania zależności genotypów z chorobą, przeprowadzono dla modelu addytywnego, recesywnego i dominującego z zastosowaniem testu  $\chi^2$ , testu Fishera, testu trendu Cochran-Armitage. W analizie wieloczynnikowej stosowano model regresji liniowej i regresji logistycznej.

**WYNIKI.** Częstość występowania 1 lub więcej kopii allelu A rs17708087 wśród pacjentów, którzy przebyli zawał serca, była znamienne wyższa (75,5%) niż w grupie kontrolnej (59%),  $p=0,01$ . U pacjentów będących homozygotami AA rs17708087 ryzyko wystąpienia zawału serca było ponad 2-krotnie większe (OR 2,13, CI 1,13-3,86). Nie stwierdzono związku między badanymi polimorfizmami a lokalizacją i nasileniem zmian miażdżycowych w koronarografii.

**WNIOSKI.** Wyniki badania sugerują, że polimorfizm rs17708087 jest potencjalnym czynnikiem ryzyka zawału w populacji małopolskiej. Potrzebne są badania nad zdolnością predykcyjną skal ryzyka sercowo-naczyniowego z jego zastosowaniem.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The aim of the study was to search for the association between 9 polymorphisms in the genes for C-C chemokine receptor type 7 and C-C motif chemokine 19 and angiographic patterns of coronary artery atherosclerosis or myocardial infarction risk in Polish population.

**METHODS.** 300 patients with chronic stable coronary artery disease undergoing coronarography were genotyped by RFLP method and reverse dot blot hybridization. Single variable analysis for genotype-phenotype association involved chi-square test for additive, dominant and recessive model of inheritance, Fisher's exact test, Cochran-Armitage trend test. Multivariate analysis involved linear regression and logistic regression

**RESULTS:** Allele A rs17708087 frequency in patient who underwent myocardial infarction was significantly higher (75,5%) than in control group (59%,  $p=0,01$ ). AA homozygotes versus other genotype carriers presented over two-fold increased risk of myocardial infarction (OR 2,13, CI 1,13-3,86). No correlation was found between CCR7, CCL19 polymorphisms and angiographic patterns of coronary artery atherosclerosis.

**CONCLUSIONS:** The results of the study suggest that polymorphism rs17708087 may be potentially a risk factor of myocardial infarction in Polish population. Risk prediction models for coronary artery disease with rs17708087 require further research.

## PIŚMIENNICTWO:

- [1] Allender S, Scarborough P, Peto V, et al.  
European cardiovascular disease statistics 2008 edition  
<http://www.ehnheart.org/cvd-statistics.html>
- [2] Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, et al.  
Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union.  
European Heart Journal (2006) 27, 1610–1619
- [3] Poloński L.  
Narodowy Program Profilaktyki i Leczenia Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego na lata 2003-2005 POLKARD.
- [4] Goldberg RJ, Glatfelter K, Burbank-Schmidt E, et al.  
Trends in community mortality due to coronary heart disease.  
Am Heart J 2006; 151: 501–507.
- [5] Postępowanie w ostrym zawale serca z utrzymującym się uniesieniem odcinka ST  
Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego do spraw postępowania w ostrym zawale serca z uniesieniem odcinka ST  
Kardiologia Polska 2009; 67: 1 (supl. 2)
- [6] Antman E.B, Braunwald E.  
Acute Myocardial Infarction.  
Braunwald heart disease, 5 ed. Philadelphia, Saunders 1997 - zmodyfikowane
- [7] Hansson GK.  
Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.  
N Engl J Med. 2005; 352(16):1685-95

[8] Shantaram V.

Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension.

Clin Exp Hypertens. 1999 Jan-Feb;21(1-2):69-77. Review.

[9] Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, et al.

A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors.

Nature Genetics 30, 210 - 214 (2002)

[10] Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, et al.

Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins.

J Intern Med. 2002 Sep;252(3):247-54.

[11] Jarvik G, Brunzell J, Motulsky A.

Frequent Detection of Familial Hypercholesterolemia Mutations in Familial Combined Hyperlipidemia.

J Am Coll Cardiol, 2008; 52:1554-1556

[12] Bhagavatula MR, Fan C, Shen G, et al.

Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease.

