

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski



Wiktoria Wojciechowska

POLIMORFIZM GENÓW α ADDUCYNY I SYNTAZY
ALDOSTERONU A WŁAŚCIWOŚCI ELASTYCZNE
DUŻYCH TĘTNIC

Praca doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



1816051258

Promotor

Prof. dr hab. med. Kalina Kawecka - Jaszcz

Pracę wykonano w I Klinice Kardiologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Kalina Kawecka - Jaszcz

Kraków, rok 2004

*Pragnę wyrazić wdzięczność
Pani Profesor Kalinie Kaweckiej-Jaszc
za zachętę do podjęcia niniejszej pracy, życzliwość,
mobilizację i pomoc okazaną w trakcie jej realizacji*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	5
WSTĘP	6
Uwarunkowania genetyczne ciśnienia tętniczego	6
Udział naczyń w warunkowaniu ciśnienia tętniczego.....	9
Metody badania naczyń tętniczych	13
Czynniki warunkujące przebudowę ściany naczyniowej.....	17
CELE PRACY.....	23
MATERIAŁ I METODYKA.....	24
Badana populacja	24
Protokół badania.....	25
Badane fenotypy.....	26
Pomiar ciśnienia tętniczego sfigmomanometrem rtęciowym.....	26
Automatyczny całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego krwi	27
Pomiary antropometryczne	28
Standardowy kwestionariusz	28
Badania laboratoryjne	28
Analiza fali tętna.....	29
<i>Rejestracja fali tętna</i>	29
<i>Kalibracja fali tętna</i>	30
<i>Ekstrapolacja aortalnej fali tętna</i>	31
<i>Wskaźniki sztywności ścian tętnic</i>	31
Badane genotypy	34
Gen syntazy aldosteronu	34
Gen α adducyny.....	35
Analiza statystyczna	35
WYNIKI	38
Charakterystyka badanej populacji	38
Regresja krokowa	46

Częstość występowania badanych genotypów.....	48
Fenotypy ciśnieniowo – naczyniowe a badane polimorfizmy genetyczne.....	50
Polimorfizm Gly460Trp genu α adducyny.....	50
<i>Analiza asocjacji.....</i>	50
<i>Interakcja gen – środowisko a własności dużych naczyń tętniczych</i>	54
<i>Test nierównowagi transmisji.....</i>	55
Polimorfizm C–344T genu syntazy aldosteronu	57
<i>Analiza asocjacji.....</i>	57
<i>Interakcja gen – środowisko a własności dużych naczyń tętniczych</i>	65
<i>Test nierównowagi transmisji.....</i>	66
DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	68
Polimorfizm genu kodującego podjednostkę α adducyny a badane fenotypy	68
Polimorfizm genu kodującego syntazę aldosteronu a badane fenotypy	73
Badane fenotypy układu krążenia.....	79
Metody analizy statystycznej w badanej populacji rodzin nuklearnych.....	83
STRESZCZENIE PRACY.....	87
SPIS RYCIN I TABEL.....	95
Ryciny	95
Tabele.....	96
PIŚMIENNICTWO	97

Wykaz stosowanych skrótów

ABPM - *ambulatory blood pressure monitoring* – automatyczny całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego krwi

AIx - *augmentation index* - wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego

AIx_{ao} - aortalny wskaźnik wzmocnienia

AIx_{obw} - obwodowy wskaźnik wzmocnienia

CO - *cardiac output* – pojemność minutowa

CTK - ciśnienie tętnicze krwi

CTK_R - rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi

CTK_S - skurczowe ciśnienie tętnicze krwi

CYP11B2 - gen syntazy aldosteronu

GTF - *general transfer function* – uniwersalna funkcja przejścia

HDL - *high density lipoprotein* – lipoproteiny o wysokiej gęstości

IMT - *intima-media thickness* - grubość kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa

LDL - *low density lipoprotein* – lipoproteiny o niskiej gęstości

MAP - *mean arterial pressure* – średnie ciśnienie tętnicze

MHS - *Milan hypertensive strain* - szczep mediolański z nadciśnieniem tętniczym

PCR - *polymerase chain reaction* - reakcja łańcuchowa polimerazy

PP - *pulse pressure* - ciśnienie tętna

PP_{ao} - aortalne ciśnienie tętna

PP_{obw} - obwodowe ciśnienie tętna

PWA - *pulse wave analysis* - analiza fali tętna

PWV - *pulse wave velocity* - prędkość fali tętna

QTDT - *transmission disequilibrium test for quantitative traits* - test nierównowagi transmisji dla zmiennych ilościowych

R - *peripheral resistance* - opór obwodowy

SHEP - *Systolic Hypertension in Elderly Program*

SYST-EUR - *Systolic Hypertension in Europe*

TDT - *transmission disequilibrium test* - test nierównowagi transmisji

USG - ultrasonografia

Wstęp

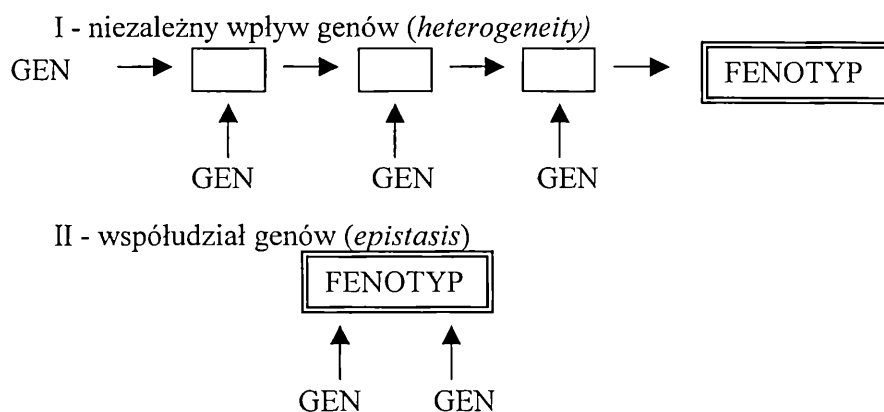
Choroby układu sercowo - naczyniowego są najczęstszą przyczyną zgonów w Polsce. Spośród głównych czynników ich ryzyka pierwotne nadciśnienie tętnicze z uwagi na rozpowszechnienie i powikłania, oraz koszty leczenia, stanowi jeden z najważniejszych problemów zdrowotnych i społecznych w naszym kraju (3). W zakresie powikłań nadciśnienia w minionym dziesięcioleciu wzrosła częstość występowania udaru mózgu, zwiększyła się zapadalność na schyłkową niewydolność nerek oraz częstość występowania niewydolności serca, a tendencja spadkowa zapadalności na chorobę wieńcową uległa zahamowaniu. Za te niekorzystne trendy w dużej mierze odpowiedzialne jest późne rozpoznawanie nadciśnienia tętniczego i niewystarczająca jego kontrola (34).

Uwarunkowania genetyczne ciśnienia tętniczego

Etiologia pierwotnego nadciśnienia tętniczego jest nadal przedmiotem badań. Rozkład normalny - zgodny z krzywą Gaussa - ciśnienia tętniczego w populacji wyraźnie wskazuje na wieloczynnikowe uwarunkowanie tego schorzenia (118). Ciśnienie tętnicze zależy od udziału zarówno czynników genetycznych (uwarunkowanie poligeniczne), co manifestuje się predyspozycją do występowania rodzinnego, jak i środowiskowych (38). W badaniach poświęconych patogenezie nadciśnienia tętniczego bardzo wcześnie zwrócono uwagę na rolę czynników dziedzicznych (53, 141). O wpływie genów na wysokość ciśnienia tętniczego świadczy szereg badań rodzinnych, które wykazały związek między ciśnieniem tętniczym u rodziców i dzieci oraz w obrębie rodzeństwa (90). Na podstawie badań epidemiologicznych stwierdzono, że im bliższy stopień pokrewieństwa genetycznego, tym bardziej są zbliżone wartości ciśnienia tętniczego. Szacuje się, że zmienność ciśnienia tętniczego przypisana wszystkim czynnikom genetycznym waha się od 25% w badaniach rodzin wielopokoleniowych do 65% w badaniach bliźniąt (75). Za pozostałą część zmienności odpowiedzialne są czynniki środowiskowe, co wskazuje na istotną rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego nie tylko interakcji między genami, ale również interakcji genów z czynnikami środowiska (118).

Ciśnienie tętnicze jest wypadkową działania złożonych i ściśle związanych ze sobą mechanizmów regulujących średnicę naczyń, objętość minutową serca oraz skład i objętość przestrzeni płynowych w organizmie. Poszczególne składowe tego złożonego układu podlegają wpływom czynników środowiskowych i genetycznych (38). Nie wiadomo dotychczas, ile genetycznych *loci* składa się na wypadkową, która wyraża się predyspozycją do nadciśnienia tętniczego, z wyjątkiem rzadkich jednogenowych form nadciśnienia tętniczego, dziedziczonych zgodnie z prawami Mendla (108). W uwarunkowaniach wielogenowych allele w różnych *loci* genowych mogą powodować chorobę niezależnie od siebie (ryc. 1. cz. I), albo też efekt alleli z dwóch lub więcej miejsc genowych jest konieczny do wywołania choroby (ryc. 1. cz. II) (147).

Ryc. 1. Schemat genetycznych mechanizmów warunkujących fenotyp w dziedziczeniu wielogenowym



Bez względu na mechanizm, staje się oczywiste, że efekty mutacji indywidualnych genów bez rozpatrywania wpływu innych genów i/lub środowiska mają tylko umiarkowane znaczenie. Stąd też wynikają ogromne trudności w poszukiwaniu genetycznych uwarunkowań nadciśnienia tętniczego. Współczesna nauka posługuje się szeregiem metod analizy dziedziczenia wielogenowego. Najczęściej są prowadzone badania w odniesieniu do głównej cechy fenotypowej (fenotyp końcowy), jaką jest nadciśnienie tętnicze. Są to badania porównawcze (*association study* lub *case control study*) w populacji niespokrewnionych osób z nadciśnieniem tętniczym z grupą kontrolną z prawidłowymi wartościami ciśnienia i oceniają częstość występowania różnych cech genetycznych w obu grupach. Tak więc, jeśli określony allel istotnie częściej występuje w populacji osób chorych uważa się, że

jest on zasocjowany z badaną cechą. W sytuacji, gdy określona cecha jest dość częsta w badanej populacji, zwiększa się prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich, co jest podstawową niedogodnością tej metody (168). Wykorzystywane są również badania rodzin nuklearnych, które bazują na genotypach rodziców i dzieci oraz fenotypach dzieci. Klasyczny test nierównowagi transmisji (TDT - Transmission Disequilibrium Test) polega na analizie różnic w dziedziczeniu od heterozygotycznego rodzica badanego allelu pomiędzy probantem (dziecko dotknięte chorobą) a jego zdrowym rodzeństwem (7). Z uwagi na dużą czułość tej metody, ugruntował się pogląd, iż stwierdzona asocjacja określonego genu z badaną cechą w populacji niespokrewnionych osób, winna być potwierdzona w badaniu rodzin przy zastosowaniu testu TDT. Coraz szersze zastosowanie w badaniach genetycznych i epidemiologicznych znajduje test nierównowagi transmisji dla zmiennych ciągłych (QTDT - Transmission Disequilibrium Test for Quantitative traits) (7), który umożliwia ocenę stopnia dziedziczności zmiennych ilościowych, jak na przykład ciśnienie tętnicze czy ciśnienie tętna. QTDT jest równie czułym testem jak klasyczny test nierównowagi transmisji, a równocześnie nie wymaga tak rygorystycznego doboru rodzin, co potencjalnie zwiększa liczebność populacji badanej, a co za tym idzie - moc statystyczną testu. Pozwala on na wykrycie związku konkretnego polimorfizmu genu kandydata z istotną zmianą badanego fenotypu (np. wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego) (7, 8).

W ocenie wpływu czynników genetycznych na złożone fenotypy, jakim jest ciśnienie tętnicze krwi, kluczowym elementem jest precyzyjna charakterystyka fenotypowa. W większości dotychczasowych badań wykorzystywano sfigmomanometryczne pomiary ciśnienia tętniczego w gabinecie lekarskim. W porównaniu z tymi tradycyjnymi pomiarami, całodobowa rejestracja ciśnienia tętniczego uwzględnia jego dobową zmienność, umożliwiając poszerzenie zakresu badań nad aspektami genetycznymi uwarunkowania ciśnienia tętniczego krwi. Średnie ciśnienie z okresu dnia lub nocy uzyskiwane w pomiarach całodobowych w porównaniu do wartości mierzonych tradycyjną metodą, znacznie lepiej koreluje z subklinicznymi powikłaniami narządowymi nadciśnienia (112). Możliwość oceny rytmu dobowego ciśnienia tętniczego krwi stała się podstawą badań nad znaczeniem klinicznym porannego wzrostu ciśnienia tętniczego i jego spadku w godzinach nocnych. Zagrożenie rozwojem powikłań nadciśnienia wzrasta u osób pozbawionych nocnego

spadku ciśnienia (176). Podkreśla się również wartość zmienności ciśnienia jako parametru określającego wielkość ryzyka sercowo - naczyniowego (177).

Udział naczyń w warunkowaniu ciśnienia tętniczego

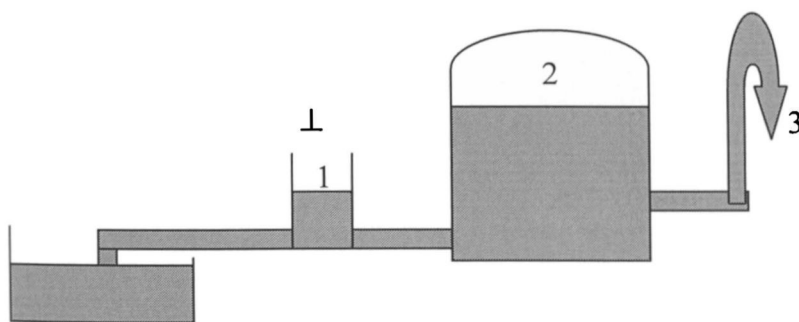
Obecnie, w miejsce oceny fenotypu końcowego, jakim jest wysokość ciśnienia tętniczego, coraz częściej przedmiotem badań jest analiza fenotypów powiązanych, warunkujących wartość ciśnienia tętniczego. Są one zbiorem wszystkich mierzalnych zmiennych stanowiących wykładniki ekspresji określonych genów, tzw. genów kandydatów, których produkty mają udowodniony molekularny i biochemiczny wpływ na patomechanizm nadciśnienia tętniczego (39). Fenotyp taki można zdefiniować jako ogniwo łączące fenotyp końcowy (ciśnienie tętnicze) z ekspresją genową, który na kolejnych poziomach (molekularnym, subkomórkowym, komórkowym, tkankowym i ustrojowym) między genotypem a fenotypem końcowym podlega modyfikacji pod wpływem czynników środowiskowych (50). Fenotypy takie (np. napięcie układu współczulnego, sodowrażliwość, układ renina-angiotensyna-aldosteron, czynniki śródbłonkowe, reaktywność ściany naczyniowej i kurczliwość mięśnia sercowego) ułatwiają wyodrębnianie poszczególnych zespołów warunkujących wzrost ciśnienia tętniczego. Podobnie jak nadciśnienie samoistne, również i one nie są jednorodne przyczynowo, ale stanowią wykładnik oddziaływania poszczególnych wariantów genów i określonych czynników środowiskowych, co moduluje stopień ujawniania się (ekspresji) fenotypu. Analiza zmian zachodzących na poszczególnych poziomach związanych przyczynowo-skutkowo z ciśnieniem tętniczym i ekspresją genów może się przyczynić do odkrycia patomechanizmu nadciśnienia tętniczego. Zastosowanie analizy fenotypów powiązanych wydaje się mieć szereg zalet w porównaniu z oceną tylko ciśnienia tętniczego jako fenotypu końcowego. Taka analiza pozwala bowiem na włączenie do badania osób młodych, bez cech klinicznych choroby, u których możemy stwierdzić genetyczne ryzyko rozwoju choroby w przyszłości (168, 188).

Szczególnie ważnymi elementami w regulacji ciśnienia systemowego są aorta i duże naczynia. Klasyczna definicja ciśnienia tętniczego, czyli $CTK = CO \times R$, która bazuje na o porze o bwodowym (R - peripheral resistance) i pojemności minutowej serca (CO - cardiac output), pomija rolę dużych tętnic. Badania ostatnich lat oraz

analizy wcześniejszych badań epidemiologicznych i klinicznych wykazały że ciśnienie skurczowe (CTK_S) jest lepszym wskaźnikiem ryzyka sercowo – naczyniowego i śmiertelności aniżeli ciśnienie rozkurczowe (61, 84, 85). Wyniki badania SHEP (Systolic Hypertension in Elderly Program) (2) przeprowadzonego u osób z izolowanym skurczowym nadciśnieniem tętniczym dostarczyły dowodów o wpływie obniżenia CTK_S na redukcję śmiertelności całkowitej oraz śmiertelności z powodu incydentów sercowo – naczyniowych. Wyniki tego badania zostały potwierdzone w wieloośrodkowym programie SYST-EUR (Systolic Hypertension in Europe) (26), które dowiodło istotności rokowniczej ciśnienia tętna (PP - pulse pressure). Do wzrostu wartości CTK_S i PP dochodzi na skutek upośledzenia podatności aorty i dużych naczyń. Duże tętnice pełnią nie tylko funkcję przewodzącą, zapewniając ukrwienie narządów i tkanek, ale również funkcję amortyzującą. Z uwagi na większy przekrój i dużą zawartość elementów sprężystych naczynia te posiadają zdolność rozciągania podczas skurczu mięśnia sercowego i gromadzą około 60% objętości wyrzutowej lewej komory. Następnie w fazie rozkurczu skumulowana energia sprężysta powoduje powrót ścian aorty do stanu wyjściowego ze stopniowym przesunięciem zmagazynowanej krwi na obwód. Zapewnia to zamianę przepływu pulsacyjnego na ciągły oraz odpowiednie ciśnienie rozkurczowe w układzie naczyniowym (138). Funkcję amortyzującą naczyń znakomicie odzwierciedlają modele układu naczyniowego, najstarszy z nich to tzw. „Windkessel” model (74) (ryc. 2).

Ryc. 2. Model „Windkessel”

(1-pompa/serce; 2-powietrznia/duże naczynia; 3-wąż gaśniczy/naczynia oporowe).

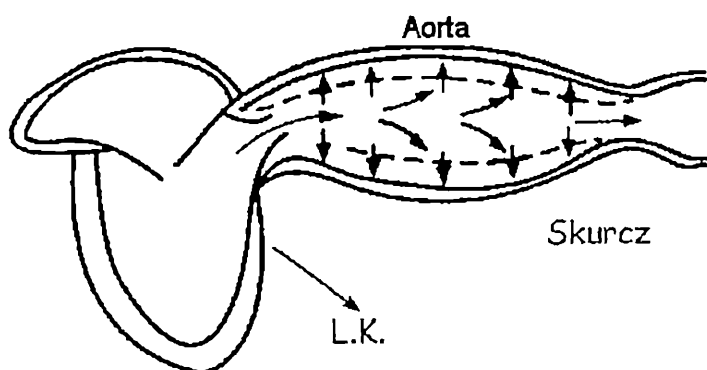


Według koncepcji Halesa model ten przedstawia duże naczynia jako zbiornik powietrza nad poziomem płynu w zamkniętym układzie (powietrznia) sprężanego ciśnieniem tłoka, a podatność gazu odzwierciedla podatność tętnic. W okresie

rozkurczu i pauzy, kiedy serce chwilowo nie tłoczy krwi, aorta działa na podobieństwo powietrzni, oddając zmagazynowaną energię. Jest to możliwe dlatego, że rozciągnięcie aorty objętością wyrzutową zwiększa w jej ścianach napięcie sprężyste, które następnie, zgodnie z prawem Laplace'a, podnosi ciśnienie wewnątrz aorty do wartości ciśnienia skurczowego. W chwili przzerwania tłoczenia krwi przez lewą komorę serca ciśnienie spada wolno wraz ze zmniejszeniem się napięcia sprężystego ścian aorty i powrotu jej do rozmiarów wyjściowych, w miarę odpływu zmagazynowanej początkowo objętości krwi do naczyń włosowatych. Model ten stał się podstawą do opracowania szeregu metod badania własności naczyń tętniczych poprzez pomiar ich podatności jako ilościowej oceny rozciągliwości i sprężystości. Obecnie możemy nieinwazyjnie w sposób powtarzalny zmierzyć lokalną podatność tętnic przy zastosowaniu metody ultrasonograficznej, tzw. „wall track system”, wykorzystującej kodowanie ruchu ściany naczynia jako sygnału radioczęstotliwości (80). Metoda ta nie daje jednak, podobnie jak model Windkessel, pełnego obrazu funkcji aorty i jej rozgałęzień, pomija bowiem parametr częstotliwościowy, czyli szerzenia się fali tętna. Charakter lepko-sprężysty ścian tętnic jest bowiem także elementem warunkującym szybkość rozchodzenia się fali tętna oraz moment jej odbicia. Bardziej realistycznym modelem układu naczyniowego jest elastyczny przewód z lewą komorą na jednym końcu i oporem obwodowym na jego drugim końcu (128). Fala generowana przez lewą komorę rozchodzi się na obwód i powraca jako fala odbita na skutek drastycznej zmiany prędkości przemieszczania się fali na granicy dwóch ośrodków – tętnic systemowych i oporowych (ryc. 3).

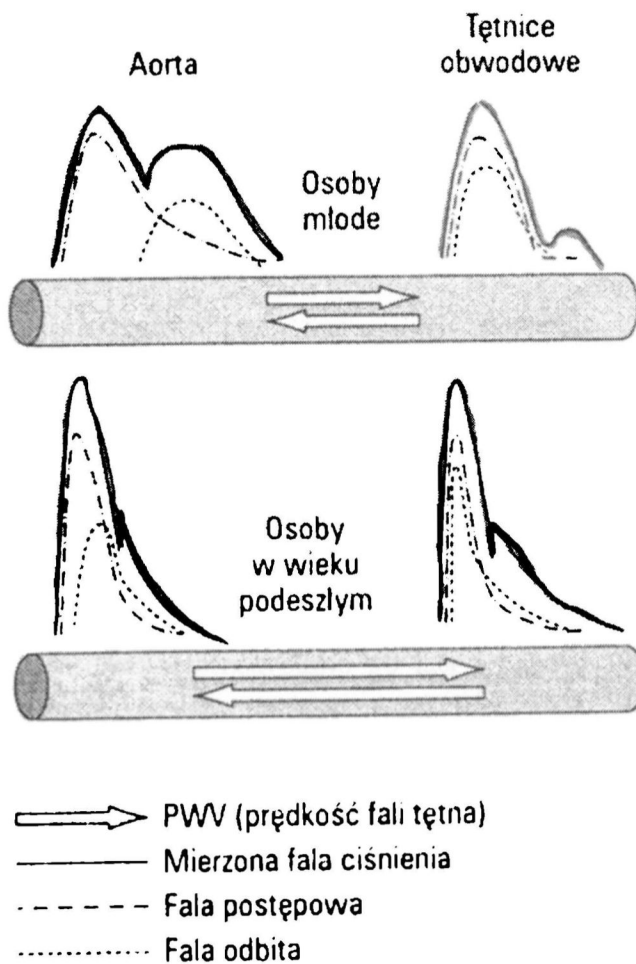
Ryc. 3. Model dystrybucyjny

(L.K. – lewa komora)



Fala ciśnieniowa w każdym punkcie przewodu jest wynikiem nałożenia się na siebie fali pierwotnej i odbitej. Im bardziej sprężysta jest ściana przewodu, jak ma to miejsce w naczyniach młodych zdrowych osób, tym mniejsza jest prędkość fali tętna (PWV - Pulse Wave Velocity) co skutkuje późniejszym powrotem fali odbitej. Wraz ze wzrostem sztywności naczynia, jak u osób starszych, fala wędruje szybciej, a fala odbita powraca w fazie skurczu, powodując wysokie skurczowe oraz niskie rozkurczowe ciśnienie (122) (ryc. 4 wg (138)).

Ryc. 4. Wpływ powrotu fali odbitej na amplitudę ciśnienia skurczowego w aorcie zależnie od wieku badanego



Ciśnieniowa fala tętna odzwierciedla więc skutki usztywnienia aorty, a zmiany własności ściany naczyniowej przejawiają się w charakterystycznych kształtach fali tętna. Stąd wynika możliwość analizowania zmian ciśnienia pulsacyjnego i odbicia fali tętna w odniesieniu do przebudowy ściany naczyniowej.

Metody badania naczyń tętnicznych

Stosowane od czasów Galena badanie 'pulsu' jest najprostszym, ale jednocześnie najtrudniejszym w interpretacji sposobem oceny sztywności naczyń, toteż w ciągu wieków starano się ocenę tętna zobiektywizować. Prekursorem sfigmografii był Józef Struś (Struthius) profesor uniwersytetu w Padwie, burmistrz Poznania i lekarz nadworny Zygmunta Augusta. W swoim dziele „Sphygmicae artis libri quinque” jako jeden z pierwszych omówił obszernie zagadnienie tętna u człowieka zdrowego i chorego, umiał badać puls i na tej podstawie wyciągać właściwe wnioski diagnostyczne. A uważne, umiejętne badanie tętna było jakby wstępem do później powstałego badania fizykalnego serca. Graficzny zapis tętna (sfigmogram) zapoczątkowany w XIX wieku przez Marey'a był następnie udoskonalany przez wprowadzenie nowych czujników piezo-, fotoelektrycznych, pojemnościowych i rezonansowych (64). Podstawy teoretyczne sfigmografii zostały stworzone w XIX wieku przez Mahomeda, który zwrócił uwagę na odmiennosć kształtów fal tętna na tętnicy promieniowej i szyjnej, wpływ wieku i podwyższonego ciśnienia tętniczego na ukształtowanie fal tętna oraz opisał różnice w zapisach uzyskanych u chorych z pierwotnym nadciśnieniem i z niewydolnością nerek (122, 127).

Uznanie sfigmogramu za miarodajny wskaźnik zmian naczyniowych stało się możliwe, gdy wykazano, że zewnętrzny zapis tętna dobrze koreluje z zapisem ciśnieniowym uzyskanym z wnętrza aorty. Wynik wstępnych prac nad morfologicznymi zmianami arteriogramów tętnicy szyjnej w różnych stanach chorobowych przedstawił przed około 50 laty Donzelot i wsp. (54) W Polsce w latach 60-tych Chlebus (37) wprowadził do analizy zapisu tętna szereg parametrów matematycznych umożliwiających bardziej obiektywną jego ocenę. Problemem było jednak ciągle otrzymanie dokładnego i powtarzalnego zapisu. Mechaniczne urządzenie, pozwalające na uzyskiwanie kształtu obwodowej fali tętna zostało skonstruowane przez MacKenzie. Przyrząd jednak był niewygodny w użytku, a kształt uzyskiwanej fali zaburzony licznymi artefaktami.

Współczesne piezo-elektryczne systemy tonometryczne są bardzo dokładne i niezawodne. Nazwa tonometrii aplanacyjnej (manometria ze spłaszczeniem) wywodzi się od greckiego słowa „*tonos*” oznaczającego „*miejsce*” oraz słowa „*applanate*”, które oznacza „*spłaszczać*”. W medycynie początkowo znalazła ona szerokie zastosowanie w okulistyce do pomiarów ciśnienia wewnątrzgałkowego. Do

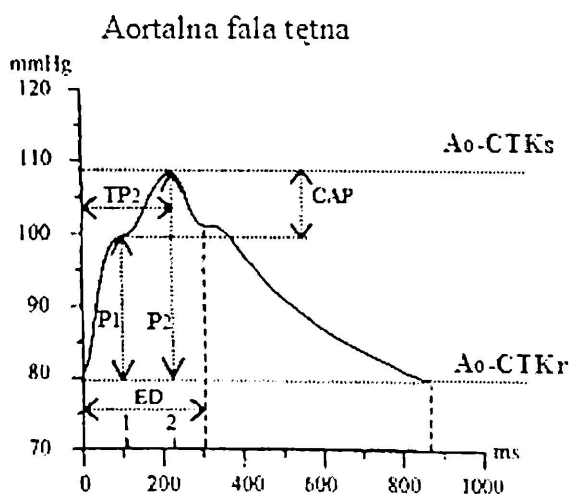
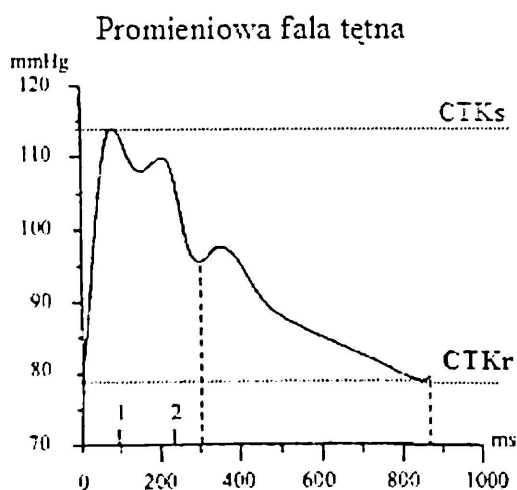
oceny fali tętna została po raz pierwszy zastosowana przez Pressmana i Naugarda w 1963 roku (122). Drzewiecki i Millar, wykorzystując zasady tonometrii aplanacyjnej i doświadczenia MacKenzie, skonstruowali rejestrator, dający dokładne i powtarzalne wykresy tętna obwodowego, które po opracowaniu komputerowym i włączeniu do analizy wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego uzyskanych w pomiarze nieinwazyjnym, służą do odtworzenia kształtu fali tętna aortalnego i wyliczenia wielu wskaźników (122, 127). Kształt fali tętna jest źródłem szeregu informacji dotyczących własności elastycznych naczyń tętniczych, podatności ścian oraz fal odbitych, a ponadto może służyć do uzyskania wskaźników odzwierciedlających czynność skurczową lewej komory i opisujących interakcje sercowo-naczyniowe (93) (ryc. 5).