Human Molecular Genetics (2004) Volume: 13, Issue: 24, Pages: 3181-3188

[13] Miettinen TA, Gylling H.

Mortality and cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia. Long-term follow-up of 96 patients.

Arteriosclerosis. 1988 Mar-Apr;8(2):163-7

[14] Ciechanowicz A.

How to find the right gene? From candidate genes to genome and... back.

Kardiologia na co dzień 2010; 5: 62-67

- [15] Risch N, Merikangas K.  
The future of genetic studies of complex human diseases.  
Science. 1996 Sep 13;273(5281):1516-7.
- [16] Drewa F, Ferenc T.  
Genetyka medyczna.  
Elsevier Urban & Partner 2011
- [17] Fava C, Montagnana M, Guidi GC, et al.  
From circulating biomarkers to genomics and imaging in the prediction of cardiovascular events in the general population.  
Ann Med. 2011 May 31. [Epub ahead of print]
- [18] International HapMap Project  
<http://snp.cshl.org/whatishapmap.html>
- [19] HapMap3. Wellcome trust Sanger Institute  
<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/human/hapmap3.html>
- [20] Edwards A, Ritter R, Abel K, et al.  
Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration.  
Science 15 April 2005: 421-424
- [21] Kukuła K, Dąbrowski M, Chmielak Z, et al.  
Gene therapy for coronary artery disease. VIF-CAD study.  
Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji 2011 1(1) 59–65
- [22] Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, et al.  
A comprehensive review of genetic association studies.  
Genet Med. 2002 Mar-Apr;4(2):45-61

- [23] Wang H, Duncan C, Stram D.  
Optimal Two-Stage Genotyping Designs for Genome-Wide Association Scans.  
*Genetic Epidemiology* 30: 356–368 (2006)
- [24] Matyjasik J, Masojć B, Kurzawski G.  
Analizy molekularne DNA I RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów  
*Postępy Nauk Medycznych* 7/2008, s. 431-440
- [25] Incalcaterra E, Hoffmann E, Averna MR, et al.  
Genetic risk factors in myocardial infarction at young age.  
*Minerva Cardioangiol.* 2004; 52(4):287-312
- [26] Pilia G, Chen WM, Scuteri A, et al.  
Nedorezov T, Sharov A, Zonderman AB, Abecasis GR, Costa P, Lakatta E, Schlessinger D.  
Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians.  
*PLoS Genet.* 2006 Aug 25;2(8):e132. Epub 2006 Jul 10.
- [27] Wild PS, Zeller T, Schillert A, et al.  
A Genome-Wide Association Study Identifies LIPA as a Susceptibility Gene for Coronary Artery Disease.  
*Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Aug 1;4(4):403-12. Epub 2011 May 23.
- [28] Preuss M, König IR, Thompson JR, et al.  
Design of the Coronary ARtery DIsease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls.  
*Circ Cardiovasc Genet.* 2010 Oct;3(5):475-83. Epub 2010 Oct 5.
- [29] Anand SS, Xie C, Paré G, et al.  
Genetic variants associated with myocardial infarction risk factors in over 8000 individuals from five ethnic groups: The INTERHEART Genetics Study.  
*Circ Cardiovasc Genet.* 2009 Feb;2(1):16-25. Epub 2009 Jan 23.

[30] Ntzani EE, Rizos EC, Ioannidis JP.

Genetic effects versus bias for candidate polymorphisms in myocardial infarction: case study and overview of large-scale evidence.

Am J Epidemiol. 2007 May 1;165(9):973-84. Epub 2007 Feb 10.

[31] <http://www.mdsupport.org/library.html>

[32] Hindorff LA, Junkins HA, Hall PN, et al.

A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies.

<http://www.genome.gov/gwastudies>

[33] Peden JF, Farrall M.

Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour.

Hum Mol Genet. 2011 Sep 13.

[34] Trapnell C; Durinck S; Brooks A.

Next-Generation Sequencing Tutorial

<http://mged12-deep-sequencing-analysis.wikispaces.com/>

[35] Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, et al.

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.

Nature 2007;447:661–78.

[36] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al.

A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction.

Science 2007;316:1491–3.

[37] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al.

A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease.

Science 2007; 316:1488 –91.