Ryc. 5. Fala tętna

Fala tętna zarejestrowana na tętnicy promieniowej (po stronie lewej) oraz aortalna (po prawej), ekstrapolowana na podstawie matematycznej funkcji przejścia.

Promieniowa fala tętna jest kalibrowana na podstawie pomiarów ciśnienia tętniczego metodą konwencjonalną (obwodowe skurczowe - CTKs i rozkurczowe - CTKr ciśnienie tętnicze krwi), aortalna fala tętna jest kalibrowana na podstawie średniego ciśnienia tętniczego, uzyskiwanego jako całka fali tętna, zakładając, iż średnie ciśnienie tętnicze jest identyczne w obydwu miejscach.

Ao-CTKs, Ao-CTKr, aortalne skurczowe i rozkurczowe ciśnienie; ED, ejection duration - czas trwania wyrzutu z lewej komory serca; P1, P2, odpowiednio pierwszy i drugi skurczowy szczyt na ramieniu wstępującym fali tętna; CAP, centralne wzmocnienie fali – stopień wzrostu ciśnienia ponad P1 spowodowany powrotem fali odbitej; TP2, czas do szczytu fali odbitej.



Tonometria aplanacyjna ze sfigmokardiografią pozwala na precyzyjną ocenę ciśnień panujących w tętnicach elastycznych w czasie pracy serca (122). Promieniste rozciągnięcie aorty wstępującej przez wtłaczaną do niej krew z lewej komory wywołuje falę ciśnieniową, która wędruje z określoną prędkością wzdłuż aorty i wszystkich jej rozgałęzień. Wyróżnia się tu: a) tętno objętościowe, czyli samo rozciągnięcie aorty, b) tętno ciśnieniowe, a więc zwiększenie napięcia sprężystego ściany aorty i wzrost ciśnienia w jej świetle, oraz c) tętno przepływowe spowodowane przyspieszeniem prądu krwi (96). Wraz z rejestrowanym tonometrycznie wykresem składowej ciśnieniowej fali tętna uzyskujemy parametry opisujące własności jej ściany takie jak: wartości ciśnienia skurczowego, rozkurczowego, średniego oraz tętna na obwodzie wraz z możliwością oceny tych parametrów z ekstrapolowanej aortalnej fali tętna. Ciśnienie tętnicze krwi charakteryzują dwie składowe: stała, jaką jest średnie ciśnienie tętnicze oraz pulsacyjna, związana z cyklicznymi wahaniami wokół wartości średniej, stanowiąca różnicę między ciśnieniem skurczowym i końcowo-rozkurczowym, a określana jako ciśnienie tętna. Wysokość ciśnienia tętna (wg ryciny 5, $PP = Ao-CTKs - Ao-CTKr$ mmHg) przy danej objętości wyrzutowej jest uwarunkowana głównie stopniem usztywnienia dużych elastycznych tętnic oraz ilością i szybkością powrotu w kierunku serca fal odbitych z obwodu (44).

W wielu obserwacjach klinicznych wykazano, że podwyższone ciśnienie tętna szczególnie u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, jest niezależnym czynnikiem ryzyka epizodów sercowo - naczyniowych, a u osób po 50 roku życia pozwala przewidywać ryzyko incydentu sercowo - naczyniowego (62, 173). Zastosowanie sfigmokardiografii umożliwia w prosty sposób ocenę ciśnienia skurczowego i ciśnienia tętna w aorcie, które to są dokładniejszym odzwierciedleniem obciążenia następczego niż wartości CTK zmierzone na tętnicy ramiennej.

Uwidocznienie momentu powrotu fali tętna na krzywej ciśnieniowej umożliwia zmierzenie takich wskaźników, jak czas do powrotu fali odbitej i wskaźnik wzmocnienia amplitudy fali skurczowej. Wskaźnik wzmocnienia ciśnienia (AIx - Augmentation Index, wg ryciny 5, $AIx = P_2 - P_1 / PP$ %) odzwierciedla w jakim stopniu fala odbita podnosi ciśnienie skurczowe (107). Wskazuje on na stopień rozszerzalności ściany naczyniowej i odzwierciedla prędkość fali tętna oraz czas do powrotu fal odbitych z obwodu (32).

Przeprowadzone badania potwierdziły jego przydatność w ocenie wpływu wieku na przebudowę ściany dużych tętnic. Badanie Kellego i wsp. (91) z zastosowaniem tonometrii aplanacyjnej u osób w wieku od 2-91 lat, wykazało wzrost z wiekiem wartości ciśnienia tętna w dużych tętnicach oraz wskaźnika wzmocnienia ciśnienia tętna w tętnicy szyjnej wspólnej. Pomiędzy pierwszą a ósmą dekadą życia, ciśnienie tętna w tętnicy szyjnej wspólnej, promieniowej i udowej wzrosło odpowiednio o 91,3%, 67,5% i 50,1%, natomiast AIx, który w pierwszej dekadzie życia wynosił 1,6%, wzrósł do 16,5% w piątej i do 24,1% w dekadzie ósmej (91). Saba i wsp. (142) oceniali zależność pomiędzy wskaźnikiem wzmocnienia w aorcie a ocenianymi ultrasonograficznie wskaźnikami elastyczności tętnicy szyjnej wspólnej oraz echokardiograficznymi parametrami przerostu lewej komory serca. Pacjenci zakwalifikowani do badania, zostali podzieleni na dwie grupy w oparciu o dodatnią lub ujemną wartość AIx na tętnicy szyjnej wspólnej. U osób z dodatnią wartością AIx wykazano znamienne wyższe wartości wskaźników przerostu lewej komory mięśnia serca. Również grubość kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa (IMT - Intima-media thickness) tętnicy szyjnej wspólnej była znamienne większa u badanych z dodatnią wartością AIx (142). Weber i wsp (183) wykazali, że AIx jest niezależnym markerem choroby niedokrwiennej serca. Stąd analiza fali tętna jest uznaną metodą badania własności elastycznych naczyń tętniczych (45, 94, 107, 123, 152, 187, 189).

Zwiększenie grubości błony wewnętrznej tętnic sprężystych i mięśniowo – sprężystych jest najwcześniejszym objawem przebudowy ściany naczyniowej. Istotne miejsce w ocenie stopnia degeneracji ściany naczyniowej zajmuje pomiar grubości ściany naczynia przy zastosowaniu ultrasonografii (USG). Błony wewnętrzna i środkowa są widoczne w ultrasonogramie jako jasna i ciemna linia, których grubość możemy zmierzyć w powierzchownie położonych tętnicach (192). W tętnicy szyjnej wspólnej u młodych, zdrowych osób grubość IMT wynosi ok. 400 μ m, i zwiększa się stopniowo wraz z wiekiem (o ok. 10 μ m na rok). U starszych osób chorujących na nadciśnienie tętnicze osiąga wartość powyżej 1 mm. Szereg obserwacji klinicznych i epidemiologicznych ugruntowało znaczenie wzrostu IMT jako wczesnego markera rozwoju miażdżycy oraz czynnika ryzyka incydentów sercowo - naczyniowych (192). Nieinwazyjność i powtarzalność pomiarów IMT,

szczególnie w zakresie ściany dalszej tętnicy szyjnej wspólnej czyni tę metodę doskonałym narzędziem rozpoznawania wczesnych zmian miażdżycowych (192).

Czynniki warunkujące przebudowę ściany naczyniowej

Zmiany w strukturze i funkcji ściany naczyniowej są procesem złożonym i wieloczynnikowym. Ściana naczyń krwionośnych stanowi aktywny i integralny narząd o własnościach endokrynnych i parakrynnych. Jej przebudowa (remodeling) jest procesem zależnym od interakcji zachodzących pomiędzy lokalnie produkowanymi przez śródbłonek czynnikami wzrostu i substancjami wazoaktywnymi oraz sytuacją hemodynamiczną (68). W procesie przebudowy uczestniczą elementy odpowiedzi zapalno - immunologicznej (migracja leukocytów, monocytów, makrofagów), elementy angiogenezy (migracja i proliferacja komórek mięśni gładkich, perycytów, fibroblastów, nadprodukcja białek podścieliska), oraz nasilenie procesów mnożenia komórek i ich obumierania w procesie apoptozy (52).

W wyniku przebudowy ściany naczyniowej dochodzi do zmian czynnościowych i strukturalnych tętnic. Zmiany czynnościowe polegają na wzroście napięcia ściany oraz zmianie funkcji śródbłonka (144). W dużych tętnicach, w reakcji na podwyższone ciśnienie tętnicze, przebudowa ściany naczyniowej przebiega początkowo pod postacią zmian adaptacyjnych do nowych warunków hemodynamicznych, a następnie prowadzi do jej uszkodzenia (usztynienia) z wczesnym rozwojem blaszek miażdżycowych, co skutkuje spadkiem podatności i rozszerzalności (73). Poszerzenie światła tętnic elastycznych (aorta, tętnice szyjne, tętnice biodrowe) dominuje nad pogrubieniem ich ściany. Średni wewnętrzny promień aorty wstępującej, mierzony w okresie skurczu, wzrasta u ludzi w wieku 20-60 lat o około 9% w ciągu dekady życia, co częściowo kompensuje zmniejszenie jej podatności (72).

Wzrost sztywności ścian naczyń tętniczych jest procesem zaburzającym przede wszystkim funkcję powietrzni, co doprowadza do upośledzenia rzutu serca (na skutek wzrostu wartości ciśnienia skurczowego i ciśnienia tętna) oraz spadku perfuzji rozkurczowej mięśnia sercowego. Nie prowadzi on natomiast do upośledzenia funkcji przewodzącej naczyń. Usztynienie naczyń jest procesem rozlanym, pierwotnie zlokalizowanym w obrębie błony środkowej (125).

Kluczową rolę w procesach remodelingu odgrywa śródbłonek. Wskutek procesów upośledzających funkcję śródbłonka naczyniowego dochodzi do zmiany wielkości i kształtu oraz zmniejszenia uporządkowania i przylegania komórek, czego następstwem może być wzrost przepuszczalności, zaburzenie laminarnego przepływu krwi oraz gromadzenie się lipidów (72). Dochodzi do penetracji krwi do ściany naczynia, niedoboru czynników przeciwplatekcyjnych, naczyniorozszerzających i antymitotycznych. Równolegle nasileniu ulega generacja czynników aktywujących przebudowę i działających mitogennie (52, 68).

Niszczący wpływ cyklicznie powtarzającej się siły o charakterze pulsacyjnym na elementy elastyczne ścian naczyń, wraz z wiekiem i innymi czynnikami ryzyka, prowadzi do postępującej degeneracji elementów elastycznych błony środkowej, połączonej z odkładaniem się kolagenu i mukopolisacharydów oraz pogrubieniem warstwy mięśniowej (73, 122, 138).

Degeneracja włókien elastyny ma najistotniejsze znaczenie w procesie przebudowy ścian naczyń. Jest ona skutkiem jej zużycia, w następstwie cyklicznie powtarzanych naprężeń w czasie każdego wyrzutu krwi z serca, z poszerzeniem o około 10% światła aorty i innych dużych sprężystych tętnic. Mimo iż elastyna charakteryzuje się dużą wytrzymałością, to po upływie około 25-30 lat zaczyna wykazywać cechy degeneracji. Dochodzi do wzrostu zawartości bardziej polarnych aminokwasów, zmniejszenia glikozaminoglikanów i proteoglikanów oraz odkładania się soli wapnia (49, 72).

Kolagen mimo swej znacznej sztywności, również podlega zmianom w procesie starzenia - dochodzi do zmniejszenia stopnia skręcenia jego łańcuchów, skrócenia ich efektywnej długości oraz wzrostu ilości wiązań krzyżowych. Wymienione zmiany prowadzą do dodatkowego usztywnienia struktury kolagenu, pogorszenia rozpuszczalności oraz zwiększenia wrażliwości na trawienie enzymatyczne. Ponadto w reakcji na podwyższone napięcie mechaniczne komórki mięśniówki gładkiej zwiększają syntezę jego włókien, co prowadzi do wzrostu ilości kolagenu, głównie typu I, III, IV i V, w ścianie naczynia (49).

Obciążenie mechaniczne ściany naczyń prowadzi do zwiększenia masy komórek mięśniówki gładkiej (52). W zakresie funkcji receptorów dochodzi do zmniejszenia

wrażliwości receptorów beta-adrenergicznych, z następowym obniżeniem podatności naczyńowej. Funkcja receptorów alfa-adrenergicznych nie ulega zmianie (73). Zmiany degeneracyjne zachodzące w tętnicach stanowią podłoże do rozwoju miażdżycy. Procesowi temu sprzyjają współistniejące z nadciśnieniem liczne zaburzenia metaboliczne, jak oporność na insulinę, hiperinsulinemia i dyslipidemia. Istnieje kilka teorii związku pomiędzy sztywnością naczyń a aterogenezą. Po pierwsze, miażdżycza tętnic może prowadzić do upośledzenia własności elastycznych naczyń. Po drugie, zwiększona sztywność naczyń może prowadzić do mikrouszkodzeń ściany naczyńowej a w konsekwencji do rozwoju miażdżycy. Trzecia teoria zakłada wspólną rolę procesu usztywnienia naczyń i aterogenezy. I wreszcie - oba te procesy mogą zachodzić równocześnie (175). Powstawanie płytek miażdżycowych w ścianach naczyń jest przykładem choroby uszkadzającej głównie funkcję przewodzącą dużych tętnic. Poprzez zwężenie ich światła dochodzi do upośledzenia ukrwienia, a w dalszej kolejności do zawałów niedokrwiennych docelowych narządów i tkanek. Miażdżycza jest procesem ogniskowym, który charakteryzuje się akumulacją lipidów, włókien kolagenu i elementów komórkowych oraz tworzeniem zakrzepów w obrębie błony wewnętrznej (125), co stanowi dodatkowe miejsca odbicia fal i prowadzi do ich szybszego powrotu do aorty.

Wiek i nadciśnienie tętnicze są uznanymi czynnikami prowadzącymi do przebudowy ściany naczyńowej, ponadto rolę w tym procesie odgrywają płeć męska (139), palenie tytoniu (174) i szereg innych schorzeń z cukrzycą na czołe (10, 28, 89, 143). Upodobania dietetyczne, w tym spożycie soli (NaCl) mogą wpływać na mechanizmy przebudowy ściany tętniczej. Na podstawie badań na zwierzętach wykazano, że zwiększona podaż sodu wiąże się ze zmianą napięcia mięśni gładkich poprzez modyfikację pracy pomp sodowo – potasowych, mechanizmy wymiany wapnia, aktywność układu sympatycznego oraz działanie czynników natriuretycznych (145). W badaniu Avolio i wsp. wysokie spożycie sodu wiązało się z mniejszą podatnością naczyń niezależnie od wysokości ciśnienia tętniczego (13). Warto podkreślić, iż osoby sodowrażliwe z granicznym nadciśnieniem tętniczym wykazywały mniejszą podatność i rozszerzalność aorty oraz tętnic ramiennej i udowej w porównaniu do osób niewrażliwych na sól. Cecha sodowrażliwości ciśnienia tętniczego u osób normotensyjnych kojarzy się ze zwiększoną reaktywnością naczyńową na substancje presyjne (82). Na podstawie szeregu przeprowadzonych badań postuluje

się, że wpływ sodu na własności lepko – sprężyste naczyń tętniczych jest niezależny od wieku i wysokości ciśnienia tętniczego (55, 58, 145).

Szereg wymienionych czynników wpływających na wzrost sztywności naczyń tętniczych tylko w części tłumaczą zmienność występowania tego zjawiska. Stąd wzrasta liczba badań potwierdzających wpływ genetycznego podłoża na zmianę struktury a co za tym idzie i funkcji ściany naczyniowej (11). Badania bliźniąt dowodzą, iż niezależnie od ciśnienia tętniczego, częstości akcji serca, wzrostu i wieku dziedziczność wskaźnika wzmocnienia ciśnienia tętniczego wynosi 37% (153). Specyficzne podłoże genetyczne może wpływać na podatność ściany naczyniowej na działanie szkodliwych czynników, jak nadciśnienie tętnicze, starzenie się, dyslipidemia, palenie tytoniu czy duża zawartość sodu w diecie. Innymi słowy, przy tym samym poziomie ryzyka, stopień przebudowy i zaburzenia funkcji naczyń może być bardziej lub mniej nasilone w zależności od genotypu. Identyfikacja takich genetycznych markerów jest wyzwaniem dla współczesnej nauki, bowiem może wskazać pacjentów zwiększonego ryzyka. Obecnie badania wpływu czynników genetycznych na układ naczyniowy zmierzają w kierunku analizy polimorfizmów genów kodujących białka związanych z funkcjonowaniem układu sercowo - naczyniowego czyli genów kandydatów.

Geny syntazy aldosteronu i α adducyny poprzez swoje produkty białkowe – aldosteron i adducynę - wpływają na regulację poziomu sodu w ustroju. Z badań epidemiologicznych wynika, że ilość spożywanego sodu może być głównym czynnikiem warunkującym obserwowane różnice w wartościach ciśnienia tętniczego pomiędzy populacjami oraz stanowić przyczynę wzrostu CTK z wiekiem w społeczeństwach o wysokim spożyciu soli (111). Zwiększona podaż sodu wpływa niekorzystnie na strukturę i funkcję ściany naczyniowej, a wpływ ten jest niezależny od wartości ciśnienia tętniczego (12).

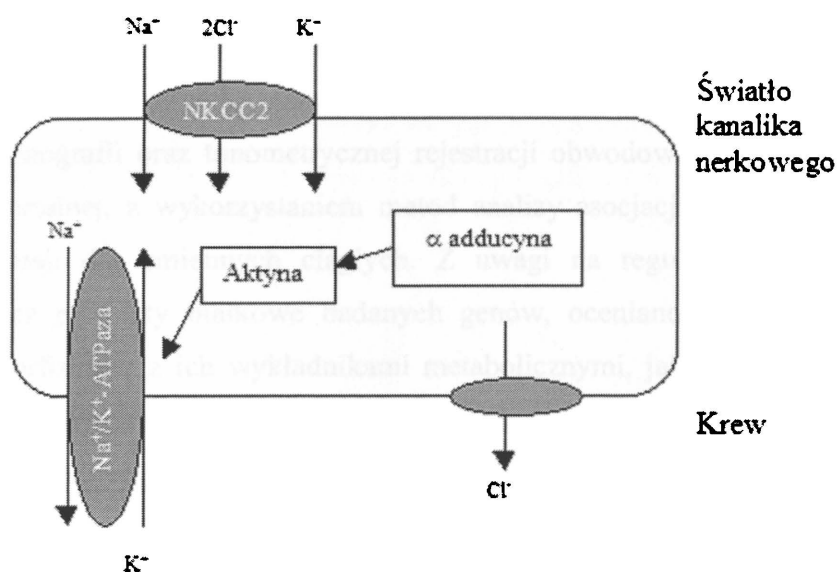
Aldosteron jest mineralokortykosterydem produkowanym w warstwie kłębkowatej kory nadnerczy w odpowiedzi na stymulację poprzez angiotensynę II. Jest szereg dowodów na to, że jest on również syntetyzowany w mięśniu sercowym oraz w śródbłonku i mięśniach gładkich naczyń tętniczych (104). Aldosteron powoduje włóknienie miokardium, tętnic i nerek u pacjentów z miażdżycą tętnic, niewydolnością serca, niewydolnością nerek, zwłaszcza przy współistniejącym

nadciśnieniu tętniczym (104). Odkryty przez White'a (184) polimorfizm C-344T regionu wiązania czynnika transkrypcyjnego SF-1 w promotorze genu syntazy aldosteronu (CYP11B2) może powodować różnicę w ekspresji genu, a przez to wpływać na aktywność enzymu zmieniając natężenie syntezy aldosteronu. Wzrost stężenia aldosteronu prowadzi do redukcji podatności tętnic u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (24). Badania nad związkiem osoczkowego bądź wydalanego z moczem aldosteronu z polimorfizmem genu CYP11B2 nie są jednoznaczne. Są bowiem dowody na to, iż wyższy poziom aldosteronu we krwi jest związany z obecnością allelu -344C (134) lub allelu -344T (129). Obecność tego ostatniego również wiąże się ze wzrostem wydalanego z moczem aldosteronu (51, 77). Wyniki badań nad związkiem tego polimorfizmu z ciśnieniem tętniczym wyrażanym jako zmienna ciągła lub kategoryczna również nie są jednoznaczne (31, 51, 77, 97, 134, 167). Rozbieżności wyników tych badań mogą wynikać z faktu, że tylko w niektórych z wymienionych badań uwzględniono poziom spożywanego sodu w diecie, który odgrywa rolę w regulacji syntezy aldosteronu zarówno w steroidogennych komórkach, jak i w ścianie naczynia (161, 166).

Istotną rolę w regulacji transportu sodu w komórkach nabłonka kanalików nerkowych odgrywa białko cytoszkieletu – adducyna, która bierze udział w transporcie jonów przez błony komórkowe, transdukcji sygnału oraz komunikacji międzykomórkowej (22). Adducyna zbudowana jest z podjednostek α i β lub α i γ . Podjednostki α i γ adducyny są zlokalizowane w błonach komórkowych tkanek całego ustroju, natomiast podjednostka β znajduje się głównie w mózgu i narządach erytropoetycznych (69, 116). W badaniu nad białkiem α adducyny wykorzystano doświadczalne modele nadciśnienia u zwierząt. Nadciśnienie u szczurów szczepu mediolańskiego (MHS) wykazuje zależność od diety bogatosodowej. Szczury tego szczepu mają mniejszą masę nerek i mniejszą liczbę nefronów. Nadciśnienie spowodowane jest u nich mutacją genu α adducyny, co skutkuje łatwą fosforylacją i aktywacją produktu białkowego. Zmutowana adducyna reguluje aktywność białek kurczliwych biorących udział w transporcie Na^+/K^+ -ATPazy z cytoplazmy do błony komórkowej, prowadząc do aktywacji pompy sodowo - potasowej co stanowi siłę napędzającą wzmożonej reabsorpcji sodu w kanalikach nerkowych (ryc. 6) (118).

Ryc. 6. Mechanizm działania zmutowanej α adducyny u szczurów szczepu mediolańskiego, zmodyfikowano według (118)

NKCC2 – Na-K-2Cl kotransport.



U ludzi polimorfizm genu α adducyny polega na transwersji G(614)T, a w konsekwencji na zastąpieniu, w produkcie białkowym genu, glicyny w pozycji 460 przez tryptofan (Gly460Trp) (170). Znaczenie badanego polimorfizmu w modulowaniu fenotypów układu sercowo - naczyniowego było przedmiotem wielu badań populacyjnych i klinicznych. Stwierdzono związek pomiędzy pojedynczym polimorfizmem genu α adducyny Gly460Trp, bądź w kombinacji z mutacjami w obrębie innych genów, takich jak: gen podjednostki β adducyny, gen enzymu konwertującego angiotensynę, czy gen syntazy aldosteronu, a rozprzeczaniem nadciśnienia tętniczego (158), poziomem kreatyniny w osoczu (181), czy częstością występowania proteinurii (181), a także grubością IMT w tętnicy udowej (15) i rozszerzalnością dużych tętnic oraz ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych (137). Badania nad związkiem tzw. „nadciśnieniowego” wariantu, czyli 460Trp, α adducyny nie są jednoznaczne, to jednak związek wariantu genu z nadciśnieniem tętniczym u pacjentów niskoreninowych w różnych populacjach wydaje się być spójny (22).

Przedmiotem podjętego badania jest analiza związku między polimorfizmem dwóch genów kandydatów, syntazy aldosteronu i α adducyny, a wartością ciśnienia

tego krwi mierzonego manometrem rtęciowym oraz w całodobowej atycznej rejestracji. Obecne badania z zakresu genetyki nadciśnienia tętniczego zmierzają w kierunku oceny uwarunkowań genetycznych fenotypów powiązanych z ciśnieniem tętniczym. Wobec powyższego szczególnym celem analizy jest związek polimorfizmów obydwu genów ze stopniem przebudowy i właściwościami elastycznymi dużych naczyń tętniczych ocenianych przy zastosowaniu ultrasonografii oraz tonometrycznej rejestracji obwodowej fali tętna i ekstrapolacji fali aortalnej, z wykorzystaniem metod analizy asocjacji oraz testu nierównowagi transmisji dla zmiennych ciągłych. Z uwagi na regulację gospodarki sodowej poprzez produkty białkowe badanych genów, oceniano związek poszczególnych polimorfizmów z ich wykładnikami metabolicznymi, jak również wpływ poziomu sodu na modulację związku polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu i Gly460Trp genu α adducyny ze strukturą i funkcją dużych naczyń tętniczych.

Cele pracy

1. Określenie częstości występowania poszczególnych alleli genu α adducyny i genu syntazy aldosteronu w populacji regionu krakowskiego oraz porównanie częstości występowania alleli polimorficznych badanych genów u chorych z nadciśnieniem tętniczym i normotoników.
2. Ocena związku polimorfizmów genu α adducyny i syntazy aldosteronu z parametrami określającymi stopień przebudowy i właściwości elastyczne dużych naczyń tętniczych oraz z wartością i profilem dobowym ciśnienia tętniczego krwi.

Material i Metodyka

Badana populacja

Praca została zrealizowana w ramach Programu Międzynarodowej Współpracy Naukowo – Technicznej pomiędzy Polską a Flandrią, dotyczącego badań nad związkiem polimorfizmów wybranych genów kandydatów nadciśnienia tętniczego z własnościami elastycznymi dużych naczyń tętniczych. Program jest kontynuacją badania grupy 86 rodzin zrekrutowanych w ramach europejskiego projektu, dotyczącego badań nad dziedzicznością nadciśnienia tętniczego – European Project on Genes in Hypertension (EPOGH) (87, 88, 99).

Do badania EPOGH włączono rodziny dwupokoleniowe, czyli rodziny nuklearne, o określonej strukturze: rodzic lub rodzice i co najmniej dwoje dzieci. Poza tym kryterium włączenia był wiek członków rodziny od 18 do 60 lat. Spośród populacji ogólnej zostało zrekrutowanych 55 rodzin, a kolejne 31 stanowiły rodziny pacjentów Poradni Nadciśnieniowej I Kliniki Kardiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Rodziny z populacji ogólnej zostały wybrane spośród mieszkańców Miasta i Gminy Niepołomice, regionu rolniczo-przemysłowego, położonego w pobliżu Krakowa. Wyboru osób dokonywano na zasadzie losowania na podstawie list wyborczych, metodą warstwową, proporcjonalną, przy zastosowaniu tabel liczb losowych, gdzie warstwy stanowiło dziesięć okręgów wyborczych na terenie Gminy Niepołomice. Wylosowane osoby otrzymały drogą listowną szczegółowe informacje o charakterze i celu badania oraz warunkach uczestnictwa w badaniu. Spośród 500 wylosowanych osób, kontakt był możliwy z 464 osobami. Odpowiednią dla badania strukturę rodziny stwierdzono u 101 osób. Natomiast zgodę na udział w badaniu wyraziło 55 rodzin (54.5%). Pacjentów Poradni Nadciśnieniowej wraz z rodzinami rekrutowano przez kolejne 6 miesięcy. Pacjenci spełniający kryteria wiekowe i posiadający wymaganą strukturę rodziny byli informowani przez lekarza w Poradni Nadciśnieniowej o możliwości udziału w badaniu. Odpowiedź pozytywną otrzymano od 32 rodzin, jednak dane jednej rodziny zostały z analizy wykluczone na skutek rozpoznanej wtórnej postaci nadciśnienia tętniczego u jednego z potomków. W efekcie, w grupie badanej znalazło się 31 rodzin pacjentów Poradni Nadciśnieniowej.

Ostatecznie do badania EPOGH włączono 326 osób (141 osób z pokolenia rodziców oraz 185 z pokolenia dzieci) (88).