- [38] Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al.  
Genomewide association analysis of coronary artery disease.  
N Engl J Med 2007;357:443–53.
- [39] Schunkert H, Götz A, Braund P, et al., Cardiogenics Consortium.  
Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease.  
Circulation. 2008 Apr 1;117(13):1675-84. Epub 2008 Mar 24.
- [40] Fischer M, Broeckel U, Holmer S, et al.  
Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction.  
Circulation. 2005; 111(7):855-62
- [41] Dandona S, Stewart AF, Chen L, et al.  
Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease.  
J Am Coll Cardiol. 2010 Aug 3;56(6):479-86.
- [42] Holdt LM, Sass K, Bergert H, et al.  
Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15(INK4b)), CDKN2A (p16(INK4a), p14(ARF)) and MTAP in human atherosclerotic plaque.  
Atherosclerosis. 2011 Feb;214(2):264-70. Epub 2010 Jun 23.
- [43] Musunuru K, Post WS, Herzog W, et al.  
Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with platelet reactivity: a potential mechanism for increased vascular disease.  
Circ Cardiovasc Genet. 2010 Oct;3(5):445-53. Epub 2010 Sep 21.
- [44] Noonan JP, McCallion AS.  
Genomics of long-range regulatory elements.  
Annu Rev Genomics Hum Genet. 2010 Sep 22;11:1-23.



[45] Polski Instytut Evidence Based Medicine

<http://ebm.org.pl/>

[46] Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al.

Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids.

Nature. 2010 Aug 5;466(7307):707-13.

[47] Levy D, Ehret GB, Rice K, et al.

Genome-wide association study of blood pressure and hypertension.

Nat Genet. 2009 Jun;41(6):677-87. Epub 2009 May 10.

[48] Psaty B, Smith N, Lemaitre R, et al.

Hormone Replacement Therapy, Prothrombotic Mutations, and the Risk of Incident Nonfatal Myocardial Infarction in Postmenopausal Women.

JAMA, February 21, 2001—Vol 285, No. 7

[49] Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Arias Vásquez A, et al.

Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and cardiovascular morbidity and mortality: the Rotterdam Study.

J Med Genet. 2005 Jan;42(1):26-30

[50] Tobacco and Genetics Consortium.

Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior.

Nat Genet. 2010 May;42(5):441-7. Epub 2010 Apr 25.

[51] Thompson J, Raitt J, Hutchings L, et al.

Angiotensin-converting enzyme genotype and successful ascent to extreme high altitude.

High Alt Med Biol. 2007 Winter;8(4):278-85.

[52] Vachon C.

Genome-Wide Association Studies Go Green: Novel and Cost-Effective Opportunities for Identifying Genetic Associations.

Mayo Clinic Proceedings July 2011 Volume 86 Number 7

- [53] Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al.  
Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease.  
Nature Genetics 43, 429–435 (2011)
- [54] Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al.  
Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events.  
N Engl J Med. 2008 Mar 20;358(12):1240-9.
- [55] Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, et al.  
A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses.  
Lancet. 2010;376:1393-1400.
- [56] Lluís-Ganella C, Lucas G, Subirana I, et al.  
Additive effect of multiple genetic variants on the risk of coronary artery disease.  
Rev Esp Cardiol. 2010 Aug;63(8):925-33.
- [57] Psaty B, Smith N, Heckbert S, et al.  
Diuretic Therapy, the Adducin Gene Variant, and the Risk of Myocardial Infarction or Stroke in Persons With Treated Hypertension.  
JAMA, April 3, 2002—Vol 287, No. 13
- [58] Arnett DK, Boerwinkle E, Davis BR, et al.  
Pharmacogenetic approaches to hypertension therapy: design and rationale for the Genetics of Hypertension Associated Treatment (GenHAT) study.  
The Pharmacogenomics Journal 2002; 2:309–317
- [59] Davis BR, Arnett DK, Boerwinkle E, et al.  
Antihypertensive therapy, the a-adducin polymorphism, and cardiovascular disease in high-risk hypertensive persons: the Genetics of Hypertension-Associated Treatment Study.  
The Pharmacogenomics Journal 2007; 7:112-122

- [60] Lynch AI, Boerwinkle E, Davis BR et al.  
Antihypertensive pharmacogenetic effect of fibrinogen-beta variant -455G\_A on cardiovascular disease, end-stage renal disease, and mortality: The GENHAT study.  
Pharmacogenet Genom. 2009;19:415– 421
- [61] Lynch A, Boerwinkle E, Davis B, et al.  
Pharmacogenetic Association of the NPPA T2238C Genetic Variant With Cardiovascular Disease Outcomes in Patients With Hypertension  
JAMA. 2008;299(3):296-307
- [62] Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ, et al.  
Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients: findings from the EUCLID Randomized Controlled Trial. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in IDDM.  
Diabetes 47 :1507– 1511,1998
- [63] Hernández D, Lacalzada J, Salido E, et al.  
Regression of left ventricular hypertrophy by lisinopril after renal transplantation: Role of ACE gene polymorphism.  
Kidney International (2000) 58, 889–897; doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00239.x
- [64] Daly AK, King BP.  
Pharmacogenetics of oral anticoagulants.  
Pharmacogenetics 2003;13:247-252
- [65] Liewei W., Howard L, Weinshilboum R.  
Genomics and Drug Respons.  
N Engl J Med 2011; 364:1144-1153
- [66] Manolopoulos VG, Ragia G, Tavridou A.  
Pharmacogenetics of coumarinic oral anticoagulants.  
Pharmacogenomics 2010;11:493-496

[67] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al.

Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose.

N Engl J Med 2005;352:2285-2293

[68] Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, et al.

Warfarin genotyping reduces hospitalization rates: results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study).

J Am Coll Cardiol 2010;55:2804-2812

[69] Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al.

Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia.

Circulation, 1998; 98: 2800–4

[70] Laham RJ, Chronos NA, Pike M et al.

Results of a phase I open-label dose escalation study.

J Am Coll Cardiol, 2000; 36: 2132–39

[71] Grines CL.

The AGENT clinical trials programme.

Eur Heart J, 2004; 6(Suppl.E): E18–23

[72] Kukuła K, Chojnowska L, Dąbrowski M, et al.

Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD).

Am Heart J. 2011 Mar;161(3):581-9. Epub 2011 Jan 31

[73] Wytyczne dotyczące rewaskularyzacji mięśnia sercowego

Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) do spraw

rewaskularyzacji mięśnia sercowego oraz Europejskie Stowarzyszenie Chirurgii Serca i Klatki Piersiowej (EACTS)

[74] Kastrati A, Schömig A, Elezi S, et al.

Predictive factors of restenosis after coronary stent placement.

J Am Coll Cardiol. 1997 Nov 15;30(6):1428-36.

[75] Ganesh SK, Nabel EG.

Genomics of in-stent restenosis: early insights into a complex disease.

Circulation. 2005 Oct 18;112(16):2378-9.

[76] Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.

Nature 362:801–809

[77] Wick G, Knoflach M, Xu Q.

Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis.

Annu Rev Immunol 22:361– 403

[78] Millonig G, Schwentner C, Mueller P, et al.

The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity.

Curr Opin Lipidol 12:547–553

[79] Lord RS, Bobryshev YV.

Hallmarks of atherosclerotic lesion development with special reference to immune inflammatory mechanisms.

Cardiovasc Surg 10:405–414

[80] Bobryshev YV.

Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis.

Micron 37:208–222 (2006)

[81] Nathan C.

Points of control in inflammation.

Nature 420: 846–852, 2002.

[82] Tedgui A, Mallat Z.

Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways  
Physiol Rev 86: 515–581, 2006; doi:10.1152/physrev.00024.2005.

[83] Libby P and Theroux P.

Pathophysiology of coronary artery disease.  
Circulation 111: 3481–3488, 2005.

[84] Davies MJ.

A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease.  
Circulation 82: II38–46, 1990.

[85] Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al.

Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.  
Circulation 89: 36– 44, 1994.

[86] Lipscomb M, Masten B)

Dendritic cells: immune regulators in health and disease.  
Physiol Rev 82:97–130

[87] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2011/steinman.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/steinman.html)

[88] Ngo VN, Tang HL, Custer JG.

Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells.  
J Exp Med 188: 181–191, 1998.

[89] Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL.

The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells.  
J Immunol. 2006; 176(9):5153-9

[90] Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH.