Po dwóch latach od zakończenia programu EPOGH rozpoczęto kolejny etap badania zrekrutowanej grupy (Projekt Współpracy Polska - Flandria). Szczegółowe informacje o charakterze i celu badania oraz warunkach uczestnictwa w tej fazie badania do wszystkich 86 rodzin przekazano drogą listowną. W kolejnym etapie, po uzyskaniu wstępnej zgody na udział w badaniu, ustalano termin wizyty domowej. Podczas tej wizyty ponownie udzielano informacji na temat badania, ze szczegółowym omówieniem protokołu. Wszyscy biorący udział w badaniu udzielili pisemnej zgody na uczestnictwo w badaniu.

Z 86 rodzin EPOGH 3 rodziny ($n = 12$) wykluczono z udziału w kolejnym etapie z uwagi na brak zgody (2 rodziny) lub migrację dzieci, na skutek czego jedna rodzina nie spełniała kryteriów rodziny nuklearnej. Kolejne 12 osób z pozostałych rodzin nie zostały przebadane z powodu migracji. Ostatecznie badaniu poddano 302 osoby z 83 rodzin nuklearnych (93% populacji EPOGH). Z analizy dotyczącej fenotypu naczyniowego zostało wyłączonych 8 osób: 4 osoby z powodu niezadowalającej jakości zapisu fali tętna; 2 osoby z uwagi na brak jednego bądź dwóch genotypów oraz 2 osoby z powodu ujawnionej niezgodności w segregacji Mendlowskiej. Analizą statystyczną objęto więc grupę 294 osób w tym 133 osoby z pokolenia rodziców oraz 161 ich dorosłych dzieci.

Protokół badania

Badanie przebiegało według następującego schematu:

- Wizyta domowa:

- informacja o badaniu;
- pisemna zgoda na udział w badaniu;
- pięciokrotny pomiar ciśnienia tętniczego sfigmomanometrem rtęciowym,
- pomiar częstości tętna;
- standardowy kwestionariusz;
- pomiary tonometryczne obwodowej fali tętna;

- informacja o prewencji chorób układu sercowo - naczyniowego i/lub niefarmakologicznych metodach leczenia nadciśnienia tętniczego;

- Wizyta ambulatoryjna:

- odbiór dobowej zbiórki moczu oraz świeżej (porannej) próbki moczu;
- pobranie krwi w celu wykonania oznaczeń biochemicznych;
- badanie fizykalne;
- pomiary antropometryczne: wzrost, ciężar ciała, obwód talii i bioder;
- założenie aparatu do całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego;
- ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych;

- Wysyłanie wyników badania do uczestników drogą listowną.

U wszystkich uczestników programu, na podstawie badania fizykalnego oraz wywiadu lekarskiego i przeprowadzonych badań laboratoryjnych oraz ewentualnie badań obrazowych wykluczono wtórny charakter nadciśnienia tętniczego.

Protokół badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego (nr zgody KBET/9/B/2001 z dnia 18.01.2001 oraz przedłużenie zgody nr KBET/9/B/2001 z dnia 21.02.2002).

Badane fenotypy

Pomiar ciśnienia tętniczego sfigmomanometrem rtęciowym

Pomiarów ciśnienia tętniczego dokonano sfigmomanometrem rtęciowym, zgodnie z wytycznymi British Society of Hypertension (BSH) (131). Podczas wizyty domowej wykonywano pięć pomiarów w odstępach 1 - 2 minutowych, w pozycji siedzącej, na niedominującym ramieniu. Wszystkie pomiary wykonało dwóch lekarzy dodatkowo przeszkolonych wg zasad BSH, którzy pozytywnie zaliczyli test powtarzalności wyników pomiaru ciśnienia tętniczego. Dodatkowo, przeprowadzono kontrolę jakości uzyskanych danych (test *digit preference* (99) z pozytywnym wynikiem dla obu badaczy. Wartość ciśnienia tętniczego w pomiarach tradycyjnych obliczono jako średnią z 5 pomiarów uzyskanych w warunkach domowych. Obwodowe ciśnienie tętna (PP_{obw}) definiowano jako różnicę ciśnienia skurczowego i rozkurczowego. Średnie ciśnienie tętnicze (MAP - Mean Arterial Pressure) dla danej osoby wyliczano jako sumę ciśnienia rozkurczowego (CTK_R) oraz jednej trzeciej PP_{obw} .

Nadciśnienie tętnicze rozpoznawano, jeżeli wartość ciśnienia tętniczego skurczowego lub rozkurczowego w pomiarach tradycyjnych (sfigmomanometrem rtęciowym) była równa lub większa, odpowiednio od 140 mmHg czy 90 mmHg, lub jeżeli osoba zażywała leki przeciwnadciśnieniowe.

Automatyczny całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego krwi

Dokładnej oceny wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz jego profilu dobowego dokonywano przy użyciu całodobowego automatycznego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi (ABPM - Ambulatory Blood Pressure Monitoring) aparatem SpaceLabs 90207 (Redmond, WA, USA). Pomiary ciśnienia i tętna były wykonywane co 15 minut w ciągu dnia (od 6.00 do 22.00) i co 30 minut w nocy (od 22.00 do 6.00). U każdego badanego położenie mankietu weryfikowano przez porównanie wyników pomiaru automatycznego i poprzedzającego go pomiaru sfigmomanometrem rtęciowym (dopuszczalna różnica ≤ 5 mmHg). Przy analizie danych wykorzystano kryteria eliminacji pomiarów niewiarygodnych zaproponowane przez Staessena i wsp. (156). Przyjęto, że pomiarami niewiarygodnymi były te, w których:

- skurczowe CTK przekraczało 240 mmHg lub było niższe niż 50 mmHg;
- rozkurczowe CTK było wyższe od 140 mmHg lub poniżej 40 mmHg;
- ciśnienie tętna (różnica między skurczowym i rozkurczowym CTK) było mniejsze niż 10 % wartości CTK skurczowego;
- częstość tętna była większa niż 150/min lub niższa niż 40/min.

Na podstawie uzyskanych zapisów oceniano średnie wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego z okresu dnia, nocy i całej doby jak również obniżkę nocną ciśnienia skurczowego i rozkurczowego. Obniżkę nocną skurczowego lub rozkurczowego ciśnienia tętniczego obliczano jako różnicę odpowiednich średnich wartości ciśnień z okresu dnia i nocy wyrażoną jako procent ich wartości w okresie aktywności dziennej. Za miarę krótkoterminowej zmienności ciśnienia tętniczego przyjęto odchylenie standardowe wszystkich pomiarów z okresu całej doby.

Metodyka oraz interpretacja wyników całodobowego monitorowania ciśnienia krwi pozostawała w zgodności z aktualnymi wytycznymi Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (6).

Pomiary antropometryczne

Badanie fizykalne uwzględniało pomiary antropometryczne. Ciężar ciała i wzrost posłużyły do wyliczenia wskaźnika masy ciała (body mass index – BMI), a obwód pasa (mierzony na poziomie pępka) i bioder (mierzony na poziomie krętarzy większych) do oceny wskaźnika talia-biodra (waist to hip ratio – WHR).

Standardowy kwestionariusz

Pytania dotyczyły aktualnych i przebytych chorób, występowania nadciśnienia tętniczego oraz występowania tego schorzenia u krewnych, stosowania leków obniżających ciśnienie tętnicze i innych oraz stylu życia (w tym używek i aktywności fizycznej). Dodatkowo, od kobiet zbierano wywiad ginekologiczny (menopauza, ciążę, porody) i wywiad odnośnie stosowania preparatów zawierających hormony płciowe.

Dla każdego uczestnika badania określono dzienny poziom wysiłku fizycznego, wyrażony jako zużycie energii (kcal) przy wykonywaniu pracy zawodowej i/lub sportów (117). Dla każdego z badanych obliczono dzienne spożycie etanolu. Spożywanie alkoholu definiowano jako regularne, jeżeli dzienne spożycie było równe lub przekraczało 5 g czystego etanolu. Za regularnych palaczy tytoniu uznano osoby, które wypalały co najmniej jednego papierosa dziennie (157). Jednolita forma uzyskiwania danych dotyczących stylu życia pozwoliła na wymierną i porównawczą ocenę analizowanych później parametrów.

Badania laboratoryjne

U wszystkich badanych wykonano następujące badania laboratoryjne:

- w surowicy krwi oznaczono poziom glukozy i lipidów (cholesterol całkowity, cholesterol LDL, cholesterol HDL, triglicerydy) na czczo, poziom elektrolitów i kreatyniny;
- na podstawie 24-godzinnej zbiórki moczu określano przeciętne dobowe wydalanie sodu, potasu i aldosteronu. Wykonano również badanie ogólne moczu metodą paskową.

Z analizy danych pochodzących z 24-godzinnej zbiórki moczu wyłączono 4 osoby, ponieważ według podstawie uprzednio opublikowanych danych (155) ilość moczu była nieodpowiednia.

U badanych wykonano także oznaczenia grupy krwi w układzie ABO i Rh, w celu ewentualnego wykluczenia z analizy dzieci wychowywanych przez osoby nie będące ich biologicznymi rodzicami. U żadnej z rodzin nie zachodziła konieczność wyłączenia jej z badania na podstawie niezgodności grup krwi.

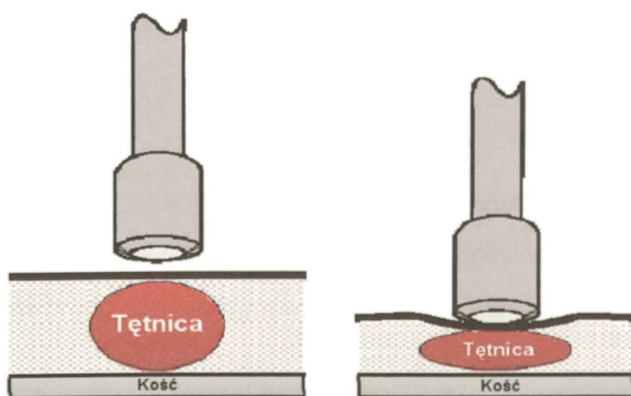
Analiza fali tętna

Do badania własności ściany naczyniowej została wykorzystana metoda analizy fali tętna (PWA - Pulse Wave Analysis), która umożliwia nieinwazyjną ocenę zarówno obwodowej, jak i aortalnej fali tętna. Technika badania kształtu aortalnej fali tętna zależy w dużym stopniu od dokładnej rejestracji promieniowej fali tętna, jej kalibracji na podstawie ciśnień na tętnicy ramiennej a następnie przekształcenia jej przy zastosowaniu matematycznej funkcji przejścia (transfer function), stanowiącej podstawę oprogramowania komputerowego urządzenia SphygmoCor.

Rejestracja fali tętna

Po 5 minutowym odpoczynku badanego dokonywano 8 sekundowej tonometrycznej rejestracji fal tętna za pomocą czujnika ciśnieniowego (Micro-Tip pressure transducer Model SPT-301, Millar Instruments, Houston, Texas, USA) wbudowanego w sondę w kształcie ołówka (4, 91, 92, 122) i sprzężonego z przenośnym komputerem typu laptop z oprogramowaniem SphygmoCor, wersja 6.31 (AtCor Medical Pty., Ltd., Australia) (4, 92, 122). Obudowa czujnika powoduje, że jego niewielka powierzchnia odbiorcza (0,5 x 1,0 mm, z częstotliwością odbioru > 2kHz) zwiększa się do 7 mm średnicy, co ułatwia utrzymanie kontaktu ze skórą znajdującą się nad badanym naczyniem tętniczym (ryc. 7 wg (4)).

Ryc. 7. Położenie czujnika w trakcie badania metodą tonometrii aplanacyjnej



Właściwe spłaszczenie ściany naczynia tętniczego ułatwia kontakt tętnicy promieniowej z kością promieniową (127). Wektor ciśnienia przekształcany był przez przetwornik w sygnał elektryczny, co umożliwiało rejestrację kształtu ciśnieniowej fali tętna (122). Ze względu na stosunkowo małą powierzchnię czujnika tonometru w stosunku do badanej tętnicy zapis fali tętna może ulegać zniekształceniu (92). Najczęstsze przyczyny to:

- ruchy badającego lub badanego w trakcie rejestracji powodujące powstanie artefaktów na krzywej zapisu;
- użycie zbyt dużej siły nacisku do spłaszczania ściany naczynia, co powoduje zniekształcenie fali w fazie rozkurczowej z ostrym, ujemnym zagięciem przed kolejną fazą skurczową albo odwrócenie fali w fazie skurczowej;
- nie zachowanie właściwego kąta pomiędzy tonometrem a badanym naczyniem (czujnik powinien być przyłożony prostopadle do długiej osi badanego naczynia), zmiana kąta powoduje zniekształcenie skurczowej części fali.

Możliwość wystąpienia tych zniekształceń eliminowano poprzez zapewnienie badanemu i badającemu komfortowych warunków w trakcie pomiaru. Ponadto, w celu uzyskania powtarzalności wyników (89) badacz odbył 8 tygodniowe szkolenie w wysokospecjalistycznym ośrodku w Belgii na Uniwersytecie w Gandawie (kierownik szkolenia Prof. L. Van Bortel) z zakresu nowoczesnych metod badania właściwości ścian naczyń tętniczych przy użyciu SphygmoCor Pulse Wave Analysis System.

Oprogramowanie SphygmoCor przeprowadza dodatkowo wewnętrzną walidację uzyskanej fali tętna, eliminując zapisy, w których skurczowa lub rozkurczowa wariancja przekracza 5% lub gdy amplituda sygnału fali tętna jest mniejsza od 80mV (4). Stąd, uzyskana fala tętna jest praktycznie identyczna z falą zarejestrowaną wewnątrznacyniowym manometrem (56, 91, 135, 146).

Kalibracja fali tętna

Uzyskaną falę kalibrowano w oparciu o wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego zmierzone sfigmomanometrem rtęciowym na tętnicy ramiennej (4, 122). Proces kalibracji fali przeprowadzano przy założeniu, że średnie ciśnienie jest

identyczne w całym układzie naczyń tętniczych oraz że ciśnienie rozkurczowe w tętnicy promieniowej jest równe ciśnieniu rozkurczowemu zmierzonemu na tętnicy ramiennej (122). Przyjęto iż wartość ciśnienia skurczowego w tętnicy promieniowej była identyczna ze zmierzoną na tętnicy ramiennej, pomijając fakt wzrostu jego wartości na odcinku pomiędzy tętnicą ramienną a tętnicą promieniową (91). Jednakże ze względu na niewielką odległość pomiędzy tymi dwoma punktami pomiarowymi zakładany błąd jest niewielki (122).

Ekstrapolacja aortalnej fali tętna

Uśredniona promieniowa fala tętna - wynik 8 sekundowej rejestracji - była podstawą do wyprowadzenia korespondującej aortalnej fali tętna (ryc. 8) przy zastosowaniu wiarygodnej uniwersalnej matematycznej funkcji przejścia (GTF - General Transfer Function) (35, 60, 86), która jest integralną częścią oprogramowania SphygmoCor (35, 60). Jest ona wyliczana na podstawie porównania składowych harmoniczných dwóch fal, zarejestrowanych odpowiednio w aorcie i tętnicy promieniowej, w zakresie amplitudy i częstotliwości, przy zastosowaniu analizy Fourierowskiej (122).

Wskaźniki sztywności ścian tętnic

W oparciu o uzyskane fale tętna (obwodową i aortalną) obliczano wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego w aorcie. Obwodowy wskaźnik wzmocnienia (AIx_{obw}) zdefiniowano jako iloraz szczytów skurczowych drugiego i pierwszego na fali tętna, pomnożony przez 100% (119), natomiast aortalny wskaźnik wzmocnienia (AIx_{ao}) jako różnicę szczytów drugiego i pierwszego na aortalnej fali tętna wyrażoną jako procent ciśnienia tętna (91, 122). Ponadto oceniano aortalne ciśnienie tętna (PP_{ao}), jako różnicę ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w aorcie (122).

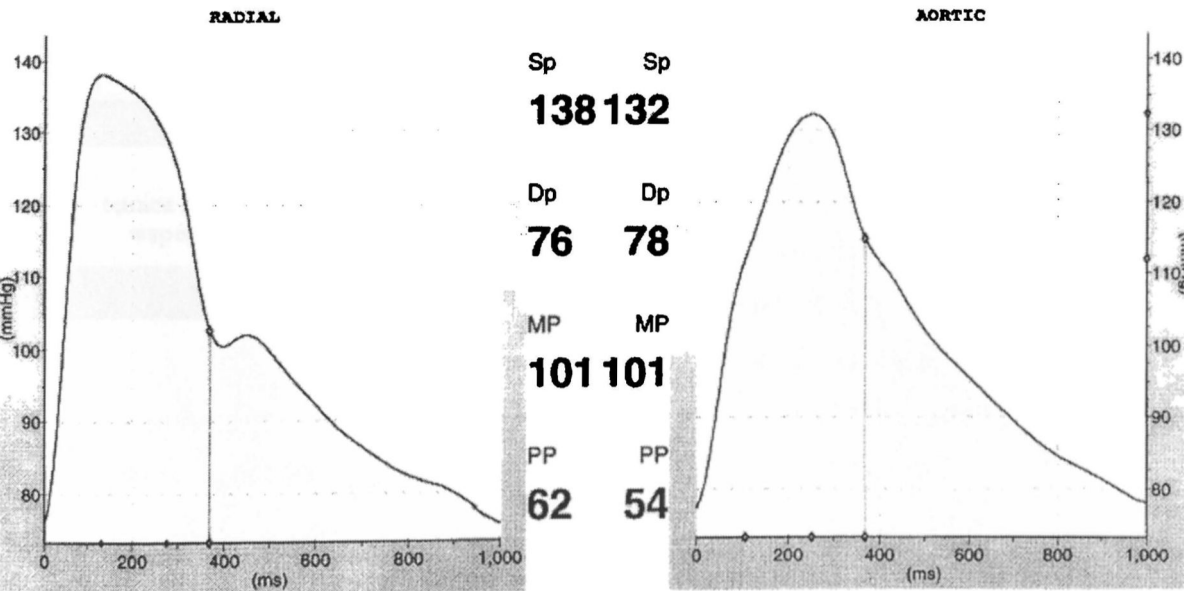
Ryc. 8 . SphygmoCor: komputerowy raport analizy tętnicy promieniowej i
ekstrapolowanej aortalnej fali tętna

PATIENT DATA

Patient Name W.W.
Patient ID
Patient Code
Age, Sex 30 FEMALE
Address :

STUDY DATA

11 Aug 2000, 8:46:18 AM Height, Weight (BMI) 175cm, 64kg (20.9 kg/m²) Operator ID:
Medication: irbesartan natrilix
Notes:



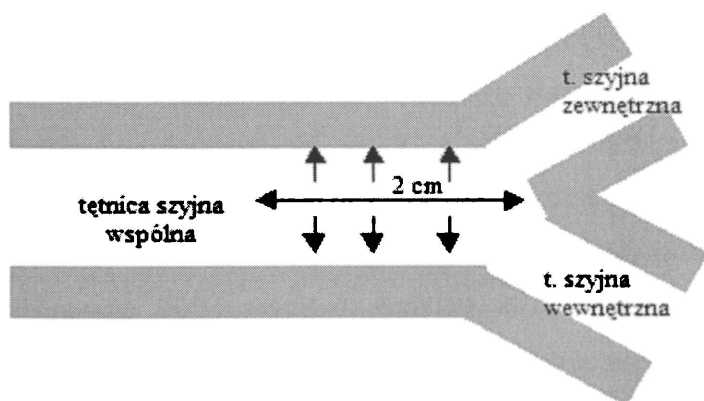
CENTRAL HAEMODYNAMIC PARAMETERS

Heart Rate, Period	59 bpm, 1023 ms	P1 Height(P1 - Dp)	35 mmHg	Buckberg SEVR (Ad/As)	140% (3520/2521)
Ejection Duration (ED)	369 ms, 36%	Augmentation (AG)	20 mmHg	MP. (Systole, Diastole)	116, 92 mmHg
Aortic T1, T2	105, 253, 135 ms	Aug. Index (AG/PP, P2/P1)	37%, 159%	End Systolic Pressure	115 mmHg

Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych

Stopień przebudowy ściany naczyniowej analizowano przy zastosowaniu ultrasonograficznej oceny grubości kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa w tętnicach szyjnych wspólnych. Pomiarów dokonywano w projekcji dwuwymiarowej w osi długiej tętnicy przy użyciu głowicy liniowej o częstotliwości 7.5 MHz (Ultrasonograf Hewlett Packard, Sonos 2000). Za kompleks IMT przyjęto warstwę hipoechogenną w obrębie ściany tętnicy ograniczonej od strony światła naczynia linią między krwią a śródbłonkiem, a od strony zewnętrznej - między błoną środkową a przydanką. Protokół badania obejmował ocenę IMT w obu tętnicach szyjnych wspólnych na ścianach bliższej i dalszej, 2 cm proksymalnie od rozwidlenia na tętnicę szyjną wewnętrzną i zewnętrzną (ryc. 9). W każdym miejscu dokonywano trzech pomiarów. Wynik stanowiący grubość IMT wyrażano w postaci średniej wszystkich pomiarów (132, 192).

Ryc. 9. Schemat projekcji pomiarów IMT w tętnicy szyjnej wspólnej



Badane genotypy

Badania genetyczne zostały wykonane w ramach projektu EPOGH (87, 88), w laboratorium Profesora G. Bianchi w Mediolanie (The Cattedra e Scuola di Nefrologia, Università Vita e Salute San Raffaele). Genomowy DNA wyizolowano z limfocytów krwi obwodowej, pobranej na wersenian dwusodowy (EDTA), za pomocą zestawu firmy QIAGEN (QIAamp DNA Blood Mini Kit).

Gen syntazy aldosteronu

Region genomu zawierający polimorfizm C–344T genu CYP11B2 został powielony w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction) przy wykorzystaniu starterów 1 i 2 przedstawionych w tabeli 1. Do reakcji amplifikacji stosowano 100 ng DNA oraz *Taq* polimerazę (ATGC Biotechnologie). Próbkę następnie poddawano denaturacji w temperaturze 94°C przez 5 minut, po czym poddawano je 35 cyklom amplifikacji: w temperaturze 94°C przez 30 sekund, 52°C przez 30 sekund, 72°C przez 30 sekund oraz jeden cykl w temperaturze 72°C przez 10 minut. Produkty PCR poddawano denaturacji w 150 µL 0.5 mol/L NaOH i 1.5 mol/L NaCl i nanoszono na nylonową membranę (N+, ICN). Membrany były następnie neutralizowane w 2 x SSC uwidaczniando w świetle UV. Do genotypowania użyto swoistych sond (3 i 4 w tabeli 1). Każda z membran nylonowych została zhybrydyzowana w 7% glikolu polietylenowym – 10% SDS w temperaturze 50°C przez 4 godziny z 100 pmol każdej z dwóch sond oraz oznakowana [γ -³²P]ATP. Membrany dwukrotnie płukano w temperaturze pokojowej w 1 x SSC przez 5 minut, oraz przez kolejne 5 minut w 0,5 x SSC w temperaturze 52°C a następnie poddano autoradiografii (30).

Tab. 1 . Startery i allele - swoiste oligonukleotydy używane do detekcji wariantów genu syntazy aldosteronu

Oligonukleotyd	Zastosowanie
1 CAGGGGGTACGTGGACATTT	Powielanie regionu –344
2 CAGGGCTGAGAGGAGTAAAA	
3 TCCAAGGCTCCCTCTCA	Genotypowanie allelu –344T
4 TCCAAGGCCCCCTCTCA	Genotypowanie allelu –344C

Gen α adducyny

Do wyodrębnienia polimorfizmu Gly460Trp α adducyny użyto ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) z zastosowaniem 5' nukleazy. W tabeli 2 zestawiono starter sensowny i antysensowny (1 i 2 oligonukleotydy) oraz próbki regionów 460Gly i 460Trp (odpowiednio 3, 4 oligonukleotydy) użytych do genotypowania. Mieszanina reakcyjna do PCR zawierała 50 ng DNA, 300 nmol starterów oraz 100 nmol próbki FAM i 50 nmol – TETna 25 μ L (158).

Tab. 2. Startery i allele - swoiste oligonukleotydy używane do detekcji wariantów genu α adducyny

Oligonukleotyd		Zastosowanie
1	5'CGTCCACACCTTAGTCTTCGACTT	Powielanie regionu zainteresowania
2	5'GGAGAAGACAAGATGGCTGAACTC	
3	5'FAM-TTCCATTCTGCCCTTCCTCGGA-TAMRA	Genotypowanie 460 Gly
4	5'TET-TTCCATTCTGCCATTCTCGGAA-TAMRA	Genotypowanie 460 Trp

Analiza statystyczna

Do opracowania baz danych i analizy statystycznej wyników wykorzystano głównie oprogramowanie SAS System, wersja 8.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Analizę statystyczną przeprowadzono wg następującej kolejności:

1. W teście Shapiro - Wilka (PROC UNIVARIATE oprogramowania SAS) została sprawdzona zgodność rozkładu analizowanych zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym. W przypadku zmiennych niespełniających kryteriów rozkładu normalnego ($p < 0.05$), zmienne były poddawane transformacji logarytmicznej ($\log_{10}X$), co umożliwiło włączenie ich do analizy z zastosowaniem testów parametrycznych.
2. A) Charakterystykę populacji sporządzono przy zastosowaniu statystyk opisowych. Dane ilościowe przedstawiono jako średnie arytmetyczne z odchyleniem standardowym (SD) a w przypadku danych niespełniających

kryteriów normalności rozkładu jako średnie geometryczne z przedziałem ufności (95% CI). Zmienne jakościowe zostały przedstawione jako proporcje.

B) Średnie wartości poszczególnych zmiennych pomiędzy grupami pokoleniowymi, bądź między kobietami i mężczyznami porównywano przy zastosowaniu testu t-Studenta i testu chi-kwadrat odpowiednio dla zmiennych ilościowych i jakościowych.

C) Współczynnik korelacji pomiędzy 24 godzinnym wydalaniem aldosteronu i elektrolitów z moczem a wybranymi fenotypami obliczano przy zastosowaniu procedury PROC CORR oprogramowania SAS.

3. Do wyodrębnienia czynników powiązanych z analizowanymi fenotypami (ciśnieniowymi i sztywności tętnic) zastosowano analizę regresji krokowej. Za wartość progową statystyki F Snedecora do wejścia i pozostania w modelu przyjęto wartość $p = 0.10$.
4. Przed rozpoczęciem analiz genetycznych zgodność obserwowanego rozkładu częstości genotypów z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy Weinberga potwierdzono używając testu chi-kwadrat dla jednego stopnia swobody.
5. W analizie asocjacji badano związek zmiany (wzrostu lub spadku) zmiennej ciągłej, czyli badanych fenotypów, z wybranymi genotypami. Analizę asocjacji dla całej grupy badanej przeprowadzono używając metody generalized estimating equations (GEE) zawartej w procedurze PROC GENMOD oprogramowania SAS. GEE pozwala uwzględnić w analizie wieloczynnikowej zmienne związane z badanym fenotypem, jak również zależność fenotypów (współczynników korelacji) pomiędzy osobami spokrewnionymi w obrębie rodziny (5).

W przypadku pokolenia rodziców w regresji wieloczynnikowej badano związek pomiędzy fenotypami ciśnieniowo – naczyniowymi a genotypami polimorfizmów kolejno α adducyny i CYP11B2 z uwzględnieniem zmiennych powiązanych. Określano w ten sposób dla poszczególnych grup genotypowych wartości wystandaryzowanych średnich z błędem standardowym dla

poszczególnych fenotypów oraz poziom prawdopodobieństwa odrzucenia hipotezy zerowej.

Analizę asocjacji w pokoleniu potomków wykonano ponownie stosując metodę GEE (PROC GENMOD oprogramowania SAS) (5).

6. Wyniki analizy asocjacji poddawano weryfikacji stosując ilościowy test nierównowagi transmisji (QTDT). Do analizy włączano tylko potomków informatywnych czyli tych u których przynajmniej jedno z rodziców było heterozygotą pod względem polimorfizmu badanego genu (odpowiednio α adducyny czy CYP21B2), bowiem tylko w tych przypadkach można było potwierdzić fakt transmisji danego allelu (8).

Według zaproponowanej przez Abecasisa i wsp. metody w oprogramowaniu QTDT, wersja 2.4 (<http://www.sph.umich.edu/csq/abecasis/QTDT>) (7) - określano wewnątrz- i międzyrodzinną komponentę wariancji fenotypu. Statystyka beta dla wewnątrzrodzinnej wariancji odzwierciedla kierunek i wielkość asocjacji gdy jest dziedziczony dany allel.