T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases.  
Nature. 2004 Jan 8;427(6970):154-9.

[91] Damas JK, Smith C, Oie E, et al.

Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Mar;27(3):614-20. Epub 2006 Dec 14.

[92] Reape TJ, Rayner K, Manning CD, et al.

Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques.

Am J Pathol. 1999; 154(2):365-74

[93] Yilmaz A, Lochno M, Traeg F et al.

Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques.  
Atherosclerosis. 2004; 176(1):101-10

[94] Edens HA and Parkos CA.

Modulation of epithelial and endothelial paracellular permeability by leukocytes.  
Adv Drug Deliv Rev 41: 315–328, 2000.

[95] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, et al.

Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.

Science 243: 1160–1165, 1989.

[96] Minami M, Kume N, Shimaoka T, et al.

Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1796–1800, 2001.

[97] Folcik VA, Aamir R, and Cathcart MK.

Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 1954–1961, 1997.

[98] Hansson GK, Holm J, Holm S et al.

Lymphocytes-t inhibit the vascular response to injury.  
Proc Natl Acad Sci USA 88: 10530–10534, 1991.

[99] Apostolou I and von Boehmer H.

In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.  
J Exp Med 199: 1401–1408, 2004.

[100] Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L et al.

Regulatory T cells suppress tumor specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo.  
Proc Natl Acad Sci USA 102: 419–424, 2005.

[101] Newby AC.

Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.  
Physiol Rev 85: 1–31, 2005.

[102] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al.

Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.  
Arterioscler Thromb 11: 1223–1230, 1991.

[103] Bodary PF, Gu S, Shen Y, H et al.

Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: e119–e122, 2005.



- [104] Boyle JJ, Weissberg PL, and Bennett MR.  
Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1624–1630, 2002.
- [105] Esmon CT.  
The impact of the inflammatory response on coagulation.  
*Thromb Res* 114: 321–327, 2004.
- [106] Boulay JL, O’Shea JJ, and Paul WE.  
Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors.  
*Immunity* 19: 159–163, 2003.
- [107] Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, et al.  
Chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88: 1121–1127, 1991.
- [108] Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al.  
Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5252–5256, 1991.
- [109] Llodra J, Angeli V, Liu J, et al..  
Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(32):11779-84
- [110] Yilmaz A, Reiss C, Tantawi O, et al.  
HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis.  
*Atherosclerosis*. 2004; 172(1):85-93

- [111] Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al.  
Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(10):3781-6
- [112] Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2011  
Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego  
<http://www.cukrzyca.info.pl/pt/standardy/article/>
- [113] Standardy postępowania Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego  
[http://www.ptkardio.pl/Standardy\\_postepowania-278](http://www.ptkardio.pl/Standardy_postepowania-278)
- [114] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al.  
Rapid and simple method for purification of nucleic acids.  
J Clin Microbiol. 1990 Mar;28(3):495-503
- [115] Pao CC, Yen TSB, You J, et al.  
Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification.  
J. Clin. Microbiol. 28:1877-1880. 1990
- [116] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.  
Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science 230:1350-1354 1985
- [117] Dattagupta N, Rae PM, Huguenel ED, et al.  
Rapid identification of microorganisms by nucleic acid hybridization after labeling the test sample.  
Anal Biochem. 1989 Feb 15;177(1):85-9

- [118] Bugawan TL, Begovich AB, Erlich HA.  
Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes  
Immunogenetics. 1990;32(4):231-41
- [119] Kamst-van Agterveld G, Zwart G.  
Manual reverse line blot hybridisation (update march 2004)  
EU BIOMAN EVKK2-1999-00309
- [120] Sub-Cell®GTAgarose Gel Electrophoresis System. Instruction Manual Bio-Rad.  
Current Protocols in Molecular Biology.  
Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1989
- [121] Jones A, Montgomery A.  
The Gly389Arg beta-1 adrenoceptor polymorphism and cardiovascular disease: time for a rethink in the funding of genetic studies?  
E H. Eur . Heart J. 23: 1071–1074,2002 zmod. Molecular Diagnostics for Clinical Laboratorian - Coleman W, Tsongalis G .
- [122] Gianrossi R., Detrano R., Mulvihill D, et al.  
Exercise-induced ST depression in the diagnosis of coronary artery disease: a meta-analysis.  
Circulation 1989, 80, 87.
- [123] Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, et al.; PROSPECT Investigators.  
A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis.  
N Engl J Med. 2011 Jan 20;364(3):226-35.
- [124] Bigi R, Desideri A, Rambaldi R, et al.  
Angiographic and prognostic correlates of cardiac output by cardiopulmonary exercise testing in patients with anterior myocardial infarction.  
Chest. 2001 Sep;120(3):825-33.