Wyniki

Charakterystyka badanej populacji

Badana populacja z Miasta i Gminy Niepołomice liczyła 185 osób z 52 nuklearnych rodzin, natomiast w Krakowie zbadano 109 osób z 31 rodzin. Badaniem objęto więc 294 osoby z 83 dwupokoleniowych rodzin. Strukturę badanych rodzin przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Struktura i liczebność badanych rodzin

Struktura rodzin			Liczba rodzin	Odsetek (%)
Rodzice	+	Dzieci	o danej strukturze	
2		2	37	44.6
1		2	23	27.7
2		1	8	9.7
1		1	7	8.4
2		3	4	4.8
1		3	3	3.6
2		5	1	1.2

W badanej populacji było 15 rodzin z jednym dzieckiem, 60 rodzin z dwoma dziećmi, trójka dzieci była w siedmiu rodzinach oraz pięcioro dzieci było w jednej rodzinie.

Średnia wieku rodziców wynosiła 51.5 ± 5.4 lat, a potomków 25.5 ± 4.8 lat. W pokoleniu rodziców, w porównaniu do ich dorosłych dzieci, wskaźnik masy ciała (28.3 ± 4.9 vs 23.0 ± 3.3 kg/m²; $p < 0.0001$), ciężar ciała (79.1 ± 14.8 vs 68.5 ± 12.2 kg; $p = 0.021$), skurczowe (137.4 ± 17.7 vs 121.6 ± 13.7 mmHg; $p = 0.002$) oraz rozkurczowe (86.6 ± 9.6 vs 75.0 ± 11.6 mmHg; $p = 0.031$) ciśnienie tętnicze krwi (średnia z pięciu pomiarów sfigmomanometrycznych) były istotnie wyższe.

Tab. 4. Charakterystyka kliniczna i czynniki stylu życia w badanej populacji*Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne (SD) lub jako liczba osób (odsetek,%);**# Średnia z pięciu pomiarów podczas wizyty domowej;*** $p < 0.05$; † $p < 0.01$; ‡ $p < 0.001$ dla różnicy między płciami w obrębie pokolenia;*

	Ojcowie (n = 54)	Matki (n = 79)	Synowie (n = 83)	Córki (n = 78)
<i>Dane kliniczne</i>				
Wiek (lat)	51.9 (6.0)	51.2 (5.0)	24.5 (4.2)	26.5 (5.2)*
Ciężar ciała (kg)	85.4 (13.2)	74.8 (14.4) ‡	74.7 (10.4)	62.0 (10.5) ‡
Wzrost (cm)	173.9 (6.0)	162.4 (4.9) ‡	178.4 (6.4)	165.7 (5.4) ‡
Wskaźnik masy ciała (BMI, kg/m ²)	27.1 (3.4)	27.2 (4.7)	22.8 (3.0)	21.7 (3.5)
Częstość akcji serca (uderzenia/min)	71.4 (11.4)	72.5 (10.9)	72.9 (12.6)	75.6 (10.2)
CTK skurczowe (mm Hg) #	137.6 (17.7)	137.2 (17.9)	125.6 (11.5)	117.4 (14.7) ‡
CTK rozkurczowe (mmHg) #	86.9 (10.1)	86.4 (9.4)	76.9 (9.8)	73.0 (13.0)*
Nadciśnienie tętnicze	37 (68.5%)	54 (68.4%)	18 (21.7%)	11 (14.1%)
Cukrzyca	5 (9.3%)	1 (1.3%)	0 (0%)	0 (0%)
Leczenie przeciwnadciśnieniowe	22 (40.7%)	37 (46.8%)	8 (9.6%)	3 (3.9%)
<i>Czynniki stylu życia</i>				
Palenie tytoniu	20 (37.0%)	23 (29.1%)	25 (30.1%)	13 (16.7%)*
Regularne spożycie alkoholu (≥ 5 g/d)	20 (37.0%)	4 (5.1%)†	28 (33.7%)	4 (5.1%)†
Wysiłek fizyczny (log kcal)	3.17 (0.2)	3.07 (0.2)*	3.23 (0.2)	3.15 (0.2)*

W grupie rodziców znamienne częściej występowało nadciśnienie tętnicze (68.4 vs 18.0%; $p < 0.0001$) oraz częściej stosowana była terapia przeciwnadciśnieniowa (44.4 vs 6.8%; $p < 0.0001$) w porównaniu do pokolenia potomków.

W tabeli 4 przedstawiono charakterystykę kliniczną i wybrane czynniki stylu życia badanej populacji według grup pokoleniowych i płci. W obydwu pokoleniach kobiety znacznie rzadziej deklarowały regularne spożycie alkoholu i charakteryzowały się w porównaniu do mężczyzn mniejszym poziomem wysiłku fizycznego. Wśród potomków córki w porównaniu do synów rzadziej paliły tytoń. W pokoleniu rodziców sześć osób chorowało na cukrzycę typu 2.

Ciśnienie tętnicze krwi

W młodszym pokoleniu, mężczyzn cechowała istotnie wyższa wartość zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi mierzonego w trakcie wizyty domowej. Różnic tych nie obserwowano w starszym pokoleniu (tab. 4).

Rodziców, w porównaniu z pokoleniem młodszym, charakteryzowały wyższe wartości ciśnienia tętniczego w ABPM zarówno z okresu dnia ($129.9 \pm 12.2/81.8 \pm 8.1$ vs $125.2 \pm 9.3/74.5 \pm 7.6$ mmHg; $p = 0.0002$), jak i nocy ($112.2 \pm 13.1/67.3 \pm 9.8$ vs $106.2 \pm 8.7/57.6 \pm 6.6$ mmHg; $p < 0.0001$). Ponadto, spadek nocny skurczowego (13.1 ± 6.5 vs $15.0 \pm 5.7\%$; $p = 0.008$) i rozkurczowego (17.7 ± 8.3 vs $22.5 \pm 7.7\%$; $p < 0.0001$) ciśnienia tętniczego był istotnie mniejszy u rodziców.

W całodobowym automatycznym monitorowaniu ciśnienia tętniczego krwi w pokoleniu rodziców istotnie wyższe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego z okresu nocy stwierdzono u mężczyzn, w porównaniu do kobiet. Ponadto, mężczyzn cechowała znamienne mniejsza obniżka nocna skurczowego i rozkurczowego ciśnienia. W populacji potomków, obserwowano wyższe wartości ciśnienia skurczowego zarówno w ciągu dnia, jak i nocy u mężczyzn w porównaniu do kobiet. W młodszym pokoleniu nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy płciami w stopniu obniżenia ciśnienia w nocy (tab. 5).

Tab. 5. Całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego (ABPM), badania laboratoryjne

Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne (SD);

ABPM przeprowadzono u 289 osób;

** Dobową zbiórkę moczu uzyskano u 290 osób;

* $p < 0.05$; † $p < 0.01$; ‡ $p < 0.001$ dla różnicy między płciami w obrębie pokoleń;

	Ojcowie (n = 54)	Matki (n = 79)	Synowie (n = 83)	Córki (n = 78)
<i>ABPM #</i>				
skurczowe dzień (mm Hg)	131.3 (11.2)	129.0 (12.8)	129.2 (8.1)	121.0 (8.8) ‡
rozkurczowe dzień (mm Hg)	83.1 (7.4)	80.9 (8.5)	74.9 (8.0)	74.2 (7.3)
skurczowe noc (mm Hg)	115.9 (12.6)	110.7 (13.1)*	109.2 (8.6)	103.1 (7.7) ‡
rozkurczowe noc (mm Hg)	70.3 (9.5)	65.2 (9.5) †	58.0 (7.6)	57.1 (5.5)
skurczowe – obniżka nocna (%)	11.7 (6.7)	14.1 (6.1)*	15.3 (6.5)	14.6 (5.6)
rozkurczowe – obniżka nocna (%)	15.3 (8.8)	19.5 (7.5) †	22.2 (10.7)	22.8 (7.1)
<i>Dane biochemiczne</i>				
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5.7 (1.1)	5.6 (1.1)	4.5 (0.9)	4.7 (1.0)
Triglicerydy (mmol/l)	2.0 (1.5)	1.6 (1.1) *	1.2 (0.7)	0.8 (0.5) ‡
Cholesterol HDL (mmol/l)	1.4 (0.3)	1.6 (0.4)*	1.5 (0.3)	1.7 (0.4) ‡
Cholesterol LDL (mmol/l)	3.4 (1.1)	3.3 (1.0)	2.4 (0.8)	2.5 (0.9)
Dobowa zbiórka moczu – objętość (l) **	1.57 (0.5)	1.42 (0.4)	1.50 (0.5)	1.35 (0.6)
Dobowe wydalanie z moczem:				
- sodu (mmol)	288 (107)	214 (63) ‡	270 (73)	216 (86) ‡
- potasu (mmol)	75 (27)	61 (21) †	71 (28)	57 (18) ‡
- aldosteronu (nmol)	10.0 (1.6)	12.6 (2.1)	9.3 (1.9)	12.3 (2.0)*

Badania laboratoryjne

Rodzice w porównaniu z pokoleniem potomków charakteryzowali się wyższymi poziomami cholesterolu całkowitego (5.6 ± 1.1 vs 4.5 ± 0.9 mmol/l; $p < 0.0001$), cholesterolu frakcji LDL (3.3 ± 1.3 vs 2.5 ± 0.8 mmol/l; $p < 0.0001$) oraz triglicerydów (1.7 ± 1.3 vs 1.01 ± 0.66 mmol/l; $p < 0.0001$). Dyslipidemię w postaci hipercholesterolemii i/lub hipertriglicerydemii istotnie częściej obserwowano wśród rodziców (66.1 vs 23.6%; $p < 0.0001$). W obu pokoleniach mężczyzn, w porównaniu do kobiet, cechowały wyższe wartości osoczkowego poziomu triglicerydów i niższe wartości cholesterolu frakcji HDL (tab. 5).

W parametrach wyliczanych na podstawie dobowej zbiórki moczu nie stwierdzono różnic pomiędzy pokoleniami. Dobowe wydalanie sodu i potasu z moczem było istotnie wyższe u mężczyzn w porównaniu do kobiet, niezależnie od pokolenia, natomiast tylko u kobiet młodszego pokolenia stwierdzono wyższe wydalanie aldosteronu z moczem (tab. 5).

Analiza fali tętna

Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego był istotnie wyższy w pokoleniu rodziców w porównaniu do ich dorosłych dzieci i wynosił odpowiednio 85.4 ± 15.9 vs $52.4 \pm 13.6\%$; $p < 0.0001$ oraz 27.2 ± 11.4 vs $4.1 \pm 13.6\%$; $p < 0.0001$. Ciśnienie tętna zarówno obwodowe (49.3 ± 11.6 vs 46.1 ± 10.5 mmHg; $p = 0.014$) jak i aortalne (40.2 ± 11.9 vs 28.8 ± 6.6 mmHg; $p < 0.0001$) było znamienne wyższe w starszym pokoleniu.

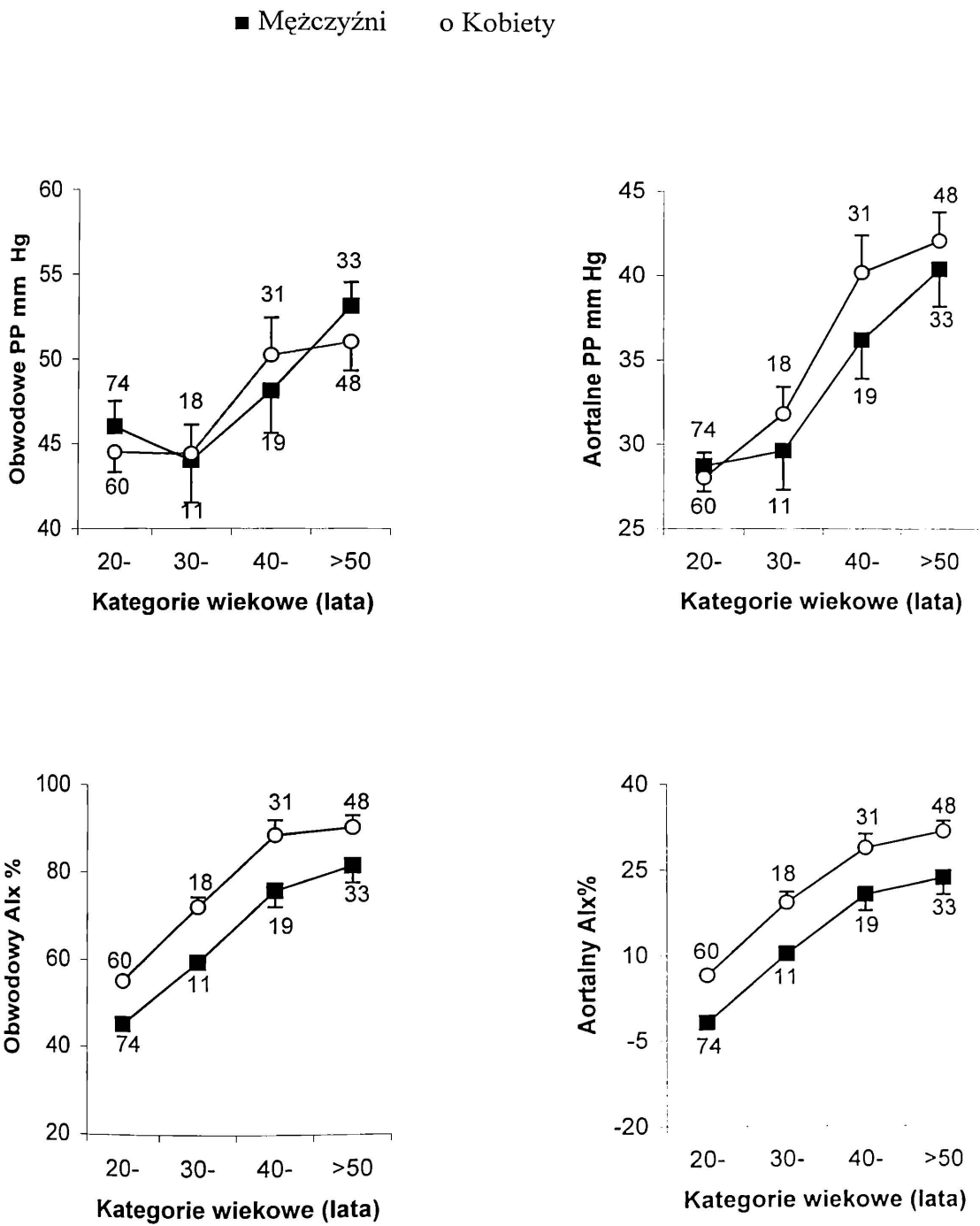
W obu pokoleniach kobiety charakteryzowały się wyższymi w porównaniu do mężczyzn wartościami AIx_{obw} i AIx_{ao} (tab. 6).

Zależności pomiędzy wartościami obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia ciśnienia skurczowego oraz obwodowego i aortalnego ciśnienia tętna a wiekiem i płcią przedstawiono na rycinie 10. W badanej grupie, zarówno AIx_{obw} i PP_{obw} jak i PP_{ao} i AIx_{ao} wzrastały w każdej kolejnej dekadzie życia. Ponadto w każdej dekadzie wskaźniki wzmocnienia ciśnienia i aortalne ciśnienie tętna były wyższe u kobiet niż u mężczyzn.

Tab. 6. Wyniki badań specjalistycznych: fenotypy naczyniowe*Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne (SD);**** IMT zmierzono u 205 osób;*** $p < 0.05$; † $p < 0.01$; ‡ $p < 0.001$ dla różnicy między płciami w obrębie pokoleń;*

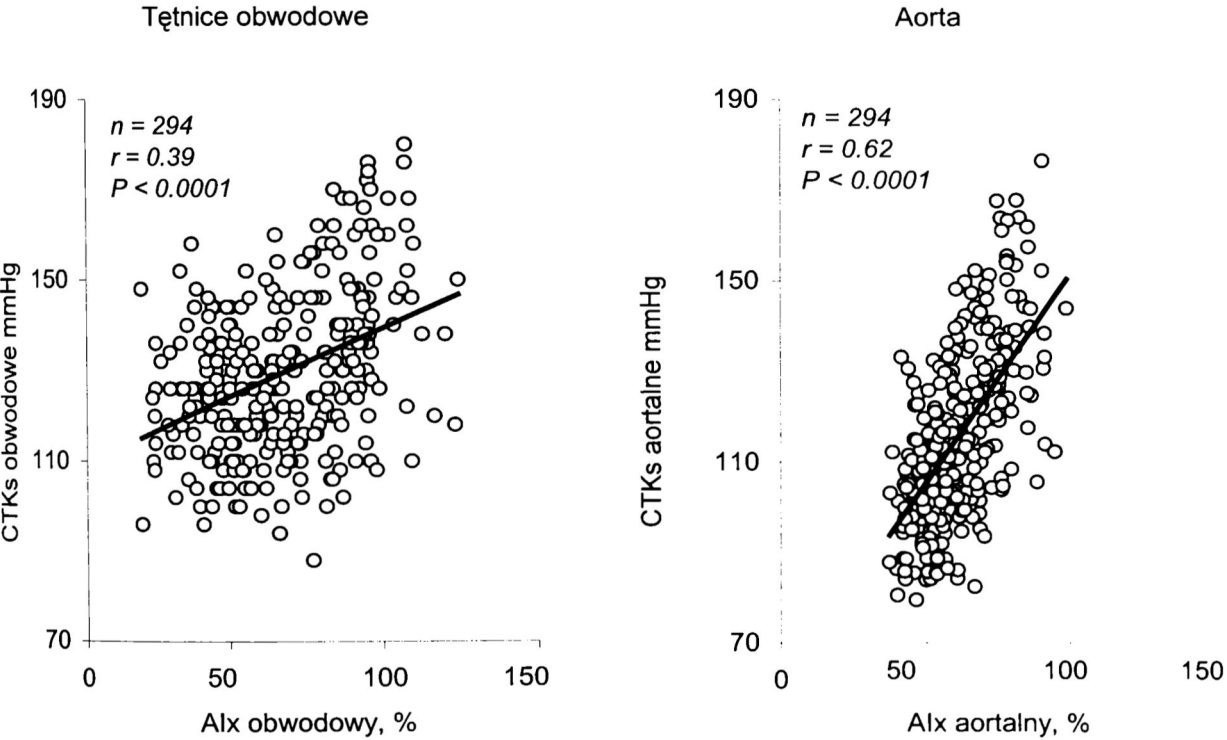
	Ojcowie (n = 54)	Matki (n = 79)	Synowie (n = 83)	Córki (n = 78)
<i>Dane analizy obwodowej fali tętna</i>				
Ciśnienie tętna na tętnicy ramiennej (mm Hg)	50.7 (13.2)	50.8 (11.7)	48.7 (12.5)	44.4 (8.8) †
Wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego (%)	79.1 (15.6)	89.7 (14.6) †	46.4 (12.4)	58.8 (17.6) †
<i>Dane analizy aortalnej fali tętna</i>				
Ciśnienie tętna w aorcie (mm Hg)	38.4 (12.0)	41.4 (11.9)	28.9 (6.7)	28.8 (6.6)
Wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego (%)	22.3 (11.3)	30.6 (10.2) †	-0.8 (10.8)	9.4 (14.3) ‡
<i>IMT (mm) **</i>	0.733 (0.116)	0.682 (0.125)*	0.536 (0.064)	0.522 (0.068)

Ryc. 10. Parametry sztywności tętnic przedstawione według wieku i płci
Cyfry odpowiadają liczbie osób w poszczególnych kategoriach wiekowych



Jak przedstawiono na rycinie 11, zarówno obwodowe jak i aortalne skurczowe ciśnienie tętnicze istotnie ($p < 0.0001$) wzrastało wraz ze wzrostem wskaźnika wzmocnienia ciśnienia skurczowego. Ponadto kąt nachylenia wykresu zależności aortalnego skurczowego ciśnienia od aortalnego wskaźnika wzmocnienia był istotnie większy ($p = 0.0035$) niż kąt nachylenia wykresu zależności tych parametrów na tętnicy obwodowej.

Ryc. 11. Zależność lokalnego obwodowego i aortalnego skurczowego ciśnienia od obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia ciśnienia skurczowego

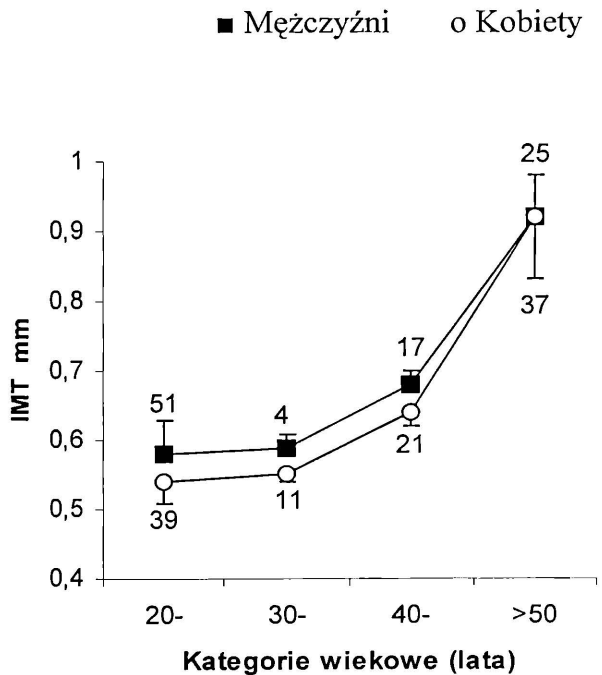


Grubość kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa

IMT w tętnicach szyjnych było istotnie większe w populacji rodziców w porównaniu do populacji dzieci (0.704 ± 0.123 vs 0.529 ± 0.066 mm; $p < 0.0001$). Ponadto w grupie rodziców wyższe wartości IMT cechowały mężczyzn w porównaniu do kobiet (tab. 6). Zależność IMT od płci i wieku przedstawiono na rycinie 12. Do piątej dekady życia mężczyźni wykazywali nieco większe wartości IMT niż kobiety, różnicy tej nie obserwowano w szóstej dekadzie.

Ryc. 12. IMT w tętnicy szyjnej wspólnej wg wieku i płci

Cyfry odpowiadają liczbie osób w poszczególnych kategoriach wiekowych



Regresja krokowa

Do wyodrębnienia czynników powiązanych z analizowanymi fenotypami zastosowano analizę regresji krokowej. Wartości ciśnień (w tym ciśnienie tętna, skurczowe i rozkurczowe ciśnienie z okresu dnia i nocy oraz obniżka nocna obydwu ciśnień) z całodobowego automatycznego monitorowania ciśnienia tętniczego zwiększały się wraz z wiekiem osoby badanej, wskaźnikiem masy ciała, paleniem tytoniu, a także były wyższe u płci męskiej, obserwowano również zależność od faktu stosowania terapii przeciwnadciśnieniowej ($p < 0.05$ dla wszystkich wyżej wymienionych zmiennych).

Obwodowe ciśnienie tętna zwiększało się pod wpływem wieku (współczynnik regresji $[\beta] \pm SE$; $0.10 \pm 0.05\%/rok$; $p = 0.072$), wzrostu ($0.17 \pm 0.08\%/cm$; $p = 0.026$), palenia tytoniu ($3.12 \pm 1.50\%$; $p = 0.038$) i terapii przeciwnadciśnieniowej ($5.84 \pm 1.70\%$; $p = 0.007$) oraz było wyższe u płci męskiej ($0.28 \pm 0.24\%$; $p = 0.088$).

Aortalne ciśnienie tętna zwiększało się wraz z wiekiem ($0.19 \pm 0.04\%/rok$; $p < 0.001$), średnim ciśnieniem tętniczym ($0.33 \pm 0.04\% \text{ mmHg}$; $p < 0.001$), paleniem tytoniu ($2.58 \pm 1.08\%$; $p = 0.017$), terapią przeciwnadciśnieniową ($2.91 \pm 1.23\%$; $p = 0.019$), było wyższe u płci żeńskiej ($3.06 \pm 0.97\%$; $p = 0.002$), a zmniejszało się wraz z większym wzrostem i częstością akcji serca ($-0.28 \pm 0.04\%/uderzenie$; $p < 0.001$).

Obwodowy wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego wzrastał wraz z wiekiem ($0.83 \pm 0.07\%/rok$; $p < 0.001$), średnim ciśnieniem tętniczym ($0.44 \pm 0.07\%/mmHg$; $p < 0.001$), paleniem tytoniu ($3.98 \pm 1.69\%$; $p = 0.019$) oraz był wyższy u kobiet ($9.37 \pm 2.19\%$; $p < 0.001$), a malał pod wpływem większej częstości akcji serca ($-59 \pm 0.07\%/uderzenie$; $p < 0.001$) i wysokości ciała ($-0.36 \pm 0.13\%/cm$; $p = 0.006$).

Podobnie aortalny wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego wzrastał wraz z wiekiem ($0.61 \pm 0.05\%/rok$; $p < 0.001$), średnim ciśnieniem tętniczym ($0.27 \pm 0.05\%/mmHg$; $p < 0.001$), paleniem tytoniu ($2.56 \pm 1.26\%$; $p = 0.043$) i był większy u kobiet ($7.70 \pm 1.63\%$; $p < 0.001$), a malał pod wpływem wzrostu częstości akcji serca ($-0.52 \pm 0.05\%/uderzenie$; $p < 0.001$) i większego wzrostu badanych osób ($-0.25 \pm 0.09\%/cm$; $p = 0.009$). Ponadto we wszystkich analizach wskaźników sztywności naczyń uwzględniano również fakt stosowania terapii przeciwnadciśnieniowej, dobowe wydalenie sodu z moczem oraz osobę wykonującą badanie.

Analizując czynniki powiązane z grubością kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa ściany naczyniowej stwierdzono, że IMT pozostawało w związku z wiekiem ($0.005 \pm 0.0006\%/rok$; $p < 0.001$), płcią ($[\beta]$ dla mężczyzn: $0.039 \pm 0.012\%$; $p = 0.003$), wskaźnikiem masy ciała ($0.004 \pm 0.001\%/kg/m^2$; $p = 0.003$), paleniem tytoniu ($0.040 \pm 0.015\%$; $p = 0.009$), poziomem triglicerydów ($0.017 \pm$

0.007%/mmol/l; $p = 0.01$) oraz faktem stosowania terapii przeciwnadciśnieniowej ($0.058 \pm 0.015\%$; $p = 0.002$).

Analizy fenotypów zostały przeprowadzone z uwzględnieniem odpowiednich, wyszczególnionych powyżej zmiennych.

Częstość występowania badanych genotypów

Rozkłady częstości genotypów polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny oraz polimorfizmu C-344T syntazy aldosteronu były zgodne z przewidywanymi według prawa Hardy – Weinberga (odpowiednio $p = 0.45$ i $p = 0.78$).

Osoby z nadciśnieniem tętniczym nie różniły się w istotny sposób od badanych bez nadciśnienia tętniczego pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów badanych genów. Nie stwierdzono również różnicy w występowaniu poszczególnych alleli badanych polimorfizmów genetycznych pomiędzy osobami z i bez nadciśnienia tętniczego (tab. 7).

Nie obserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny ($p = 0.139$) oraz C-344T syntazy aldosteronu ($p = 0.35$) w zależności od płci. Podobną częstość poszczególnych genotypów obserwowano w obydwu pokoleniach, poziom istotności wynosił odpowiednio dla α adducyny $p = 0.91$, a dla syntazy aldosteronu $p = 0.47$.

Tab. 7. Częstość genotypów i alleli w badanej populacji
Wartości przedstawiają liczbę alleli i/lub genotypów (%);
**p < 0.05 dla różnicy w częstości genotypów lub alleli;*

Gen		Allele		Genotypy		
<i>CYP11B2</i>		<i>T</i>	<i>C</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>
	Cała populacja	297 (50.5)	291 (49.5)	70 (23.8)	157 (53.4)	67 (22.8)
	Osoby z nadciśnieniem	119 (49.6)	121 (50.4)	25 (20.8)	69 (57.5)	26 (21.7)
	Osoby bez nadciśnienia	178 (51.2)	170 (48.8)	45 (25.9)	88 (50.6)	41 (23.5)
<i>α Adducyna</i>		<i>Gly</i>	<i>Trp</i>	<i>GlyGly</i>	<i>GlyTrp</i>	<i>TrpTrp</i>
	Cała populacja	491 (83.5)	97 (16.5)	202 (68.7)	87 (29.6)	5 (1.7)
	Osoby z nadciśnieniem	200 (83.3)	40 (16.7)	82 (68.3)	36 (30.0)	2 (1.7)
	Osoby bez nadciśnienia	291 (83.6)	57 (16.4)	120 (69.0)	51 (29.3)	3 (1.7)

Fenotypy ciśnieniowo – naczyniowe a badane polimorfizmy genetyczne

Polimorfizm Gly460Trp genu α adducyny

Analiza asocjacji

W analizie asocjacji, z uwagi na niską częstość allelu Trp w badanej grupie (tab. 7), populację badaną rozpatrywano pod względem polimorfizmu genu α adducyny jako nosicieli allelu Trp bądź homozygoty GlyGly.

W badanej populacji nie stwierdzono związku pomiędzy wartościami skurczowego ($p = 0.44$) ani rozkurczowego ($p = 0.31$) ciśnienia tętniczego, mierzonego sfigmomanometrem rtęciowym w warunkach domowych, z polimorfizmem genu α adducyny.

W badanych rodzinach nie stwierdzono również asocjacji badanego polimorfizmu z wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego z okresu dnia czy nocy rejestrowanego w całodobowym automatycznym monitorowaniu ciśnienia tętniczego. Analiza przeprowadzona oddzielnie w każdym z pokoleń również nie wykazała różnic parametrów z ABPM w zależności od genotypu (tab. 8).

Mniejsza obniżka nocna rozkurczowego ciśnienia tętniczego dotyczyła homozygot GlyGly w porównaniu do nosicieli allelu Trp α adducyny. Jednakże różnicy nie obserwowano, gdy analizie poddano odrębnie pokolenie rodziców czy potomków (tab. 8).

Tab. 8. Parametry ABPM w nuklearnych rodzinach wg. genotypów genu α adducyny

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu

Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia $\pm$ SE		P
CTK (mmHg)		<i>GlyGly/ GlyTrp+TrpTrp</i>	<i>GlyGly</i>	<i>GlyTrp+TrpTrp</i>	
Dobowe skurczowe	Ogółem	199/90	120.0 $\pm$ 0.8	120.9 $\pm$ 1.2	0.48
	Rodzice	92/39	122.8 $\pm$ 1.2	125.1 $\pm$ 1.7	0.26
	Dzieci	107/51	117.7 $\pm$ 0.8	116.5 $\pm$ 1.1	0.33
Dobowe rozkurczowe	Ogółem	199/90	71.8 $\pm$ 0.6	71.0 $\pm$ 0.7	0.33
	Rodzice	92/39	76.4 $\pm$ 0.9	75.8 $\pm$ 1.0	0.68
	Dzieci	107/51	67.7 $\pm$ 0.7	67.2 $\pm$ 0.8	0.65
Skurczowe dzień	Ogółem	199/90	126.9 $\pm$ 0.9	128.6 $\pm$ 1.3	0.26
	Rodzice	92/39	129.0 $\pm$ 1.3	131.7 $\pm$ 1.9	0.21
	Dzieci	107/51	125.1 $\pm$ 0.9	124.8 $\pm$ 1.2	0.85
Rozkurczowe dzień	Ogółem	199/90	77.9 $\pm$ 0.6	77.5 $\pm$ 0.7	0.69
	Rodzice	92/39	81.7 $\pm$ 0.9	81.7 $\pm$ 1.0	0.94
	Dzieci	107/51	74.3 $\pm$ 0.8	74.5 $\pm$ 1.0	0.93
Skurczowe noc	Ogółem	199/90	109.3 $\pm$ 0.9	109.1 $\pm$ 1.1	0.86
	Rodzice	92/39	112.8 $\pm$ 1.4	113 $\pm$ 1.7	0.93
	Dzieci	107/51	106.3 $\pm$ 0.9	105.6 $\pm$ 1.1	0.58
Rozkurczowe noc	Ogółem	199/90	62.5 $\pm$ 0.6	60.9 $\pm$ 0.8	0.11
	Rodzice	92/39	67.8 $\pm$ 1.0	66.1 $\pm$ 1.2	0.31
	Dzieci	107/51	57.8 $\pm$ 0.7	56.9 $\pm$ 0.7	0.34
(%)					
Skurczowe–obniżka nocna	Ogółem	199/90	13.8 $\pm$ 0.5	15.0 $\pm$ 0.5	0.10
	Rodzice	92/39	12.5 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.9	0.08
	Dzieci	107/51	14.7 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 0.7	0.42
Rozkurczowe–obniżka nocna	Ogółem	199/90	19.9 $\pm$ 0.5	21.6 $\pm$ 0.5	0.02 i
	Rodzice	92/39	17.1 $\pm$ 0.8	19.2 $\pm$ 1.1	0.14
	Dzieci	107/51	21.9 $\pm$ 0.7	23.6 $\pm$ 0.8	0.16

Analizując parametry sztywności tętnic nie stwierdzono istotnych różnic w populacji badanej w zależności od genotypu polimorfizmu Gly460Trp α adducyny, zarówno w całej grupie jak i w podgrupach pokoleniowych (tabela 9).

Nosiciele allelu Trp genu α adducyny nie różnili się od homozygot GlyGly pod względem grubości kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa tętnicy szyjnej wspólnej (tab. 9).

Tab. 9. Obwodowe ciśnienie tętna i wskaźnik wzmocnienia, aortalne ciśnienia tętna i wskaźnik wzmocnienia oraz grubość kompleksu błona wewnętrzna – środkowa ściany tętnicy szyjnej wspólnej w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu α adducyny

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu oraz dodatkowo: dla PP_{obw} - wzrostu; dla Aix - średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie; dla IMT - wskaźnika masy ciała, poziomu triglicerydów

Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia $\pm$ SE		P
		GlyGly/ GlyTrp+TrpTrp	GlyGly	GlyTrp+TrpTrp	
Obwodowe ciśnienie tętna (mmHg)	Ogółem	202/92	48.5 $\pm$ 0.8	48.6 $\pm$ 1.5	0.98
	Rodzice	93/40	50.2 $\pm$ 1.1	52.0 $\pm$ 2.2	0.43
	Dzieci	109/52	47.1 $\pm$ 0.9	45.7 $\pm$ 1.5	0.38
Aortalne ciśnienie tętna (mmHg)	Ogółem	202/92	33.8 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 1.0	0.30
	Rodzice	93/40	39.4 $\pm$ 0.8	41.9 $\pm$ 1.7	0.18
	Dzieci	109/52	28.8 $\pm$ 0.6	29.0 $\pm$ 0.9	0.79
Obwodowy wskaźnik wzmocnienia (%)	Ogółem	202/92	67.7 $\pm$ 1.8	67.7 $\pm$ 0.9	0.92
	Rodzice	93/40	85.3 $\pm$ 1.1	85.3 $\pm$ 2.4	0.98
	Dzieci	109/52	52.6 $\pm$ 1.1	52.4 $\pm$ 1.9	0.93
Aortalny wskaźnik wzmocnienia (%)	Ogółem	202/92	14.5 $\pm$ 0.7	15.4 $\pm$ 1.2	0.49
	Rodzice	93/40	27.1 $\pm$ 0.8	27.2 $\pm$ 1.4	0.95
	Dzieci	109/52	4.1 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 1.6	0.96
IMT (mm)	Ogółem	146/59	0.61 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01	0.86
	Rodzice	71/29	0.70 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.02	0.99
	Dzieci	75/30	0.53 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01	0.89

Poziom dobowego wydalania sodu, potasu oraz aldosteronu z moczem był porównywalny w grupach nosicieli allelu Trp i homozygot GlyGly genu α adducyny w całej populacji badanej, w pokoleniu rodziców i potomków. Wyniki analizy asocjacji fenotypów biochemicznych z badanym polimorfizmem przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Dobowe wydalanie sodu i potasu oraz aldosteronu w rodzinach nuklearnych według genotypów genu α adducyny
Analiza z uwzględnieniem wieku i płci badanych

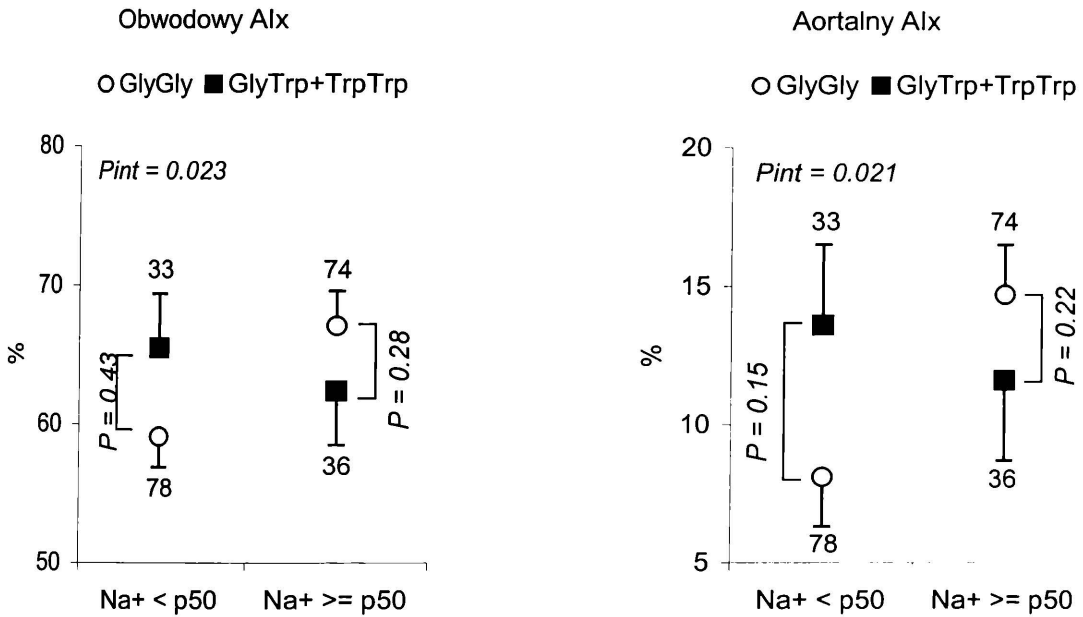
Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia $\pm$ SE		P
		<i>GlyGly/ GlyTrp+TrpTrp</i>	<i>GlyGly</i>	<i>GlyTrp+TrpTrp</i>	
Na ⁺ (mmol/l)	Ogółem	152/69	242 $\pm$ 7	247 $\pm$ 10	0.69
	Rodzice	49/25	238 $\pm$ 12	266 $\pm$ 20	0.18
	Dzieci	103/44	240 $\pm$ 8	249 $\pm$ 13	0.56
K ⁺ (mmol/l)	Ogółem	152/69	64 $\pm$ 2	65 $\pm$ 3	0.84
	Rodzice	49/25	65 $\pm$ 3	68 $\pm$ 5	0.61
	Dzieci	103/44	62 $\pm$ 2	65 $\pm$ 3	0.48
Aldosteron (nmol/dobę)	Ogółem	152/69	10.2 $\pm$ 1.0	11.2 $\pm$ 1.1	0.20
	Rodzice	49/25	9.5 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 1.1	0.28
	Dzieci	103/44	10.2 $\pm$ 1.1	11.0 $\pm$ 1.1	0.54

W kolejnym etapie analizy fenotypów naczyniowych, w zależności od genotypów polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny, porównano wartości wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego pomiędzy nosicielami allelu Trp i homozygotami GlyGly w subpopulacji bez leczenia przeciwnadciśnieniowego ($n = 221$) w zależności od mediany dobowego wydalania sodu z moczem. Wyliczono medianę wydalanego sodu dla kobiet i mężczyzn, które wyniosły odpowiednio: dla kobiet – Na^+ p50 = 197 mmol/dobę oraz dla mężczyzn – Na^+ p50 = 271 mmol/dobę. Na podstawie wyliczonej mediany dobowego wydalania sodu, każdą z osób badanej populacji zaliczono do jednej z dwóch grup: powyżej lub poniżej mediany spożycia sodu. Analiza asocjacji fenotypu naczyniowego z polimorfizmem genu α adducyny przeprowadzona w każdej z dwóch powyższych grup nie ujawniła istotnych różnic między genotypami (ryc. 13). Analizując wyniki wskaźników wzmocnienia u homozygot GlyGly stwierdzono, że istotnie wyższe (dla AIX_{obw} $p = 0.015$; dla AIX_{ao} $p = 0.041$) wartości tych wskaźników występowały u osób z ponad przeciętnym poziomem wydalanego sodu, czego nie obserwowano u nosicieli allelu Trp (dla AIX_{obw} $p = 0.19$; dla AIX_{ao} $p = 0.25$). Stwierdzono natomiast istotną interakcję czynników genetycznego (badany polimorfizm) i środowiskowego (poziomu wydalanego sodu) w warunkowaniu zarówno obwodowego jak aortalnego wskaźnika wzmocnienia. Na rycinie 13 przedstawiono wartości AIX_{obw} i AIX_{ao} w zależności od mediany wydalanego sodu i genotypów badanego polimorfizmu α adducyny oraz poziom istotności statystycznej dla interakcji czynnika genetycznego i środowiskowego (Pint).

Ryc. 13. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia wg. genotypów α adducyny i mediany wydalanego sodu w grupie 221 nieleczonych osób

Wartości odzwierciedlają skorygowane średnie $\pm$ SE.

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, terapii przeciwnadciśnieniowej, palenia tytoniu, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie



Test nierównowagi transmisji

Do analizy rodzin kwalifikowano tylko informatywnych potomków (posiadający co najmniej jednego heterozygotycznego rodzica), co zredukowało liczbę analizowanych przypadków do 68 osób dla fenotypów sztywności tętnic, 66 osób dla wyników uzyskiwanych z ABPM i wreszcie w grupie 41 osób analizowano IMT. W analizie QTDT nie stwierdzono różnic w badanych parametrach struktury i funkcji naczyń w zależności od faktu transmisji allelu Trp genu α adducyny (tab. 11).



Tab. 11. Analiza QTDT wybranych fenotypów w zależności od genu α adducyny

β - statystyka beta dla wewnątrzrodzinnej wariancji odzwierciedla kierunek i wielkość asocjacji, gdy jest dziedziczony allel Trp genu α adducyny.

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu oraz dodatkowo odpowiednio: dla PP_{obw} - wzrostu; dla AIx - średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie; dla IMT – wskaźnika masy ciała, poziomu triglicerydów

Fenotyp	Informatywni potomkowie/ wszyscy potomkowie	Ortogonalny model		
		β ,	χ^2	P
Obwodowe PP (mmHg)	68/161	-4.20	2.71	0.10
Aortalne PP (mmHg)	68/161	-0.91	0.36	0.55
Obwodowy AIx (%)	68/161	-0.14	0.00	0.96
Aortalny AIx (%)	68/161	0.37	0.03	0.87
IMT (mm)	41/103	0.01	0.22	0.64
CTK (mmHg):				
Dobowe skurczowe	66/158	-2.99	2.90	0.09
Dobowe rozkurczowe	66/158	-0.84	0.41	0.52
Skurczowe dzień	66/158	-3.60	3.71	0.06
Rozkurczowe dzień	66/158	-1.46	0.74	0.07
Skurczowe noc	66/158	-2.43	1.35	0.25
Rozkurczowe noc	66/158	0.17	0.01	0.92
Skurczowe – obniżka nocna (%)	66/158	-0.99	0.30	0.59
Rozkurczowe – obniżka nocna (%)	66/158	-1.10	0.51	0.48

Analiza asocjacji

Analizując wartości ciśnienia tętniczego z pomiarów domowych nie zaobserwowano różnic pomiędzy genotypami badanego polimorfizmu. W analizie wieloczynnikowej poziom istotności statystycznej dla skurczowego ciśnienia tętniczego wynosił dla całej populacji $p = 0.67$, dla pokolenia rodziców $p = 0.42$ i dla potomków $p = 0.41$, a dla rozkurczowego ciśnienia - odpowiednio: $p = 0.86$, $p = 0.40$, $p = 0.33$.

Różnice wartości skurczowego ciśnienia tętniczego z okresu całej doby zależne od genotypu badanego polimorfizmu stwierdzono tylko w młodszym pokoleniu. Wyniki całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi ujawniły różnice w wartościach skurczowego ciśnienia tętniczego w nocy w zależności od genotypu polimorfizmu C-344T genu CYP11B2 w całej grupie badanej i w pokoleniu potomków (tab. 12).

Wynik analizy asocjacji nocnej obniżki rozkurczowego ciśnienia tętniczego w całej badanej populacji z badanym polimorfizmem genu syntazy aldosteronu nie osiągnął istotności statystycznej (tab. 12).

Tab. 12. Parametry ABPM w nuklearnych rodzinach wg. genotypów genu syntazy aldosteronu

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu

Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia ± SE			
CTK (mmHg)		TT/TC/CC	TT	TC	CC	P
Dobowe skurczowe	Ogółem	70/153/66	118.9 ± 1.1	121.0 ± 0.9	120.1 ± 1.2	0.29
	Rodzice	28/75/28	121.9 ± 1.8	124.1 ± 1.3	123.6 ± 1.8	0.56
	Dzieci	42/78/38	114.4 ± 1.0	118.7 ± 0.9	117.9 ± 1.0	0.011
Dobowe rozkurczowe	Ogółem	70/153/66	70.8 ± 0.8	71.7 ± 0.6	72.0 ± 0.8	0.51
	Rodzice	28/75/28	75.2 ± 1.3	76.3 ± 0.9	77.0 ± 1.4	0.63
	Dzieci	42/78/38	66.4 ± 0.8	68.1 ± 0.8	67.5 ± 0.8	0.25
Skurczowe dzień	Ogółem	70/153/66	126.9 ± 1.3	127.5 ± 1.0	127.7 ± 1.3	0.88
	Rodzice	28/75/28	128.6 ± 2.0	129.8 ± 1.4	131.0 ± 2.1	0.70
	Dzieci	42/78/38	122.7 ± 1.2	126.2 ± 1.0	125.3 ± 1.2	0.10
Rozkurczowe dzień	Ogółem	70/153/66	77.5 ± 0.8	77.6 ± 0.7	78.3 ± 1.0	0.79
	Rodzice	28/75/28	81.0 ± 1.5	81.5 ± 0.9	83.1 ± 1.6	0.61
	Dzieci	42/78/38	74.0 ± 1.0	74.9 ± 1.0	73.7 ± 1.0	0.69
Skurczowe noc	Ogółem	70/153/66	106.1 ± 1.1	110.8 ± 1.0	108.9 ± 1.5	0.013
	Rodzice	28/75/28	110.4 ± 2.0	114.0 ± 1.4	112.1 ± 2.3	0.30
	Dzieci	42/78/38	103.1 ± 1.0	107.4 ± 1.1	106.9 ± 1.0	0.008
Rozkurczowe noc	Ogółem	70/153/66	60.2 ± 0.8	62.7 ± 0.7	62.4 ± 1.0	0.11
	Rodzice	28/75/28	65.4 ± 1.6	67.8 ± 1.0	67.7 ± 1.5	0.47
	Dzieci	42/78/38	56.1 ± 0.7	58.0 ± 0.9	58.0 ± 0.8	0.18
%						
Skurczowe – obniżka nocna	Ogółem	70/153/66	15.8 ± 0.6	13.6 ± 0.5	14.1 ± 0.7	0.06
	Rodzice	28/75/28	14.0 ± 1.1	12.4 ± 0.6	14.2 ± 1.3	0.33
	Dzieci	42/78/38	15.7 ± 0.7	14.8 ± 0.7	14.5 ± 0.7	0.42
Rozkurczowe – obniżka nocna	Ogółem	70/153/66	22.4 ± 0.8	16.6 ± 0.6	20.1 ± 0.8	0.06
	Rodzice	28/75/28	19.4 ± 1.5	16.8 ± 0.9	18.5 ± 1.3	0.31
	Dzieci	42/78/38	23.3 ± 0.8	22.5 ± 0.9	21.6 ± 1.1	0.47

Przeprowadzone analizy konsekwentnie wykazywały wyższe wartości CTK uzyskiwane metodą ABPM u nosicieli allelu -344C polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu (tab. 12). Wobec powyższego w następnym etapie uzupełniono analizę o porównanie wyników rozpatrywanych fenotypów nosicieli allelu -344C z homozygotami -344TT genu syntazy aldosteronu.

Na podstawie przeprowadzonej subanalizy stwierdzono, że wartość skurczowego ciśnienia tętniczego z okresu całej doby była znamienne wyższa w populacji potomków u osób z obecnością allelu -344C polimorfizmu C-344T genu CYP11B2 w porównaniu do homozygot TT (118 ± 0.8 vs 114.4 ± 1.0 mmHg; $p = 0.0008$). Podobna tendencja dotyczyła również rozkurczowego ciśnienia tętniczego z okresu całej doby, aczkolwiek różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (68.0 ± 0.7 vs 66.4 ± 0.8 mmHg; $p = 0.09$).

W całej badanej populacji stwierdzono, że nosiciele allelu -344C genu syntazy aldosteronu cechowały wyższe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego w ciągu nocy (ryc. 14), oraz mniejszy nocny spadek zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego (ryc. 15).

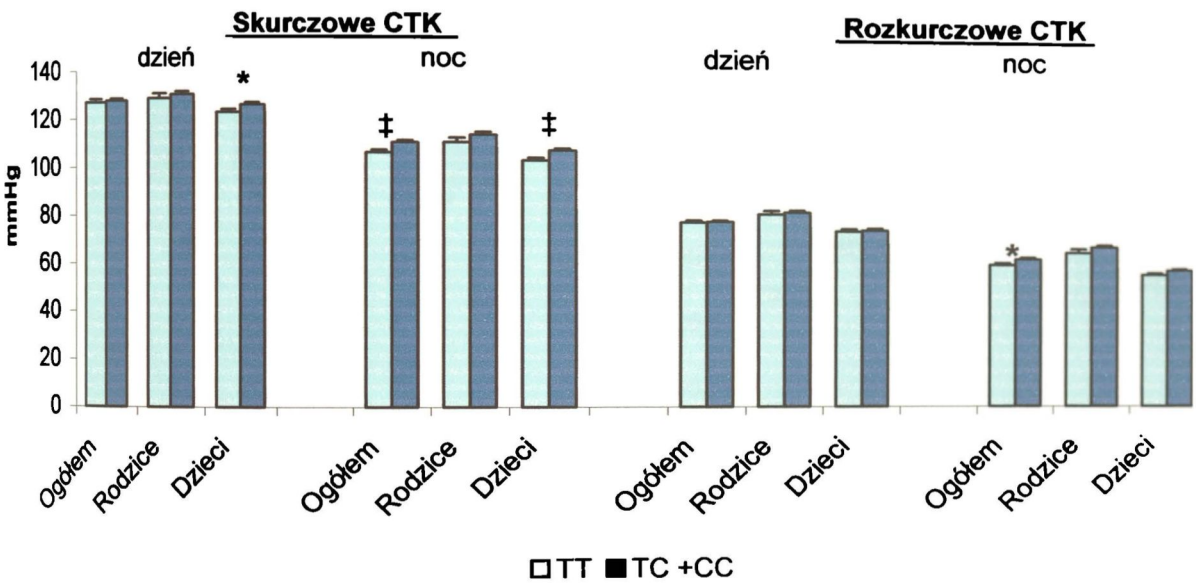
W pokoleniu potomków nosicieli allelu -344C genu syntazy aldosteronu w porównaniu do homozygot -344TT cechowały istotnie wyższe wartości skurczowego ciśnienia tętniczego zarówno w ciągu dnia jak i nocy (ryc. 14).

Ryc. 14. Parametry ABPM w rodzinach nuklearnych według genotypów genu syntazy aldosteronu

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu

Słupki przedstawiają średnie skorygowane $\pm$ SE

** $p < 0.05$; ‡ $p < 0.001$ dla różnicy między TT i TC + CC*

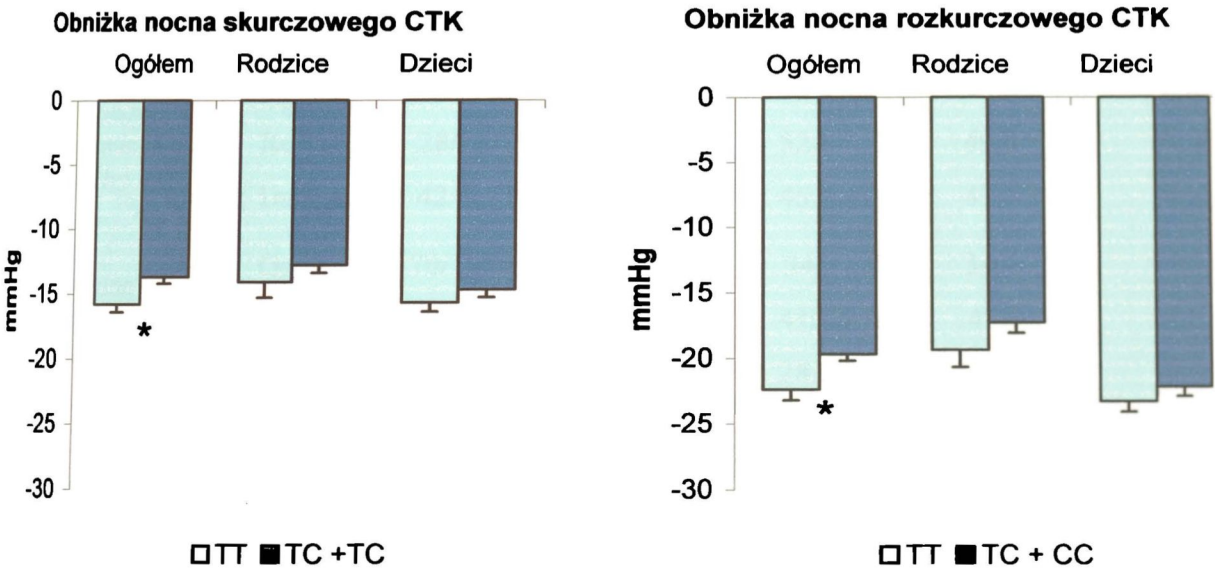


Ryc. 15. Redukcja nocna skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, uzyskiwana na podstawie ABPM w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu

Słupki przedstawiają średnie skorygowane $\pm$ SE

** $p < 0.05$ dla różnicy między TT i TC + CC*



W zgodności z wynikami analizy parametrów całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego, wskaźniki elastyczności naczyń tętniczych w postaci obwodowego i aortalnego wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego były wyższe u nosicieli allelu -344C polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu (tab. 13).