- [125] Bogaty P, Brecker SJ, White SE, Stevenson RN, et al.  
Comparison of coronary angiographic findings in acute and chronic first presentation of ischemic heart disease.  
Circulation. 1993 Jun;87(6):1938-46.
- [126] National Center for Biotechnology Information  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- [127] Pająk A, Wiercińska E, Polakowska M, et al.  
Rozpowszechnienie dyslipidemii u mężczyzn i kobiet w wieku 20–74 lat w Polsce. Wyniki programu WOBASZ  
Kardiologia Polska 2005; 63: 6 (supl. 4)
- [128] Tykarski A, Posadzy-Mańczyńska A, Wyrzykowski B, et al.  
Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego oraz skuteczność jego leczenia u dorosłych mieszkańców naszego kraju. Wyniki programu WOBASZ  
Kardiologia Polska 2005; 63: 6 (supl. 4)
- [129] Biela U, Pająk A, Kaczmarczyk-Chałas K et al.  
Częstość występowania nadwagi i otyłości u kobiet i mężczyzn w wieku 20–74 lat. Wyniki programu WOBASZ  
Kardiologia Polska 2005; 63: 6 (supl. 4)
- [130] Polakowska M, Piotrowski W, Tykarski A et al.  
Nałóg palenia tytoniu w populacji polskiej. Wyniki programu WOBASZ  
Kardiologia Polska 2005; 63: 6 (supl. 4)
- [131] PCR introduction.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>
- [132] RFLP introduction.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>

- [133] Dangler C, Concha-Bermejillo A, Stott J, et al.  
Limitations of in situ hybridization for the detection of bluetongue virus in blood mononuclear cells  
J Vet Diagn Invest 2:303-307 (1990)
- [134] Alves AC, Medeiros AM, Francisco V et et al.  
Molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia: an important tool for cardiovascular risk stratification.  
Rev Port Cardiol 2010; 29: 907-21
- [135] Shabalina S, Spiridonov N.  
The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences  
Genome Biol. 2004; 5(4): 105.
- [136] Versteeg R, van Schaik BDC, van Batenburg MF, et al.  
The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes.  
Genome Res 2003, 13:1998-2004.
- [137] Girelli D, Martinelli N, Peyvandi F, et al.  
Genetic architecture of coronary artery disease in the genome-wide era: implications for the emerging "golden dozen" loci.  
Semin Thromb Hemost. 2009 Oct;35(7):671-82.
- [138] Zhang K, Qin ZS, Liu JS, et al.  
Haplotype block partitioning and tag SNP selection using genotype data and their applications to association studies.  
Genome Res. 2004 May;14(5):908-16. Epub 2004 Apr 12.
- [139] Coleman B.  
Molecular diagnostics for clinical laboratorian.  
Second edition Humana Press 2006

[140] Strachan T, Read AP.

Human Molecular Genetics. 2nd edition.

[141] Shen W, Willis D, Zhang Y, et al.

Expression of creatine kinase isoenzyme genes during postnatal development of rat brain cerebrum: evidence for posttranscriptional regulation.

Dev Neurosci. 2003 Nov-Dec;25(6):421-35.

[142] Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, et al.

Diagnostic value of carotid intima-media thickness in indicating multi-level atherosclerosis.

Atherosclerosis. 2007 Aug;193(2):395-400. Epub 2006 Aug 14.

[143] Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al.

The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm.

Nat Genet 2008; 40:217–24.

[144] Oxford Nanopore megaton announcement: “Why do you need a machine?”

<http://pathogenomics.bham.ac.uk/blog/2012/02/oxford-nanopore-megaton-announcement-why-do-you-need-a-machine-exclusive-interview-for-this-blog/>