Tab. 13. Obwodowe ciśnienie tętna i wskaźnik wzmocnienia oraz aortalne ciśnienia tętna i wskaźnik wzmocnienia w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu

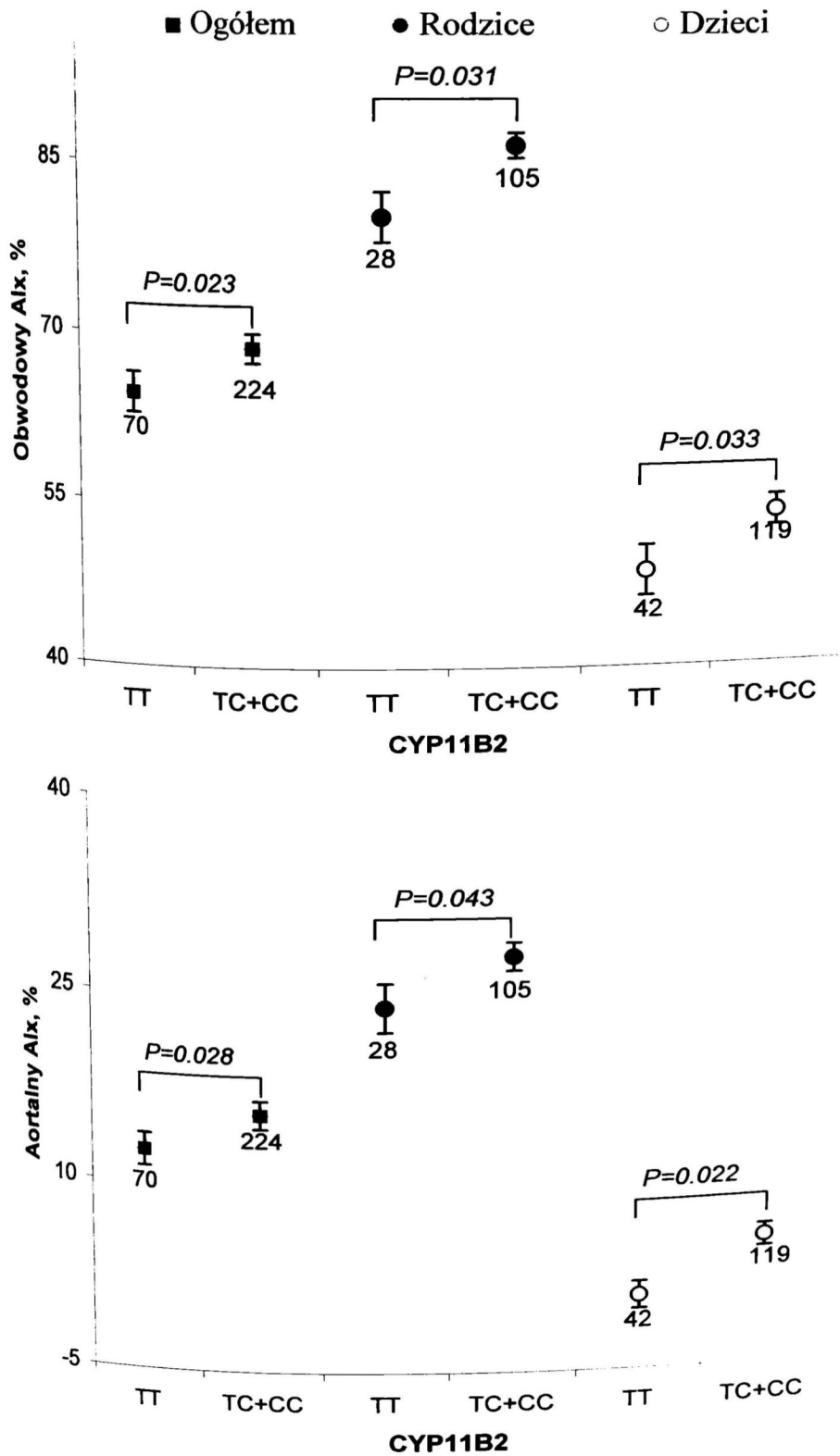
Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu oraz dodatkowo odpowiednio: dla PP_{obw} - wzrostu; dla A1x i PP_{ao}- średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie

Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia ± SE			
		<i>TT/TC/CC</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>P_{ANOVA}</i>
Obwodowe ciśnienie tętna (mmHg)	Ogółem	70/157/67	49.1 ± 1.4	48.4 ± 0.9	48.1 ± 1.6	0.88
	Rodzice	28/76/29	48.7 ± 1.8	52.1 ± 1.3	49.0 ± 2.2	0.20
	Dzieci	42/81/38	47.5 ± 1.7	45.7 ± 1.2	47.6 ± 1.5	0.51
Aortalne ciśnienie tętna (mmHg)	Ogółem	70/157/67	33.5 ± 1.1	34.3 ±0.6	34.4 ± 1.1	0.73
	Rodzice	28/76/29	36.6 ± 1.4	41.1 ± 0.9	41.3 ±1.5	0.05
	Dzieci	42/81/38	29.5 ± 0.9	28.3 ± 0.7	29.4 ± 1.0	0.46
Obwodowy wskaźnik wzmocnienia (%)	Ogółem	70/157/67	64.7 ± 1.8	68.8 ± 1.0	68.6 ± 1.3	0.12
	Rodzice	28/76/29	80.4 ± 2.8	86.1 ± 1.4	87.9 ± 1.7	0.09
	Dzieci	42/81/38	48.8 ± 2.3	54.2 ± 1.1	53.2 ± 1.6	0.13
Aortalny wskaźnik wzmocnienia (%)	Ogółem	70/157/67	12.6 ± 1.3	15.3 ±0.8	16.4 ±1.1	0.12
	Rodzice	28/76/29	24.1 ± 1.9	27.5 ± 0.8	29.1 ±1.3	0.13
	Dzieci	42/81/38	0.9 ± 0.7	5.2 ±0.9	5.3 ± 1.3	0.12

Pomimo faktu, iż P_{ANOVA} dla różnic pomiędzy trzema genotypami nie osiągało istotności statystycznej ($P_{ANOVA} \leq 0.13$), dla obydwu wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego, stwierdzono ich istotnie wyższe wartości u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot -344TT syntazy aldosteronu (ryc. 16). Analiza całej badanej populacji oraz subanaliza młodszego pokolenia nie ujawniły różnic w wartościach obwodowego i aortalnego ciśnienia tętna pomiędzy nosicielami allelu -344C a homozygot -344TT syntazy aldosteronu ($p \geq 0.40$). W pokoleniu rodziców stwierdzono istotnie wyższą wartość aortalnego ciśnienia tętna u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot -344TT (41.1 ± 0.8 vs 36.6 ± 1.4 mmHg; $p = 0.032$). Takich różnic nie obserwowano w wartościach obwodowego ciśnienia tętna (51.3 ± 1.1 vs 48.7 ± 1.8 mmHg; $p = 0.33$) u rodziców.

Ryc. 16. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu

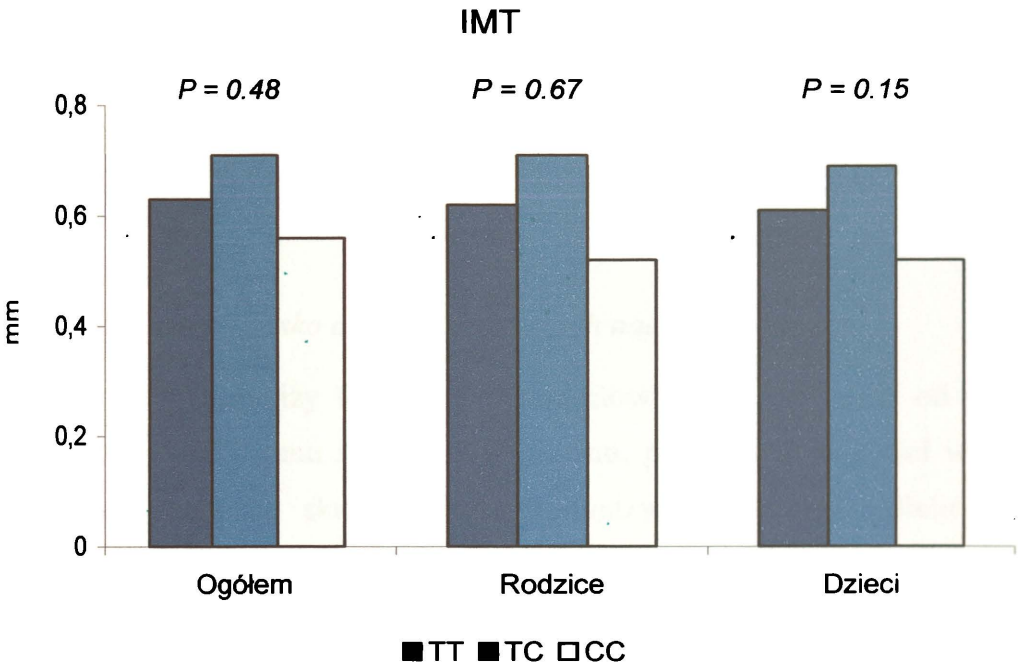
Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, terapii przeciwnadciśnieniowej, palenia tytoniu, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie; Cyfry odpowiadają liczbie osób w grupach



Oceniając grubość kompleksu intima – media tętnicy szyjnej wspólnej nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od genotypu polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu (ryc. 17). Homozygoty -344TT nie różniły się istotnie wartościami grubości IMT w porównaniu do nosicieli allelu -344C w całej badanej populacji i podgrupach pokoleniowych ($p \geq 0.29$).

Ryc. 17. IMT tętnicy szyjnej wspólnej w zależności od genotypu polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, poziomu triglicerydów, terapii przeciwnadciśnieniowej, palenia tytoniu



Poziom dobowego wydalania sodu, potasu oraz aldosteronu z moczem był porównywalny w grupach genotypowych polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu zarówno w całej populacji badanej, jak i w pokoleniu rodziców i dzieci. Wyniki analizy asocjacji fenotypów biochemicznych z badanym polimorfizmem zestawiono w tabeli 14. Porównując poziomy dobowego wydalania sodu, potasu i aldosteronu z moczem nosicieli allelu -344C vs homozygoty -344TT również nie stwierdzono istotnych różnic ($p \geq 0.32$).

Tab. 14. Dobowe wydalanie sodu i potasu oraz aldosteronu w rodzinach nuklearynych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu
Analiza z uwzględnieniem wieku i płci

Fenotyp		Liczba osób	Wystandaryzowana średnia ± SE			
		<i>TT/TC/CC</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>P_{ANOVA}</i>
Na ⁺ (mmol/dobę)	Ogółem	55/113/53	236 ± 11	242 ± 8	253 ± 12	0.57
	Rodzice	18/39/17	241 ± 12	252 ± 15	248 ± 17	0.76
	Dzieci	37/74/36	236 ± 11	234 ± 7	267 ± 19	0.27
K ⁺ (mmol/dobę)	Ogółem	55/113/53	63 ± 3	63 ± 2	67 ± 3	0.52
	Rodzice	18/39/17	60 ± 5	67 ± 4	69 ± 6	0.50
	Dzieci	37/74/36	63 ± 4	61 ± 2	67 ± 4	0.37
Aldosteron (nmol/dobę)	Ogółem	55/113/53	10.5 ± 1.1	10.2 ± 1.0	10.5 ± 1.1	0.97
	Rodzice	18/39/17	10.7 ± 1.1	10.0 ± 1.1	11.0 ± 1.1	0.73
	Dzieci	37/74/36	10.7 ± 1.1	10.7 ± 1.1	10.0 ± 1.1	0.90

Interakcja gen – środowisko a własności dużych naczyń tętniczych

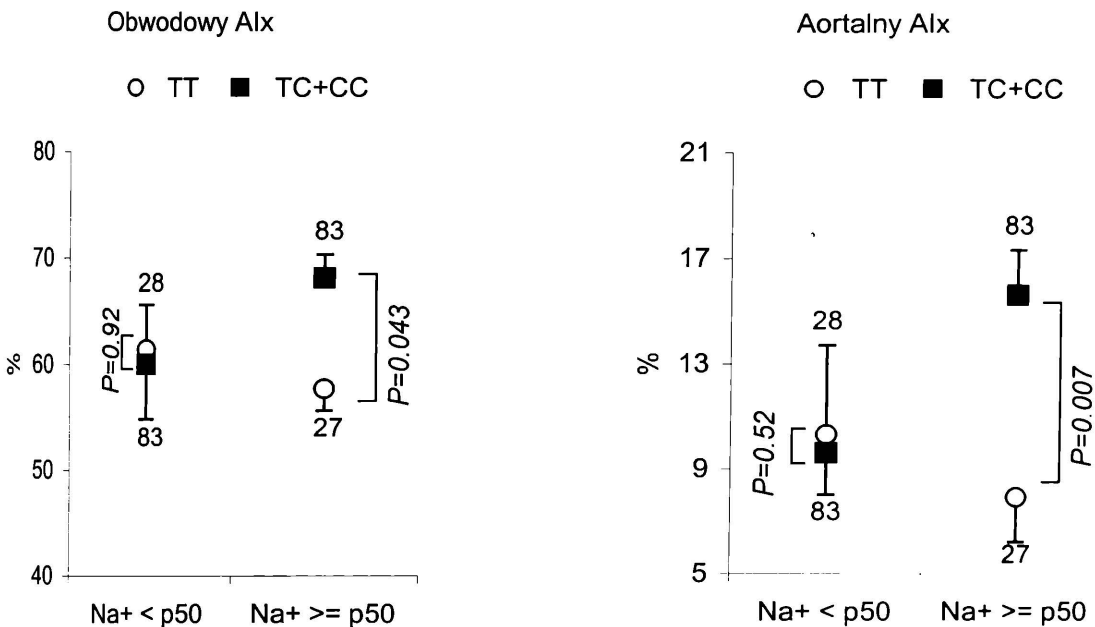
W kolejnym etapie analizy fenotypów naczyniowych w zależności od genotypów polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu, porównano wartości wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego pomiędzy nosicielami allelu -344C i homozygotami TT w subpopulacji bez leczenia przeciwnadciśnieniowego (n = 221) w zależności od mediany dobowego wydalania sodu z moczem.

Zarówno obwodowy jak i aortalny wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego był istotnie wyższy u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot TT syntazy aldosteronu u osób, których dobowe wydalanie sodu przekraczało odpowiednią do płci medianę wydalania. Różnic tych nie obserwowano w populacji osób z dobowym wydalaniem sodu poniżej mediany. Interakcja czynnika genetycznego (badany polimorfizm) i czynnika środowiskowego (poziomu wydalanego sodu) w warunkowaniu zarówno obwodowego jak aortalnego wskaźnika wzmocnienia nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (ryc. 18).

Ryc. 18. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia wg. genotypów syntazy aldosteronu i mediany wydalanego sodu w grupie 221 nieleczonych osób

Wartości odzwierciedlają skorygowane średnie $\pm$ SE

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, terapii przeciwnadciśnieniowej, palenia tytoniu, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie



Test nierównowagi transmisji

Do analizy fenotypów sztywności tętnic, wyników uzyskiwanych z ABPM i IMT w modelu ortogonalnym QTDT włączono odpowiednio 117, 114 i 73 informatywnych potomków.

W ilościowym teście nierównowagi transmisji stwierdzono, że obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego wzrastały (odpowiednio: +1.51% i +1.57%) wraz z transmisją allelu -344C syntazy aldosteronu (tab. 15). Pomimo zgodności kierunku zmiany obwodowego i aortalnego wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego w zależności od transmisji allelu -344C z wynikami uzyskanymi w analizie asocjacji w całej grupie badanej, QTDT nie osiągnął istotności statystycznej ($p \geq 0.30$).

Tab. 15. QTDT analiza wybranych fenotypów w stosunku do genu syntazy aldosteronu

β - statystyka beta dla wewnątrzrodzinnej wariancji odzwierciedla kierunek i wielkość asocjacji gdy jest dziedziczony allel -344C syntazy aldosteronu

Analiza z uwzględnieniem wieku, płci, wskaźnika masy ciała, terapii przeciwnadciśnieniowej i palenia tytoniu oraz dodatkowo odpowiednio: dla PP_{obw} - wzrostu; dla AIx - średniego ciśnienia tętniczego krwi, częstości akcji serca, spożycia alkoholu i osoby wykonującej badanie; dla IMT - wskaźnika masy ciała, poziomu triglicerydów

Fenotyp	Informatywni potomkowie/ wszyscy potomkowie	Ortogonalny model		
		β ,	χ^2	P
Obwodowe PP (mmHg)	117/161	-0.51	0.09	0.76
Aortalne PP (mmHg)	117/161	-1.21	1.59	0.21
Obwodowy AIx (%)	117/161	1.51	0.82	0.37
Aortalny AIx (%)	117/161	1.57	1.07	0.30
IMT (mm)	73/103	-0.003	3.86	0.06
<i>CTK (mmHg):</i>				
Dobowe skurczowe	114/158	1.58	2.54	0.11
Dobowe rozkurczowe	114/158	0.84	0.88	0.35
Skurczowe dzień	114/158	1.05	0.81	0.37
Rozkurczowe dzień	114/158	0.02	0.00	0.98
Skurczowe noc	114/158	2.08	3.06	0.08
Rozkurczowe noc	114/158	1.63	2.62	0.11
Skurczowe - obniżka nocna (%)	114/158	-.096	0.64	0.42
Rozkurczowe -obniżka nocna (%)	114/158	-0.91	0.78	0.38

Dyskusja i omówienie wyników

W przeprowadzonych badaniach w populacji regionu krakowskiego oceniono związek wybranych fenotypów układu krążenia z wariantami polimorficznymi dwóch genów kandydatów nadciśnienia tętniczego. Ponieważ w pojęciu uwarunkowań genetycznych ciśnienie tętnicze jest fenotypem końcowym, badanie skoncentrowane zostało na analizie, poza ciśnieniem tętniczym *per se*, powiązanego fenotypu jakim jest struktura i funkcja naczyń tętniczych. Z uwagi na wieloczynnikowe uwarunkowanie badanych fenotypów w analizie uwzględniano zarówno osobnicze jak i środowiskowe determinanty, takie jak płeć, wiek oraz szereg czynników stylu życia w tym poziom spożywanego sodu.

Polimorfizm genu kodującego podjednostkę α adducyny a badane fenotypy

Adducyna jest błonowym białkiem zbudowanym ze stosunkowo podobnych podjednostek α , β i γ (116). Białko to pełni istotną rolę warunkując morfologię komórki i regulując transport błonowy jonów sodu (59, 116, 170). Badania genetyczne zarówno na modelach zwierzęcych (23), jak i w różnych grupach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (47, 113, 114) zgodnie wskazują, że białko adducyna odgrywa istotną rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego poprzez modulację aktywności Na^+/K^+ ATPazy. U ludzi gen kodujący podjednostkę α białka adducyny zlokalizowany jest na chromosomie 4p16 (105). Polimorfizm $G \rightarrow T$ znajduje się w 460 kodonie genu α adducyny i prowadzi do substytucji aminokwasu glicyna przez tryptofan.

W przeprowadzonej analizie stwierdzono że obecność allelu 460Trp α adducyny wiązała się z istotnie większą ($p = 0.021$) nocną obniżką rozkurczowego ciśnienia tętniczego, aczkolwiek ten związek nie znalazł potwierdzenia w analizie nierównowagi transmisji ($p = 0.92$). Pozostałe parametry ciśnieniowe nie wykazywały związku z polimorfizmem Gly460Trp genu podjednostki α białka adducyny ($p > 0.08$). Wskaźniki sztywności naczyń tętniczych i grubość kompleksu intima - media tętnicy szyjnej wspólnej również pozostawały bez związku z

badanym polimorfizmem ($p > 0.18$). Analiza poszczególnych grup pokoleniowych nie wniosła dodatkowych informacji. Nie zaobserwowano asocjacji badanych fenotypów z faktem transmisji allelu Trp α adducyny pośród informatywnych potomków ($p > 0.07$).

Analiza losowej próbki populacji będącej przedmiotem niniejszego opracowania pozwoliła prześledzić rzeczywistą częstość występowania zmutowanego allelu badanego polimorfizmu genu α adducyny w podgrupach osób zarówno z nadciśnieniem tętniczym jak i prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego krwi. W badanej populacji częstość allelu Trp genu α adducyny wyniosła 16.5%, podobnie kształtowało się również występowanie tego allelu w grupie osób z i bez nadciśnienia tętniczego, odpowiednio 16.7% i 16.4%. Są to częstotliwości zbliżone do podanych przez Ciechanowicza i wsp. (41) z innego regionu Polski, gdzie w grupie 68 osób z nadciśnieniem tętniczym częstość allelu Trp wynosiła 12.5%. W cytowanym badaniu 44 osób z sodowrażliwym nadciśnieniem tętniczym oraz 24 osób z nadciśnieniem niewrażliwym na zmianę zawartości sodu w diecie, częstość allelu Trp była identyczna (12.5%) (41). Badania nad polimorfizmem Gly460Trp genu α adducyny wykazały, że w populacjach europejskich częstość allelu Trp wynosi około 20% (42, 70, 81) natomiast w azjatyckich - sięga 60% (81, 140, 162), a Ishikawa i wsp (81) wykazali, że różnice te są istotne statystycznie ($p < 0.0001$). Różnice etniczne w rozkładzie alleli tego polimorfizmu potwierdza badanie Glorioso i wsp. (70) przeprowadzone we Włoszech, gdzie nie obserwowano różnic w częstotliwości allelu Trp pomiędzy osobami z i bez nadciśnienia tętniczego (odpowiednio: 20.8% vs 18.8%) w mieście Sassari (Sardynia), natomiast istotnie częściej allel Trp występował pośród osób z nadciśnieniem tętniczym (19.0% w porównaniu do osób bez nadciśnienia 13.5%; $p = 0.019$) zamieszkałych w Mediolanie.

Szereg przeprowadzonych badań (16, 47, 136), aczkolwiek nie wszystkie (81, 83), wykazało asocjację pomiędzy poziomem ciśnienia tętniczego, bądź faktem występowania nadciśnienia, z polimorfizmem Gly460Trp α adducyny (21). W populacji zamieszkałej w badanym regionie Polski nie obserwowano związku nosicielstwa allelu Trp jak również faktu transmisji tego allelu z istotnie wyższymi

wartościami ciśnienia tętniczego bądź faktem rozpoznania nadciśnienia tętniczego. Stwierdzono natomiast istotnie ($p = 0.021$) mniejszą obniżkę nocną rozkurczowego ciśnienia tętniczego u homozygot GlyGly w porównaniu do nosicieli allelu Trp polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny, czego nie obserwowano dla obniżki nocnej skurczowego ciśnienia. Stwierdzona asocjacja mniejszego obniżania ciśnienia w nocy w badanej populacji z genotypem GlyGly może odzwierciedlać różnicę w nosicielstwie innego genetycznego wariantu, który w badanej populacji Małopolski moduluje efekt tego polimorfizmu α adducyny na transport sodu a następnie profil dobowy ciśnienia (33). Nie można również wykluczyć wyniku pozytywnie fałszywego, zważywszy brak jego potwierdzenia w teście nierównowagi transmisji oraz fakt, iż rejestracja rozkurczowego ciśnienia tętniczego jest narażona w większym stopniu na błąd pomiaru aniżeli rejestracja skurczowego ciśnienia. We wcześniej cytowanej pracy Ciechanowicza i wsp. (41) dotyczącej również populacji polskiej nie stwierdzono związku polimorfizmu Gly460Trp z sodowrażliwością nadciśnienia tętniczego. W aktualnym badaniu, ze względu na liczebność grupy nie przeprowadzono analizy sodowrażliwości nadciśnienia tętniczego, wymagającej ścisłej restrykcyj w ilości spożywanego sodu do 20 – 30 mmol Na/24 godziny z następowym podaniem bogatosodowej diety (240 – 260 mmol Na/24 godziny) (163).

Z dotychczas przeprowadzonych badań nad związkiem polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny z sodowrażliwym nadciśnieniem tętniczym większość dotyczy populacji jednego regionu (47), wyniki których (17, 70, 114, 148) zgodnie wskazują na istotny związek tego polimorfizmu z sodowrażliwością. Ponadto w badaniu Grant'a i wsp. (71) u osób z nadciśnieniem tętniczym z niskim poziomem reniny w osoczu obserwowano częstsze występowanie genotypu TrpTrp w porównaniu do hipertoniców wysokoreninowych. Podobnie Sugimoto i wsp. (162) stwierdzili asocjację allelu 460Trp z niskoreninowym nadciśnieniem tętniczym. Tylko cytowane badanie polskie (41) nie potwierdziło związku polimorfizmu Gly460Trp α adducyny z sodowrażliwością nadciśnienia. Wydaje się, iż wysokie spożycie sodu, które cechuje polską populację (1, 160) może maskować efekt mutacji genu α adducyny w badanym regionie.

Porównanie wyników niniejszego opracowania z wynikami dotychczasowych badań jest utrudnione z uwagi na fakt, iż oceniając związek polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny z ciśnieniem tętniczym posługiwano się w nich tradycyjnymi pomiarami ciśnienia tętniczego. W niniejszym opracowaniu wykorzystano metodę całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi, która pozwala na dokładniejszą ocenę wartości ciśnienia tętniczego oraz jego rytmu dobowego. Badacze Japońscy oceniali dobowe wartości ciśnienia tętniczego w zależności od badanego polimorfizmu α adducyny w populacji ogólnej Ohasama Study (162). W podgrupie 190 osób poniżej 60 roku życia stwierdzono istotnie wyższe wartości skurczowego ciśnienia tętniczego z okresu dnia i nocy u nosicieli allelu Trp genu α adducyny. Badacze nie analizowali natomiast stopnia obniżania ciśnienia tętniczego w nocy. Należy podkreślić iż porównanie wyników badań asocjacji tych samych polimorfizmów z fenotypem uzyskiwanym według podobnego protokołu nie może być dokonywane bez uwzględnienia innych zmiennych zakłócających, jak wiek, częstość alleli badanego polimorfizmu oraz kierunku zmiany fenotypu ilościowego w zależności od genotypu (100). I tak zasadniczą różnicą pomiędzy wynikami własnymi a cytowanym badaniem japońskim jest częstsze występowanie genotypu TrpTrp genu α adducyny w japońskiej populacji (odpowiednio 28% vs 5%).

Doniesienia analizujące parametry sztywności i przebudowy tętnic w odniesieniu do polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny są nieliczne i obszar ten pozostaje ciągle mało zbadany. W badanej populacji nie stwierdzono istotnych różnic wskaźników sztywności tętnic i grubości IMT w zależności od genotypu polimorfizmu Gly460Trp α adducyny, zarówno w całej grupie jak i w podgrupach pokoleniowych ($P \geq 0.18$). Balkestein i wsp. (14, 15) analizowali fenotypy naczyniowe w odniesieniu do badanego polimorfizmu α adducyny oraz polimorfizmu insercyjno-delecyjnego enzymu konwertującego angiotensynę (ACE I/D) i polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu. W grupie 756 uczestników badania populacyjnego FLEMENGHO – The Flemish Study on Environment, Genes and Health Outcomes, badacze nie stwierdzili istotnej asocjacji pomiędzy polimorfizmem Gly460Trp genu α adducyny ze wskaźnikami sztywności tętnic (14), podobnie jak niniejsze opracowanie. Choć w badaniach flamandzkich efekt pojedynczego polimorfizmu pozostawał bez związku z badanymi fenotypami, to wśród homozygot DD

polimorfizmu ACE I/D, grupę 99 homozygot GlyGly α adducyny cechowała istotnie mniejsza podatność ($p < 0.05$) i rozszerzalność ($p < 0.01$) tętnicy udowej w porównaniu do 75 nosicieli allelu Trp (14). Z kolei w grupie 380 uczestników badania FLEMENGHO nie obserwowano związku badanego polimorfizmu z grubością IMT (15), natomiast gdy analizowano tylko nosicieli allelu Trp polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny to stwierdzono, że u homozygot DD polimorfizmu ACE I/D średnia grubość IMT była o 86 μm większa ($p = 0.01$) od średniej IMT w badanej populacji, a u homozygot II polimorfizmu ACE I/D średnia grubość IMT była o 59 μm mniejsza ($p = 0.06$).

Rozbieżność wyników badań nad związkiem polimorfizmu Gly460Trp α adducyny z ciśnieniem tętniczym (27) oraz brak związku z fenotypami naczyniowymi może wynikać z różnic metodologicznych poszczególnych badań, różnic w doborze populacji (różny wiek uczestników, dobór szczególnych grup etnicznych), nieuwzględniania interakcji genowych oraz wpływu czynników środowiskowych w warunkowaniu tych fenotypów.

W niniejszym opracowaniu, po uwzględnieniu poziomu spożywanego sodu w badanej populacji, ocenianego na podstawie wydalania sodu z moczem w 24 godzinnej zbiorce (110), ujawniono istotną interakcję ($P_{\text{int}} \leq 0.023$) czynnika środowiskowego, jakim jest dobowe wydalanie sodu z moczem oraz genetycznego, czyli polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny w warunkowaniu własności elastycznych naczyń tętniczych. Większe spożycie sodu wiązało się z wyższymi wartościami obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia jedynie u homozygot GlyGly ($p \leq 0.041$). We wcześniejszych badaniach wykazano, że nosiciele zmutowanego allelu Trp α adducyny mają genetycznie uwarunkowaną zwiększoną aktywność Na^+/K^+ - ATPazy (59), co może prowadzić do retencji sodu (47, 113) i modulacji fenotypów naczyniowych i ciśnienia tętniczego (47). Badania ostatnich lat podkreślają wpływ endogennej ouabainy wydzielanej w nadnerczach na funkcję pompy sodowo – potasowej, a przez to regulację funkcjonowania układu sercowo – naczyniowego (180). Działanie osoczowej ouabainy jest modulowane poprzez poziom spożywanego sodu, ponadto wykazano, iż jej poziom liniowo, dodatnio koreluje z obecnością w genotypie zmutowanego allelu Trp genu α

adducyny (180). Na tej podstawie można przypuszczać, iż ouabaina pośredniczy w modulowaniu fenotypów naczyniowych w zależności od genotypu badanego polimorfizmu i spożycia soli. Dlatego też w dalszych badaniach nad polimorfizmem Gly460Trp genu α adducyny istotne wydają się być następujące aspekty: uwzględnienie poziomu endogennej ouabainy i jej związku z poziomem sodu w modulacji związku polimorfizmu Gly460Trp z fenotypami sercowo – naczyniowymi. Ciekawe wydaje się również badanie interakcji genowych, które są istotnym elementem w studiowaniu genetycznych uwarunkowań nadciśnienia tętniczego i fenotypów powiązanych. Interesującym kierunkiem jest analiza wspólnego efektu (epistatic effect) polimorfizmów w obrębie wszystkich trzech podjednostek białka adducyny. Na podstawie analizy europejskich populacji badania EPOGH, w grupie 642 osób stwierdzono bowiem iż nosicieleli allelu 460Trp cechowała istotnie większa wartość obwodowego i aortalnego ciśnienia tętna tylko wówczas, gdy byli oni nosicielami allelu G polimorfizmu A386G genu podjednostki γ adducyny, przy czym istotną asocjację w tym materiale potwierdzono w teście nierównowagi transmisji (48).

Polimorfizm genu kodującego syntazę aldosteronu a badane fenotypy

Syntaza aldosteronu jest cytochromem P450, który katalizuje reakcję w łańcuchu syntezy aldosteronu. Korespondujący gen jest zlokalizowany na chromosomie 8. W niniejszym opracowaniu analizowano polimorfizm C–344T regionu wiązania czynnika transkrypcyjnego SF-1 w promotorze genu syntazy aldosteronu. Szereg badaczy analizowało *in vitro* potencjalną rolę polimorfizmu w tym regionie genu syntazy aldosteronu (18, 43, 151, 184). White i wsp. (184) zaobserwowali, że obecność allelu –344C w promotorze genu syntazy aldosteronu czterokrotnie zwiększa wiązanie czynnika transkrypcyjnego SF-1, co według autorów może prowadzić do modulowania ekspresji genu, a przez to wpływać na aktywność enzymu zmieniając w ten sposób syntezę aldosteronu. Jednakże Clyne i wsp. (43) wykazali, że wiązanie czynnika SF-1 przez motyw wokół miejsca polimorficznego C–344T nie wykazuje bezpośrednich skutków dla funkcji genu syntazy aldosteronu. Pośrednio natomiast mniejsze powinowactwo SF-1 do allelu –344T powoduje zwiększenie wiązania tego czynnika z motywami w pozycjach -129/-114 i -71/-64,

niezbędnych w podstawowej i stymulowanej przez angiotensynę II lub jony potasu transkrypcji genu syntazy aldosteronu (43). Z powodu zmniejszonego powinowactwa do czynnika SF-1, postuluje się, że allel -344T wiąże mniejszą ilość czynnika transkrypcyjnego SF-1, co powoduje większe wiązanie tego czynnika z funkcjonalnymi miejscami w promotorze tego genu, przez to zwiększając transkrypcję genu CYP11B2. Pomimo przytoczonych faktów eksperymentalnych nie można nadal całkowicie wykluczyć bezpośredniej funkcjonalnej roli polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu, bowiem ekspresję tego genu obserwowano w komórkach mięśnia sercowego oraz w ścianie naczyniowej, ponadto może być ona regulowana odmiennie w tych tkankach w porównaniu do tkanek steroidogennych, bowiem w naczyniach wiązanie czynnika SF-1 do CYP11B2 stymuluje a nie hamuje transkrypcję (151).

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że nosiciele allelu -344C polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu wykazują wyższe wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w nocy oraz mniejszą obniżkę nocną zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi. Analiza pokolenia potomków potwierdziła wyższe wartości skurczowego ciśnienia tętniczego w okresie całej doby u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot TT. W zgodności z wynikami ciśnienia tętniczego pozostawały również wyniki analizy sztywności tętnic, bowiem istotnie wyższe wartości wskaźników wzmocnienia ciśnienia tętniczego obserwowano również u nosicieli allelu -344C genu syntazy aldosteronu, przy czym subanaliza w każdym z pokoleń potwierdziła obserwowaną w całej populacji asocjację badanego polimorfizmu z fenotypem naczyniowym. Ponadto stwierdzono, że efekt badanego genotypu był szczególnie widoczny u osób z ponad przeciętnym dobowym wydalaniem sodu z moczem (ok. 230 mmol/dzień).

W populacji regionu Krakowa i Gminy Niepołomice częstość allelu -344T polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu wynosiła 50.5%. Porównywalną częstość obserwowano u osób z i bez nadciśnienia tętniczego, odpowiednio 49.6% i 51.2%. Bardzo zbliżone dane pochodzą z cytowanego wcześniej badania Ciechanowicza i wsp. W populacji 65 osób z sodowrażliwym nadciśnieniem tętniczym częstość allelu -344T wyniosła 48.5% a w grupie 41 osób sodoniewrażliwych odpowiednio 50% (40). W badaniu Brand i wsp. (31)

przeprowadzonym w Berlinie w grupie 163 młodych mężczyzn bez nadciśnienia tętniczego stwierdzona częstość allelu –344T wyniosła 48%, co potwierdza porównywalny rozkład alleli tego polimorfizmu w obydwu nieodległych regionach Europy. W EPOGH Stolarz i wsp. (160) analizując polimorfizm C–344T genu CYP11B2 w sześciu populacjach europejskich obserwowali podobną częstość allelu –344T polimorfizmu C–344T genu CYP11B2 w Rosji, Polsce, Włoszech, Rumunii i Czechach (odpowiednio: 49.5%, 50.4%, 51.0%, 56.3%, 57.6%), natomiast częstość tego allelu w Belgii była istotnie większa i wynosiła 58.1% ($p < 0.05$). Podobnie w Japonii w dwóch badaniach obserwowano częstsze (64%) występowanie allelu –344T genu syntazy aldosteronu (115, 167), co świadczy o różnicach w częstotliwości genotypów tego polimorfizmu zależnych od regionu objętego badaniem i być może również rasy.

Wyniki omawianego opracowania wyraźnie wskazują na związek obecności allelu –344C w promotorze genu CYP11B2 z wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego, wykazanie tego związku było możliwe dzięki zastosowaniu całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego, gdyż różnic takich nie obserwowano w domowych pomiarach ciśnienia tętniczego. Dotychczasowe badania w populacjach różnych krajów nad związkiem polimorfizmu C–344T genu syntazy aldosteronu nie pozwalają na jednoznaczne wnioski. Szereg badań bowiem wskazuje na rolę allelu –344C w warunkowaniu wartości ciśnienia / występowania nadciśnienia tętniczego (97, 167, 172), natomiast inne – rolę tę przypisują allelowi –344T (30, 51), bądź negują związek badanego polimorfizmu z nadciśnieniem tętniczym (95, 171).

Odniesienie wyników własnych do cytowanych w literaturze jest utrudnione z uwagi na odmienną metodykę badawczą. Większość dotychczasowych badań przeprowadzono w oparciu o tradycyjne pomiary ciśnienia tętniczego krwi. W badaniach japońskich stosowano ABPM, Tamaki i wsp. (167) przeprowadzili ABPM w grupie 65 osób u których wcześniej na podstawie pomiarów domowych rozpoznano nadciśnienie tętnicze. Badacze stwierdzili częstsze występowanie braku nocnego spadku ciśnienia tętniczego krwi u nosicieli allelu –344C genu syntazy aldosteronu (167). W uprzednio cytowanym badaniu Ohasama Study, podobnie jak w opracowaniu własnym, analizowano w populacji ogólnej całodobowy profil ciśnienia tętniczego i jego obniżkę nocną (115). Otóż w grupie 802 osób w wieku

powyżej 40 lat stwierdzono mniejszą redukcję nocną skurczowego ciśnienia tętniczego u nosicieli allelu -344T genu syntazy aldosteronu w porównaniu do homozygot -344CC (115). Wykazano więc w przeciwieństwie do badania własnego związek obecności w genotypie allelu -344T a nie -344C z faktem mniejszej obniżki nocnej ciśnienia skurczowego. Oprócz przeciwstawnych wyników dwu populacyjnych badań analizujących ten sam fenotyp, wysuwają się na pierwszy plan diametralne różnice w częstości alleli badanego polimorfizmu (częstość allelu -344T wynosiła w Japonii i Polsce odpowiednio: 64% i 50.5%) oraz w wieku badanej populacji; średnia wieku populacji polskiej wynosiła 37.3 lata a w Japonii rekrutowano osoby powyżej 40 roku życia. Aktualny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie określić roli polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu w warunkowaniu wartości ciśnienia tętniczego oraz jego profilu dobowego. Długoterminowe badanie obserwacyjne jednolitej populacji może pozwolić na ustalenie prognostycznego znaczenia tego polimorfizmu.

Przebudowa ściany naczyniowej dużych naczyń tętniczych, zwiększenie jej sztywności może prowadzić do rozwoju bądź być przyczynkiem progresji nadciśnienia tętniczego. Aldosteron jest istotnym ogniwem układu renina - angiotensyna - aldosteron i wraz z innymi jego składowymi moduluje wartość ciśnienia tętniczego i przebudowę ściany naczyniowej. W niniejszym opracowaniu istotnie większą wartość skurczowego wzmocnienia ciśnienia tętniczego i aortalnego ciśnienia tętna - czynników odzwierciedlających sztywność tętnic - stwierdzono u nosicieli allelu -344C genu CYP11B2. Fakt transmisji tego allelu nie asocjował natomiast z większą sztywnością tętnic, co może wynikać z małej liczby osób ($n = 117$) objętych analizą w teście nierównowagi transmisji. W osobnej analizie, w której oprócz aktualnej populacji polskiej uwzględniono dwie inne europejskie populacje - łącznie 622 osoby, wyższe wartości AIx_{obw} i AIx_{ao} asocjowały zarówno z obecnością w genotypie allelu -344C jak i z faktem jego transmisji wśród 216 informatywnych potomków (190).

W zgodności z wynikami własnego opracowania pozostają wyniki badania Pojoga i wsp. (134), którzy wykazali w grupie 216 osób z nadciśnieniem tętniczym wyższe wartości prędkości fali tętna u nosicieli allelu -344C genu syntazy aldosteronu.

Pomimo przytoczonych powyżej argumentacji wydaje się jednak, że aktualny stan wiedzy szczególnie w zakresie badań eksperymentalnych nie pozwala na dokładne prześledzenie fizjologicznych i molekularnych mechanizmów poprzez które badany polimorfizm może wpływać na sztywność naczyń i prędkość fal odbitych.

W badaniu własnym pomimo asocjacji polimorfizmu C-344T genu CYP11B2 z fenotypem naczyniowym i ciśnieniowym nie stwierdzono różnic w poziomie wydalania aldosteronu i elektrolitów z moczem ($p > 0.27$). Wyniki innych badań nad domniemanym związkiem tego polimorfizmu z poziomem osoczkowego lub wydalanego z moczem aldosteronu nie są jednoznaczne. Podczas gdy Pojoga i wsp. (134) wykazali istotnie wyższy osoczkowy poziom aldosteronu u nosicieli allelu -344C genu syntazy aldosteronu, to Paillard i wsp. stwierdzili jego wyższy poziom u nosicieli allelu -344T (129), natomiast inni autorzy obserwowali związek większego wydalania aldosteronu z moczem z nosicielstwem allelu -344T tego polimorfizmu genetycznego (51, 77). Blacher i wsp. (24) wśród osób z nadciśnieniem tętniczym stwierdzili ścisłą odwrotną korelację ($r = -0.497$; $p < 0.01$) pomiędzy podatnością tętnic a osoczkowym poziomem aldosteronu, należy jednak podkreślić, iż nie obserwowano tej korelacji w grupie osób bez nadciśnienia tętniczego. Brak bezpośredniego związku pomiędzy sztywnością naczyń a poziomem aldosteronu wydalanego z moczem w opracowaniu własnym ($p > 0.34$) podobnie jak w innych badaniach (24, 97) nie neguje możliwości wpływu aldosteronu na ścianę naczyniową, bowiem hormon ten wytwarzany jest również lokalnie w endotelium czy mięśniówce gładkiej naczyń tętniczych (57). I tak, w badaniach na zwierzętach stwierdzono, że w tkankach mięśnia sercowego szczurów stężenie aldosteronu było 17 – krotnie wyższe w porównaniu do jego poziomu we krwi (150). Ponadto badania ostatnich lat wskazują, że receptory dla aldosteronu znajdują się w mięśniówce gładkiej i endotelium ściany naczyniowej tętnicy płucnej i aorty u szczurów (106) oraz w tętnicach ludzkich (76). Uważa się, że pośredniczą one w procesach prowadzących do rozrostu i przerostu komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej, uszkodzenia macierzy międzykomórkowej i dysfunkcji endotelium (57). Przewlekła dożylna infuzja aldosteronu ($0.75 \mu\text{g/h}$) u szczurów po jednostronnej nefrektomii prowadzi do nadmiernej kumulacji okołonaczyniowego kolagenu w mięśniu sercowym (104) oraz do nasilenia włóknienia okołonaczyniowego w aorcie (164) i odkładania się depozytów fibronektyny w ścianie tętnicy szyjnej (101). Ponadto również w modelach zwierzęcych spironolakton zmniejszał indukowany przez

aldosteron wzrost sztywności ściany naczyniowej niezależnie od redukcji ciśnienia tętniczego (102). Aldosteron działa na tętnice głównie przez stymulację obrotu kolagenu i indukcję włóknienia w wyniku pojawienia się i replikacji komórek zapalnych i fibroblastów w przestrzeni okołonaczyniowej (164, 182).

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono, że u osób spożywających wyższą od średniej dla populacji ilość sodu wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego był istotnie wyższy u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot -344TT genu syntazy aldosteronu. W niniejszym opracowaniu poziom istotności dla interakcji: gen – poziom wydalanego sodu, w warunkowaniu badanego fenotypu naczyniowego nie osiągnął istotności statystycznej ($p > 0.06$), jednakże w uprzednio cytowanym badaniu dotyczącym trzech populacji europejskich stwierdzono istotną interakcję ($p < 0.029$) (190). W badaniu populacyjnym oceniającym związek polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu ze wskaźnikami zmienności rytmu serca (HRV – heart rate variability), stwierdzono istotną interakcję czynnika genetycznego i środowiskowego, czyli poziomu wydalanego sodu w warunkowaniu wartości wskaźnika LF:HF (Low-to-high frequency index) analizy częstotliwości odzwierciedlającego równowagę współczulno – przywspółczulną w zakresie autonomicznej regulacji układu krążenia (160). Kupari i wsp. (98) w próbie losowej 84 osób populacji ogólnej z Finlandii stwierdzili, iż obecność allelu -344C genu syntazy aldosteronu wiąże się z większą masą lewej komory. Ponadto, w analizie regresji liniowej u homozygot -344TT nie stwierdzono związku między masą lewej komory a poziomem spożywanego sodu, współczynnik regresji miał wartość pośrednią u heterozygot, a najwyższą i wysoce istotną statystycznie u homozygot -344CC genu syntazy aldosteronu, współczynniki regresji i p wyniosły odpowiednio: $r = 0.12$, $p = 0.61$; $r = 0.40$, $p = 0.011$; $r = 0.85$, $p < 0.0001$ (98). W powyższych przytoczonych badaniach nad związkiem polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu z fenotypami układu sercowo - naczyniowego grupę badaną stanowiły osoby wybrane losowo z populacji ogólnej. Natomiast, gdy badano związek tego polimorfizmu ze zjawiskiem sódowrażliwości u chorych z nadciśnieniem tętniczym nie stwierdzono istotnej asocjacji (40, 133).

Rozwój nadciśnienia skurczowego związany z nadmiernym spożyciem sodu wydaje się być wynikiem przeciążenia objętościowego i wzrostu sztywności tętnic (13).

Wzrost sztywności tętnic może wynikać z przewlekłego rozszerzenia tętnic wywołanego przez zwiększoną objętość i przepływ krwi oraz działanie sił ścinających. Długotrwałe ograniczenie spożycia sodu u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi zmniejszało sztywność tętnic, co wskazuje, że sód zawarty w pożywieniu może wywierać niezależny wpływ na właściwości elastyczne dużych tętnic (13). Rola aldosteronu jako modulatora tych zmian jest obecnie intensywnie badana. W modelach zwierzęcych u normotensyjnych szczurów szczepu Wistar-Kyoto dieta wysokosodowa stymulowała ekspresję mRNA dla syntazy aldosteronu w mięśniu sercowym (166). Zwiększony ładunek sodu powodował lokalną aktywację syntezy aldosteronu, co prowadziło do wzrostu jego tkankowego stężenia, z następowym przerostem lewej komory, chociaż bez wzrostu ciśnienia tętniczego (166). Podobnie u szczurów z nadciśnieniem tętniczym pojonnych słoną wodą, w porównaniu do osobników pojonnych zwykłą wodą, wzrastała ekspresja mRNA dla CYP11B2 w ścianie naczyniowej natomiast stężenie osoczowe aldosteronu nie ulegało wzrostowi (165). Tak więc można przypuszczać, że zwiększona podaż sodu powoduje wzrost sztywności tętnic poprzez niewłaściwe hamowanie ekspresji genu syntazy aldosteronu w ścianie naczyniowej, pomimo spadku poziomu tego hormonu w osoczu.

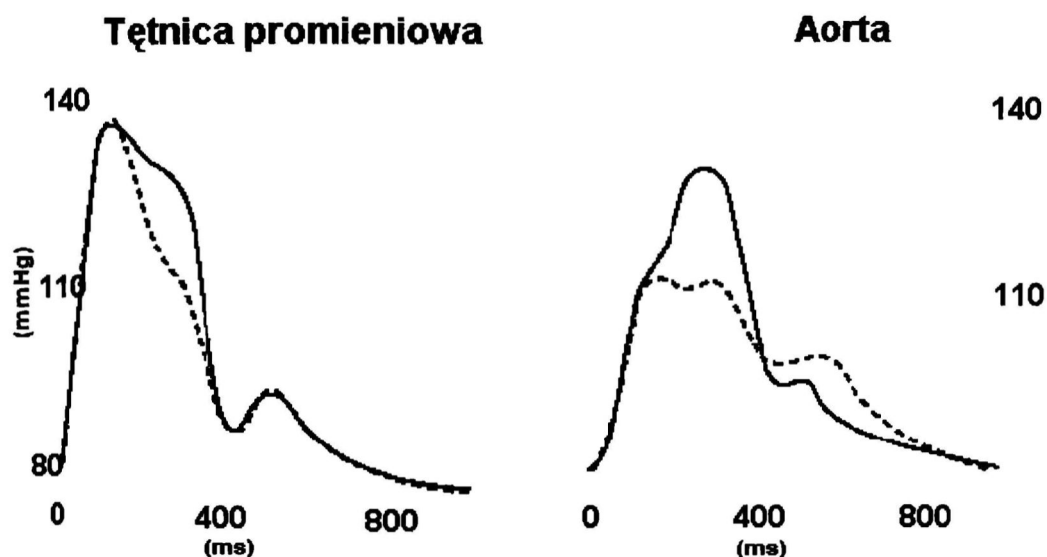
Badane fenotypy układu krążenia

Pomiary ciśnienia tętniczego metodą sfigmomanometryczną są szeroko stosowane w praktyce klinicznej, jak również w próbach klinicznych i epidemiologicznych. Pomiar ciśnienia tętniczego na tętnicy ramiennej pozostaje jednak przedmiotem dyskusji, a to z uwagi na fakt, iż tętnica ta nie jest narządem w którym nadciśnienie tętnicze powoduje największe uszkodzenia. Ponadto rzeczywiste obciążenie następne lewej komory jest odzwierciedlane przez ciśnienie w aorcie wstępującej a nie w tętnicach obwodowych (122).

Jak wynika z ilustracji (ryc. 19), przy porównywalnym ciśnieniu obwodowym obciążenie lewej komory może diametralnie się różnić.

Ryc. 19. Przykładowe zapisy centralnej i obwodowej fali tętna

Linia ciągła – osoba 1; linia przerywana – osoba 2;



W ostatnich latach szereg metod analizy sztywności dużych naczyń tętniczych znalazło zastosowanie zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i epidemiologicznych. Ocena sztywności tętnic jest atrakcyjnym narzędziem diagnostycznym z szeregu powodów. Sztywność tętnic pozostaje w związku z nasileniem ryzyka choroby niedokrwiennej serca (63), nasileniem zmian w tętnicach szyjnych (142), jest ważnym wskaźnikiem prognostycznym zachorowalności i śmiertelności sercowo – naczyniowej (19, 20, 25, 26, 29, 103, 107) i może być zbadana nieinwazyjnie i automatycznie (92, 177).

Analiza fali tętna jest jedną z metod oceny sztywności tętnic, która coraz częściej jest stosowana w badaniach klinicznych (45, 94, 107, 123, 152, 187) jako prosta, nieinwazyjna i powtarzalna metoda (126, 127, 185). W przeprowadzonym badaniu w celu uzyskania dokładnej i powtarzalnej rejestracji fali tętna przy zastosowaniu tonometrii aplanacyjnej zostały spełnione warunki optymalnego pomiaru, jak: odpowiedni trening badacza, pomiar na tętnicy promieniowej, na której w porównaniu do tętnicy szyjnej rejestracja jest łatwiejsza z uwagi na doskonałe podparcie tętnicy o struktury kostne, ponadto analizowano tylko zapisy, które spełniały kryteria kontroli jakości oprogramowania SphygmoCor (4, 92). Aortalna fala tętna, ekstrapolowana na podstawie funkcji przejścia (35, 60, 86) była podstawą do obliczenia centralnego ciśnienia tętna i wskaźnika wzmocnienia ciśnienia

skurczowego w aorcie. Pomimo tego, iż fala tętna uzyskiwana na tętnicy szyjnej, z uwagi na anatomiczną bliskość od aorty wstępującej może być źródłem powyższych wskaźników nawet bez zastosowania funkcji przejścia (36), częściej jednak w badaniach stosowany jest pomiar na tętnicy promieniowej. Jest to uwarunkowane łatwością i szybkością badania na tej tętnicy, które jest dobrze tolerowane przez osobę badaną, co jest szczególnie ważne w dużych populacyjnych programach. Tonometria tętnicy szyjnej wymaga do uzyskania optymalnego zapisu znacznie większego doświadczenia badacza i powoduje dyskomfort dla osoby badanej, ponadto w przypadku osób starszych powinna być poprzedzona ultrasonografią tętnic szyjnych w celu wykluczenia obecności blaszek miażdżycowych w badanej okolicy (36).

Użycie uniwersalnej funkcji przejścia zakłada, iż właściwości układu tętniczego na odcinku aorta – tętnica promieniowa są niezmiennie (122, 126). Nie można jednak pominąć faktu, że w rzeczywistości rozmiar naczyń jest osobniczo zmienny i zależy od wzrostu i wagi, a właściwości elastyczne naczyń zmieniają się wraz ze zmianą ciśnienia, wieku czy farmakoterapii. Jednakże, wyniki badań z użyciem uniwersalnej funkcji przejścia wskazują na ponad 90% zgodność pomiędzy generowaną przy zastosowaniu funkcji przejścia a zarejestrowaną inwazyjnie aortalną falą tętna (35, 60, 86). Taka zgodność tłumaczy się tym, że długość kończyny górnej jest podobna u osób dorosłych, a prędkość fali tętna na kończynie górnej nieznacznie tylko wzrasta z wiekiem (122) czy wzrostem ciśnienia tętniczego (67, 122) oraz w małym stopniu podlega wpływowi leków wazoaktywnych (86, 122).

Zastosowanie matematycznej funkcji przejścia do obliczenia wartości centralnego ciśnienia tętniczego, które różni się od ciśnienia na tętnicy ramiennej z uwagi na fakt wzmocnienia jego wartości na obwodzie, zostało potwierdzone w badaniach (35, 130), natomiast jej wartość w określaniu aortalnego wskaźnika wzmocnienia ciśnienia skurczowego jest nadal dyskutowana w literaturze. Aortalny wskaźnik wzmocnienia zależy bowiem od składowych fali o większych częstotliwościach aniżeli ciśnienie skurczowe, a funkcja przejścia wykazywała większą zmienność pomiędzy badanymi osobami właśnie w zakresie wysokich częstotliwości (35, 60). Millasseau i wsp. (119) stwierdzili, iż wskaźnik wzmocnienia wyliczany z promieniowej fali tętna jest porównywalnym źródłem informacji o powrocie fal odbitych do aorty. Analiza obwodowego i aortalnego ciśnienia tętna i wskaźników wzmocnienia w aktualnym opracowaniu pozwoliła stwierdzić, iż wskaźniki te w

podobny sposób zależą od wieku i płci osób badanych (ryc. 10). Ponadto, podobnie do wyżej cytowanych autorów (119) stwierdzono korelację ($r = 0.97$; $p < 0.0001$) pomiędzy obwodowym i aortalnym wskaźnikami wzmocnienia. Pomimo tego faktu, analizując nachylenie krzywych korelacji: lokalne skurczowe ciśnienie – a odpowiedni wskaźnik wzmocnienia, kąt nachylenia wykresu zależności aortalnego skurczowego ciśnienia od aortalnego wskaźnika wzmocnienia był istotnie większy ($p = 0.0035$) aniżeli kąt nachylenia wykresu zależności tych parametrów na tętnicy obwodowej. Gdy oceniamy falę w aorcie wstępującej obserwujemy, iż na wstępny wzrost ciśnienia (P1 na rycinie 5) wygenerowany wskutek interakcji skurczu lewej komory i sztywności aorty, nakłada się natychmiastowo odbita z obwodu fala. Stąd wydaje się, że to właśnie aortalny wskaźnik wzmocnienia odzwierciedla zmianę ciśnienia w bezpośredniej bliskości od mięśnia sercowego, ponieważ początek powracającej, odbitej fali jest dobrze widoczny na złożonej (rejestrowanej) fali jako zagłębienie, które odzwierciedla zmianę w szybkości narastania ciśnienia (dP/dt). Jest to najwcześniej widoczna rejestracja odbitej fali. Przy założeniu, że miejsce odbicia znajduje się w odległości 15 – 20 cm od pierścienia aortalnego, które w rzeczywistości nie jest pojedynczym anatomicznym miejscem lecz nakładaniem się miriad odbitych fal, powrót do aorty fal odbitych widzimy jako pierwsze zagłębienie na ramieniu anakrotycznym fali aortalnej (122).

Poza kurczliwością lewej komory wskaźnik wzmocnienia zależy głównie od sztywności naczyń i miejsc odbicia fali tętna. Odbicie fal następuje w miejscach zmiany impedancji tętnic jak rozgałęzienia naczyń bądź blaszki miażdżycowe. W przeprowadzonym badaniu w analizach dotyczących wskaźnika wzmocnienia uwzględniano zmienne powiązane takie jak wzrost, odpowiedzialny za anatomiczną różnicę miejsc odbicia fal, czy średnie ciśnienie tętnicze, powiązane z oporem obwodowym, który jest funkcjonalnym predyktorem odbicia fal. Stąd też po uwzględnieniu tych zmiennych wskaźnik wzmocnienia odzwierciedla przede wszystkim sztywność naczyń tętniczych a nie zmianę miejsc odbicia. Badanie własne potwierdziło zależność wskaźnika wzmocnienia od wieku (120, 122), płci (78), wzrostu (191), ciśnienia tętniczego (122) i częstości akcji serca (186).

Metody analizy statystycznej w badanej populacji rodzin nuklearnych

Ponad 150 genów kandydatów zostało dotychczas zbadanych w wielu badaniach typu *case control* pod kontem asocjacji z nadciśnieniem tętniczym (179). Z badań tych nie wynika jednak aby którykolwiek z tych genów miał istotny wpływ na ciśnienie tętnicze. Brak ścisłej standaryzacji fenotypu, nieprawidłowy dobór populacji badanej, zwłaszcza grupy kontrolnej, bądź nieuwzględnienie wszystkich zmiennych zakłócających mogą po części tłumaczyć tak mały postęp badań nad uwarunkowaniami genetycznymi pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Ciśnienie tętnicze zależy od wielu fizjologicznych mechanizmów, stąd wpływ genów kandydatów na rozwój nadciśnienia tętniczego jest najprawdopodobniej niewielki, i ujawnia się w homogenicznych populacjach lub pod wpływem specyficznych okoliczności (71, 79, 121, 124, 162). Obiecującą metodą badania hipotez wpływu znanych genów kandydatów jest zintegrowanie genetycznych i molekularnych badań z epidemiologiczną analizą losowo wybranych rodzin lub osób. W takim podejściu metodologicznym wiele fenotypów mających związek z wystąpieniem nadciśnienia lub jego powikłań może podlegać ocenie w relacji do czynników stylu życia i czynników genetycznych. Zmiany w narządach docelowych będące wynikiem nadciśnienia tętniczego, takie jak przerost mięśnia sercowego (159), przebudowa naczyń (15) czy dysfunkcja nerek (46) są częste w populacji ogólnej, powodują zwiększone ryzyko zachorowalności i śmiertelności sercowo naczyniowej, ale ich objawy kliniczne występują zazwyczaj w końcowym okresie długo trwających procesów patogenetycznych. Zaletą badań epidemiologicznych jest również fakt, iż w populacji ogólnej liczba osób zażywających leki jest stosunkowo niewielka, stąd wartości ciśnienia tętniczego czy wskaźniki elastyczności tętnic mogą zostać zbadane jako zmienne ciągłe bez istotnych zakłóceń np. przez stosowanie terapii przeciwnadciśnieniowej. Ponadto wyniki i doświadczenia płynące z badań bazujących na populacji ogólnej, w odróżnieniu od badań eksperymentalnych, mogą być łatwiej przeniesione do praktyki lekarskiej.

W niniejszej pracy populację badaną stanowiły rodziny nuklearne, w obrębie których przeprowadzono szczegółową analizę według dwóch różnych technik: analizy asocjacji i testu nierównowagi transmisji. Analiza asocjacji genów

kandydatów jest głównym narzędziem identyfikacji czynników genetycznych związanych z fenotypami o wieloczynnikowych uwarunkowaniach. Jest metodą zarezerwowaną dla osób niespokrewnionych, a w analizie są stosowane standardowe metody statystyczne. Główną zaletą takich badań jest prostota i elastyczność w zgłębianiu interakcji pomiędzy genami oraz genami i czynnikami środowiskowymi, które stanowią podłoże fenotypów o wieloczynnikowych uwarunkowaniach.

W badanej populacji rodzin nuklearnych analiza asocjacji była możliwa po zastosowaniu procedury PROC GENMOD bazującej na GEE oprogramowania SAS, która pozwala uwzględnić w analizie wieloczynnikowej zmienne powiązane i zależności fenotypów pomiędzy osobami spokrewnionymi (5, 169). Mimo możliwości analizowania rodzin w GEE, pozostają ograniczenia, właściwe dla badań asocjacji w postaci wyników fałszywie dodatnich uwarunkowanych specyficznością, w tym podłożem etnicznym badanej populacji (33). W celu uniknięcia ograniczeń tej metody zbadano również potencjalną asocjację pomiędzy fenotypami wyrażonymi jako zmienna ciągła oraz transmisją badanych alleli w rodzinach nuklearnych przy zastosowaniu testu nierównowagi transmisji. Początkowo Spielman i wsp. zaproponowali metodę TDT dla analizy binarnych fenotypów, jak występowanie lub nie cukrzycy (154). Większość badanych fenotypów jest, natomiast, wyrażanych jako zmienne ciągłe, jak na przykład wskaźnik wzmocnienia ciśnienia skurczowego. Dla takich fenotypów statystycy zaproponowali szereg metod analizowania zależności fenotyp-transmisja allelu, bez konieczności rekrutacji rodzin z przynajmniej jednym dzieckiem dotkniętym chorobą będącą przedmiotem badania (7, 8, 178). Metoda TDT nie daje wyników fałszywie dodatnich, stąd też Altshuler i wsp. (9) proponują, aby pozytywne wyniki badań opartych na analizie związku, do czasu ich potwierdzenia w teście nierównowagi transmisji, traktować jedynie jako prawdopodobne.

Na podstawie przeprowadzonego badania, rola analizy pojedynczego polimorfizmu genetycznego wydaje się być szczególnie istotna w zrozumieniu złożonych patomechanizmów wieloczynnikowo uwarunkowanych chorób układu krążenia. Taka analiza może stanowić podstawę do dalszych badań z uwzględnieniem interakcji pomiędzy poszczególnymi czynnikami środowiskowymi oraz interakcji typu gen – gen, a także osobniczych różnic w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Należy podkreślić, iż nawet w monogenowych chorobach z typowo

Mendelowskim dziedziczeniem penetracja i ekspresja genotypu może zmieniać się w zależności od rasy (109), wieku (65, 66, 109), ilości spożywanego sodu (66), poziomu hormonów (65), lub może być osobniczozmienne (149), wobec czego jednakowe genotypy mogą warunkować nieco różne fenotypy (149).

Niniejsze badanie potwierdza coraz powszechniejszą opinię, że analizowanie polimorfizmu genetycznego bez uwzględnienia czynników środowiskowych zmniejsza prawdopodobieństwo uzyskania powtarzalnych wyników w różnych populacjach.

Wnioski

1. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu Gly460Trp genu podjednostki α białka adducyny oraz genotypów polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu w populacji regionu krakowskiego jest zbliżona do obserwowanych w innych populacjach europejskich.

Nie stwierdzono różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli obydwu badanych polimorfizmów genowych u osób z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do normotoników.

2. W badanej populacji nosiciele allelu -344C polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu wykazywali wyższe wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w nocy oraz mniejszy spadek nocny zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi. Ponadto w pokoleniu potomków u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot TT obserwowano wyższe wartości skurczowego ciśnienia tętniczego w okresie całej doby.
3. W całej badanej populacji, jak i w grupach pokoleniowych nosiciele allelu -344C genu syntazy aldosteronu w porównaniu do homozygot TT charakteryzowali się większymi wartościami obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia fali tętna. Ponadto w pokoleniu rodziców istotnie wyższe wartości aortalnego ciśnienia tętna obserwowano również u nosicieli allelu -344C. Wskazuje to na istotną rolę nosicielstwa allelu -344C genu syntazy aldosteronu w warunkowaniu większej sztywności ściany naczyniowej.
4. W analizie pojedynczego polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny nie obserwowano jego związku z wartościami ciśnienia tętniczego lub parametrami struktury i funkcji naczyń.
5. Spożycie sodu istotnie wpływa na związek polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny oraz C-344T genu syntazy aldosteronu z badanymi fenotypami naczyniowymi, co dokumentuje współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych w warunkowaniu sztywności tętnic.

Streszczenie pracy

Badania nad patogenezą nadciśnienia tętniczego w dużej mierze dotyczą zmian czynnościowych i strukturalnych naczyń w aspekcie ich uwarunkowań genetycznych. Wśród genów, których polimorfizm może mieć związek z wyżej wymienionymi zmianami są geny α adducyny (Gly460Trp) i syntazy aldosteronu (C-344T).

Celem badania było określenie częstości występowania poszczególnych alleli genu α adducyny i syntazy aldosteronu w populacji regionu krakowskiego oraz porównanie częstości występowania alleli polimorficznych badanych genów u osób z ciśnieniem prawidłowym i nadciśnieniem tętniczym. Dalszy cel badania stanowiła ocena związku polimorfizmów genu α adducyny i syntazy aldosteronu z parametrami określającymi przebudowę i sztywność dużych naczyń tętniczych oraz wartościami i profilem dobowym ciśnienia tętniczego krwi.

Badaniem objęto 294 osoby z 83 dwupokoleniowych rodzin (rodzic lub rodzice i co najmniej jedno dziecko), w tym 185 osób z 52 rodzin z Miasta i Gminy Niepołomice oraz 109 osób z 31 rodzin z Krakowa, których członkowie byli pacjentami Poradni Nadciśnieniowej. W badanej populacji nadciśnienie tętnicze występowało u 120 osób a terapię przeciwnadciśnieniową stosowało 70 uczestników badania. U każdego badanego wykonano standardowe pomiary ciśnienia tętniczego (pięciokrotnie podczas wizyty domowej) oraz całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego (aparat SpaceLabs 90207), z częstością pomiarów co 15 minut w ciągu dnia oraz co 30 minut w nocy. Sztywność tętnic oceniano analizując falę tętna. U wszystkich badanych tonometrycznie rejestrowano promieniową falę tętna (tonometr Millar Instruments) oraz ekstrapolowano aortalną falę tętna (oprogramowanie SphygmoCor). Fale te były podstawą do obliczenia następujących parametrów: obwodowego (AIx_{obw}) i aortalnego wskaźnika wzmocnienia (AIx_{ao}). Ponadto oceniano obwodowe (PP_{obw}) i aortalne (PP_{ao}) ciśnienie tętna. Stopień przebudowy ściany naczyniowej oceniano poprzez ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych z pomiarem grubości kompleksu błony wewnętrznej i środkowej ściany bliższej i dalszej tętnic szyjnych wspólnych (aparat Hewlett-Packard, Sonos 2000). Oznaczenia polimorfizmów Gly460Trp genu α adducyny i C-344T syntazy aldosteronu wykonano z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy z

następowym genotypowaniem przy użyciu odpowiednich oligonukleotydów. U wszystkich badanych oznaczano dobowe wydalanie sodu, potasu i aldosteronu w moczu. Przeprowadzono analizę asocjacji zawartej w procedurze PROC GENMOD oprogramowania SAS oraz test nierównowagi transmisji wg. metody Abecasis'a.

Rozkłady częstości genotypów polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny oraz polimorfizmu C-344T syntazy aldosteronu były zgodne z przewidywanymi wg. prawa Hardy – Weinberga (odpowiednio $p = 0.45$ i $p = 0.78$). Osoby z nadciśnieniem tętniczym nie różniły się istotnie od badanych z prawidłowym ciśnieniem pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów (dla α adducyny: GlyGly = 68.3%; GlyTrp = 30.0%; TrpTrp = 1.7% vs GlyGly = 69.0%; GlyTrp = 29.3%; TrpTrp = 1.7%; dla CYP11B2: CC = 21.7%; TC = 57.5%; TT = 20.8% vs CC = 23.5%; TC = 50.6%; TT = 25.9%; $p \geq 0.47$). Nie stwierdzono również różnicy w występowaniu poszczególnych alleli badanych polimorfizmów genetycznych pomiędzy osobami z i bez nadciśnienia tętniczego (dla α adducyny: Gly = 83.3%; Trp = 16.7% vs Gly = 83.6% ; Trp = 16.4%; dla CYP11B2: C = 50.4%; T = 49.6% vs C = 48.8%; T = 51.2%; $p \geq 0.73$).

W pomiarach domowych ciśnienia tętniczego nie obserwowano istotnych różnic w wartości CTK w zależności od genotypu polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny jak również C-344T syntazy aldosteronu.

Poziom dobowego wydalania sodu, potasu oraz aldosteronu z moczem był porównywalny w grupach nosicieli allelu Trp i homozygot GlyGly genu α adducyny i w grupach genotypowych polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu w badanej populacji zarówno w pokoleniu rodziców i ich potomków.

W analizie związku fenotypów ciśnieniowo – naczyniowych z polimorfizmem Gly460Trp genu α adducyny, stwierdzono na podstawie całodobowej rejestracji ciśnienia tętniczego, mniejszy spadek nocny ciśnienia rozkurczowego u homozygot GlyGly w porównaniu do nosicieli allelu Trp (odpowiednio: 19.9 ± 0.5 vs 21.6 ± 0.5 ; $p = 0.021$). Jednakże, różnicy tej nie obserwowano, gdy analizie poddano odrębnie pokolenie rodziców i potomków ($p \geq 0.14$).

Analizując parametry sztywności tętnic i IMT tętnicy szyjnej wspólniej nie stwierdzono istotnych różnic w populacji badanej w zależności od genotypu

polimorfizmu Gly460Trp α adducyny, zarówno w całej grupie jak i w podgrupach pokoleniowych ($p \geq 0.18$).

U osób bez leczenia przeciwnadciśnieniowego ($n = 221$) mediana wydalanego sodu z moczem wynosiła dla kobiet i mężczyzn odpowiednio: 197 mmol/dobę oraz 271 mmol/dobę. Analiza wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego u homozygot GlyGly ujawniła istotnie wyższe ich wartości (dla AIx_{obw} $p = 0.015$; dla AIx_{ao} $p = 0.041$) u osób z ponad przeciętnym poziomem wydalanego sodu, czego nie obserwowano u nosicieli allelu Trp (dla AIx_{obw} $p = 0.19$; dla AIx_{ao} $p = 0.25$). Stwierdzono, ponadto istotną interakcję ($Pint \leq 0.023$) polimorfizmu Gly460Trp α adducyny i poziomu wydalanego sodu w warunkowaniu zarówno obwodowego jak aortalnego wskaźników wzmocnienia.

Wyniki całodobowego monitorowania ciśnienia tętniczego ujawniły wyższe wartości skurczowego ciśnienia z okresu całej doby u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot TT polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu jedynie w pokoleniu młodszym (odpowiednio: 118 ± 0.8 vs 114.4 ± 1.0 mmHg; $p = 0.0008$). W badanej populacji nosicieli allelu -344C genu syntazy aldosteronu cechowały wyższe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego w ciągu nocy ($p < 0.05$) oraz mniejszy spadek nocny zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego ($p < 0.02$). W zgodności z wynikami analizy parametrów ABPM, wskaźniki sztywności naczyń tętniczych w postaci obwodowego i aortalnego wskaźników wzmocnienia ciśnienia skurczowego były wyższe u nosicieli allelu -344C polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu ($p < 0.043$). Zarówno obwodowy jak i aortalny wskaźniki wzmocnienia ciśnienia skurczowego były istotnie wyższe u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot -344TT genu syntazy aldosteronu u osób, których dobowe wydalanie sodu przekraczało odpowiednią dla płci medianę wydalania ($p < 0.043$). Różnic tych nie obserwowano w populacji o niskim wydalaniu sodu ($p > 0.52$). W pokoleniu rodziców stwierdzono istotnie wyższą wartość aortalnego ciśnienia tętna u nosicieli allelu -344C w porównaniu do homozygot -344TT (41.1 ± 0.8 vs 36.6 ± 1.4 mmHg; $p = 0.032$). Takich różnic nie obserwowano w wartościach obwodowego ciśnienia tętna (51.3 ± 1.1 vs 48.7 ± 1.8 mmHg; $p = 0.33$) u rodziców. Oceniając IMT tętnicy szyjnej wspólnej nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od genotypu polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu ($p > 0.15$).

Analiza nierównowagi transmisji badanych polimorfizmów nie ujawniła związku fenotypów ciśnieniowo – naczyniowych z faktem transmisji poszczególnych alleli genu α adducyny i syntazy aldosteronu.

Podsumowując w badanej populacji nie stwierdzono związku pomiędzy pojedynczym polimorfizmem Gly460Trp genu α adducyny a wartościami ciśnienia tętniczego lub parametrami struktury i funkcji naczyń, jednakże obserwowano mniejszy spadek nocny rozkurczowego ciśnienia tętniczego u homozygot GlyGly w porównaniu do nosicieli allelu Trp. Wskaźniki sztywności tętnic pozostają pod wpływem interakcji polimorfizmu Gly460Trp genu α adducyny z ilością wydalanego sodu. Większe spożycie sodu wiąże się z wyższymi wartościami obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia u homozygot GlyGly.

Wyższe wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w nocy oraz mniejszy spadek nocny zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi cechują nosicieli allelu –344C genu syntazy aldosteronu w porównaniu z homozygotami –344TT. Ponadto w młodszej grupie pokoleniowej nosicielstwo allelu –344C wiąże się z większym skurczowym ciśnieniem tętniczym w okresie całej doby.

Wpływ polimorfizmu C–344T genu syntazy aldosteronu na własności ściany naczyniowej jest istotny w całej badanej populacji, jak i w każdej z grup pokoleniowych, wskazując na rolę nosicielstwa allelu –344C genu syntazy aldosteronu w warunkowaniu większej sztywności ściany naczyniowej. Wpływ tego polimorfizmu na fenotyp naczyniowy jest modulowany poziomem spożywanego sodu.

Summary

Studies on the pathogenesis of arterial hypertension to the large extent concern functional and structural vascular changes and their genetic determinants. Of genes whose polymorphism may be related to these changes, α adducin (Gly460Trp) and aldosterone synthase (C-344T) are especially interesting.

The purpose of the study was to define the frequency of alleles of α adducin and aldosterone synthase genes in the population of Krakow region, and to compare the frequency of polymorphic alleles in hypertensives and normotensives. In the study the relationship between polymorphisms of α adducin and aldosterone synthase genes and parameters of remodeling and arterial stiffness, blood pressure values and circadian changes was also evaluated.

The study population consisted of 294 subjects from 83 nuclear families (parent or parents and at least one child), including 185 subjects from 52 families recruited in Niepołomice and 109 subjects from 31 families in Krakow, recruited via patients of the Out-patient Antihypertensive Department. Arterial hypertension was documented in 120 patients, and 70 patients were on antihypertensive treatment. In each subject conventional blood pressure measurements were taken five times during a home visit. Ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) (Space Labs 90207) was performed with recordings every 15 min in the daytime and every 30 min at nighttime. Arterial stiffness was determined from pulse wave. In each subject radial pulse wave was recorded with a tonometer (Millar Instruments) and aortic pulse wave was extrapolated with the SphygmoCor software. The pulse waves were measured to calculate the following parameters: peripheral and aortic augmentation index (AIx_{obw} and AIx_{ao}). Peripheral and aortic pulse pressures (PP_{obw} and PP_{ao}) were also assessed. Vascular wall remodeling was assessed from common carotid intima-media thickness by ultrasound (Hewlett-Packard, Sonos 2000). Gly460Trp polymorphism of α adducin gene and C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene were determined by polymerase chain reaction with genotyping using appropriate oligonucleotides. In each subject daily urinary excretion of sodium, potassium and aldosterone was also measured.

Statistical analysis included association analysis based on the PROC GENMOD procedure in the SAS software and transmission disequilibrium test proposed by Abecasis.

The frequency of Gly460Trp polymorphisms of α adducin gene and C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene were in Hardy Weinberg equilibrium as expected ($p = 0.45$ and $p = 0.78$, respectively). Hypertensives did not differ significantly from normotensives in the frequency of polymorphism genotypes (for α adducin: GlyGly = 68.3%; GlyTrp = 30.0%; TrpTrp = 1.7% vs GlyGly = 69.0%; GlyTrp = 29.3%; TrpTrp = 1.7%; for CYP11B2: CC = 21.7%; TC = 57.5%; TT = 20.8% vs CC = 23.5%; TC = 50.6%; TT = 25.9%; $p \geq 0.47$). There were no differences in the frequency of alleles between hypertensives and normotensives, either (for α adducin: Gly = 83.3%; Trp = 16.7%; vs Gly = 83.6%; Trp = 16.4%; for CYP11B2: C = 50.4%; T = 49.6% vs C = 48.8%; T = 51.2%; $p \geq 0.73$).

There was no significant relationship between home blood pressure and the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene or C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene.

24 – hour urinary excretion of sodium, potassium and aldosterone was similar in carriers of Trp allele and GlyGly homozygotes of α adducin gene and in genotypes of the C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene in the study population, both in parents and in offspring.

Analysis of the relationship between blood pressure and vascular phenotypes and the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene revealed a smaller diastolic blood pressure fall at night in GlyGly homozygotes as compared with carriers of Trp allele (19.9 ± 0.5 vs 21.6 ± 0.5 ; $p = 0.021$, respectively). However, this difference disappeared when parents and offspring were analyzed separately ($p \geq 0.14$). Analysis of vascular stiffness and intima-media thickness did not show any significant relationship with the genotype of the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene both in the whole study population and in generation groups ($p \geq 0.18$). In subjects without antihypertensive treatment ($n = 221$) the median of urinary sodium excretion was 197 mmol/day for women and 217 mmol/day for men. Analysis of systolic augmentation index in GlyGly homozygotes showed significantly higher values in subjects with sodium excretion exceeding average levels (for AIx_{obv} $p = 0.015$; for AIx_{ao} $p = 0.041$), which was not observed in carriers

of Trp allele (for AIx_{obw} $p = 0.19$; for AIx_{ao} $p = 0.25$). There was also a significant interaction ($P_{int} \leq 0.023$) between the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene and excreted sodium in determining both peripheral and aortic augmentation indices. ABPM revealed higher systolic blood pressure levels in the entire 24 hours in carriers of -344C allele as compared with -344TT homozygotes of the C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene only in the younger generation (118 ± 0.8 vs 114.4 ± 1.0 mmHg; $p = 0.0008$). In the whole study population carriers of the -344C allele of aldosterone synthase gene had higher systolic and diastolic blood pressure at night ($p < 0.05$), and smaller nocturnal systolic and diastolic blood pressure fall ($p < 0.02$). In accordance with the results of ABPM, the indices of arterial compliance expressed as peripheral and aortic augmentation indexes were higher in carriers of -344C allele of C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene ($p < 0.043$). Both peripheral and aortic augmentation index were significantly higher in carriers of -344C allele as compared with -344TT homozygotes of aldosterone synthase gene in subjects with daily sodium excretion exceeding the gender-related median ($p > 0.52$). In parents aortic pulse pressure was significantly higher in carriers of -344C allele as compared with -344TT homozygotes (41.1 ± 0.8 vs 36.6 ± 1.4 mmHg; $p = 0.032$). There were no similar differences in peripheral pulse pressure in parents (51.3 ± 1.1 vs 48.7 ± 1.8 mmHg; $p = 0.33$). The intima-media thickness did not differ significantly in relation with the genotype of C-344T polymorphism of aldosterone synthase gene ($p > 0.15$).

Transmission disequilibrium test of the polymorphisms did not show the relationship between blood pressure and vascular phenotypes and transmission of individual alleles of alpha adducin and aldosterone synthase genes.

Summing up, in the present population based study there was no relationship between the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene and blood pressure values or vascular structural and functional parameters, there was however a smaller nocturnal diastolic blood pressure fall in GlyGly homozygotes as compared with carriers of Trp alleles. Arterial stiffness is still affected by the interaction between the Gly460Trp polymorphism of α adducin gene and excreted sodium. Increased sodium consumption is associated with higher peripheral and aortic augmentation index only in GlyGly homozygotes.

Higher systolic and diastolic blood pressure at night and smaller nocturnal systolic and diastolic blood pressure fall were found in carriers of –344C allele of aldosterone synthase gene as compared with –344TT homozygotes. Furthermore in the younger generation the carrier state of –344C allele is associated with higher systolic blood pressure in the entire 24 hours.

The effect of the C–344T polymorphism of aldosterone synthase gene on vascular wall properties is significant in the whole study population and in each generation group, arguing for the role of carrier state of –344C allele of aldosterone synthase gene in determining vascular wall stiffness. The genetic effect of this polymorphism on vascular phenotype is modulated by sodium consumption.

Spis rycin i tabel

Ryciny

Ryc. 1. Schemat genetycznych mechanizmów warunkujących fenotyp w dziedziczeniu wielogenowym	7
Ryc. 2. Model „Windkessel”	10
Ryc. 3. Model dystrybucyjny	11
Ryc. 4. Wpływ powrotu fali odbitej na amplitudę ciśnienia skurczowego w aorcie zależnie od wieku badanego	12
Ryc. 5. Fala tętna	14
Ryc. 6. Mechanizm działania zmutowanej α adducyny u szczurów szczepu mediolańskiego	22
Ryc. 7. Położenie czujnika w trakcie badania metodą tonometrii aplanacyjnej	29
Ryc. 8. SphygmoCor: komputerowy raport analizy tętnicy promieniowej i ekstrapolowanej aortalnej fali tętna	32
Ryc. 9. Schemat projekcji pomiarów IMT w tętnicy szyjnej wspólnej	33
Ryc. 10. Parametry sztywności tętnic przedstawione według wieku i płci	44
Ryc. 11. Zależność lokalnego obwodowego i aortalnego skurczowego ciśnienia od obwodowego i aortalnego wskaźnika wzmocnienia ciśnienia skurczowego	45
Ryc. 12. IMT w tętnicy szyjnej wspólnej wg wieku i płci	46
Ryc. 13. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia wg. genotypów α adducyny i mediany wydalanego sodu w grupie 221 nieleczonych osób	55
Ryc. 14. Parametry ABPM w rodzinach nuklearnych według genotypów genu syntazy aldosteronu	60
Ryc. 15. Redukcja nocna skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, uzyskiwana na podstawie ABPM w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu	61
Ryc. 16. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu	63
Ryc. 17. IMT tętnicy szyjnej wspólnej w zależności od genotypu polimorfizmu C-344T genu syntazy aldosteronu	64
Ryc. 18. Obwodowy i aortalny wskaźnik wzmocnienia wg. genotypów syntazy aldosteronu i mediany wydalanego sodu w grupie 221 nieleczonych osób	66
Ryc. 19. Przykładowe zapisy centralnej i obwodowej fali tętna	80

Tabele

Tab. 1. Startery i allele - swoiste oligonukleotydy używane do detekcji wariantów genu syntazy aldosteronu	34
Tab. 2. Startery i allele - swoiste oligonukleotydy używane do detekcji wariantów genu α adducyny	35
Tab. 3. Struktura i liczebność badanych rodzin	38
Tab. 4. Charakterystyka kliniczna i czynniki stylu życia w badanej populacji	39
Tab. 5. Całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego (ABPM), badania laboratoryjne	41
Tab. 6. Wyniki badań specjalistycznych: fenotypy naczyniowe	43
Tab. 7. Częstość genotypów i alleli w badanej populacji	49
Tab. 8. Parametry ABPM w nuklearnych rodzinach wg. genotypów genu α adducyny	51
Tab. 9. Obwodowe ciśnienie tętna i wskaźnik wzmocnienia, aortalne ciśnienia tętna i wskaźnik wzmocnienia oraz grubość kompleksu błona wewnętrzna – środkowa ściany tętnicy szyjnej wspólnej w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu α adducyny	52
Tabela 10. Dobowe wydalanie sodu i potasu oraz aldosteronu w rodzinach nuklearnych według genotypów genu α adducyny	53
Tab. 11. Analiza QTDT wybranych fenotypów w zależności od genu α adducyny	56
Tab. 12. Parametry ABPM w nuklearnych rodzinach wg. genotypów genu syntazy aldosteronu	58
Tab. 13. Obwodowe ciśnienie tętna i wskaźnik wzmocnienia oraz aortalne ciśnienia tętna i wskaźnik wzmocnienia w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu	62
Tab. 14. Dobowe wydalanie sodu i potasu oraz aldosteronu w rodzinach nuklearnych wg. genotypów genu syntazy aldosteronu	65
Tab. 15. QTDT analiza wybranych fenotypów w stosunku do genu syntazy aldosteronu	67

1. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *Br Med J* 1988;297:319-328.
2. SHEP Cooperative Research Group Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. *JAMA* 1991;265:3255-3264.
3. Sytuacja zdrowotna Polski w 1996 r. Pod redakcją: Wojtyniak B., Chańska M., Goryński P. Państwowy Zakład Higieny. Biuro Monitoringu Narodowego Programu Zdrowia. Warszawa 1998.
4. SphygmoCor. Operators Manual. PWV Medical Pty.Ltd 2000;1-55.
5. The SAS institute. The GENMOD procedure. SAS online doc version 7.1 : SAS/STAT. Cary, North Caroline, USA: the SAS institute inc. 2000;1311-1411.
6. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśn Tęt* 2003;7(supl):1-21.
7. Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO: A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am J Hum Genet* 2000;66:279-292.
8. Allison DB: Transmission disequilibrium tests for quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1997;60:676-690.
9. Altshuler D, Kruglyak L, Lander E: Genetic polymorphisms and disease. *N Engl J Med* 1998;338:162-168.
10. Amar J, Chamontin B, Pelissier M, Garelli I, Salvador M: Influence of glucose metabolism on nycthemeral blood pressure variability in hypertensives with an elevated waist-hip ratio. A link with arterial distensibility. *Am J Hypertens* 1995;8:426-428.
11. Asmar R: Arterial stiffness and pulse wave velocity. Clinical applications. (red) Elsevier 1999;77-82.
12. Avolio A: Genetic and environmental factors in the function and structure of the arterial wall. *Hypertension* 1995;26:34-37.
13. Avolio AP, Clyde KM, Beard TC, Cooke HM, Ho KK, O'Rourke MF: Improved arterial distensibility in normotensive subjects on a low salt diet. *Arteriosclerosis* 1986;6:166-169.
14. Balkestein EJ, Staessen JA, Wang JG, Der Heijden-Spek JJ, Van Bortel LM, Barlassina C, Bianchi G, Brand E, Hermann SM, Struijker-Boudier HA: Carotid and femoral artery stiffness in relation to three candidate genes in a white population. *Hypertension* 2001;38:1190-1197.

15. Balkestein EJ, Wang JG, Struijker-Boudier HA, Barlassina C, Bianchi G, Birkenhager WH, Brand E, Den Hond E, Fagard RH, Herrmann SM, Van Bortel LM, Staessen JA: Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population. *J Hypertens* 2002;20:1551-1561.
16. Barlassina C, Norton GR, Samani NJ, Woodwiss AJ, Candy GC, Radevski I, Citterio L, Bianchi G, Cusi D: Alpha-adducin polymorphism in hypertensives of South African ancestry. *Am J Hypertens* 2000;13:719-723.
17. Barlassina C, Schork NJ, Manunta P, Citterio L, Sciarrone M, Lanella G, Bianchi G, Cusi D: Synergistic effect of alpha-adducin and ACE genes causes blood pressure changes with body sodium and volume expansion. *Kidney Int* 2000;57:1083-1090.
18. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE: Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 2002;28:125-135.
19. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L: Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* 1998;32:560-564.
20. Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetieere P, Guize L: Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension* 1997;30:1410-1415.
21. Bianchi G, Cusi D: Association and linkage analysis of alpha-adducin polymorphism: is the glass half full or half empty? *Am J Hypertens* 2000;13:739-743.
22. Bianchi G, Tripodi G: Genetics of hypertension: the adducin paradigm. *Ann N Y Acad Sci* 2003;986:660-668.
23. Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P, Torielli L, Cusi D, Ferrandi M, Pinna LA, Baralle FE, Ferrari P: Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3999-4003.
24. Blacher J, Amah G, Girerd X, Kheder A, Ben Mais H, London GM, Safar ME: Association between increased plasma levels of aldosterone and decreased systemic arterial compliance in subjects with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:1326-1334.
25. Blacher J, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME, London GM: Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* 1999;99:2434-2439.
26. Blacher J, Staessen J, Girerd X, Gasowski J, Thijs L, Liu L, Wang JG, Fagard RH, Safar ME: Pulse pressure not mean pressure determines cardiovascular risk in older hypertensive patients. *Arch Inter Med* 2000;160:1085-1089.

27. Boerwinkle NS: All for one and one for all: introduction to a coordinated analysis of the Gly 460Trp alpha adducin polymorphism. *Am J Hypertens* 2000;13:734-735.
28. Bortolotto LA, Safar ME, Billaud E, Lacroix C, Asmar R, London GM, Blacher J: Plasma homocysteine, aortic stiffness, and renal function in hypertensive patients. *Hypertension* 1999;34:837-842.
29. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S: Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* 2002;39:10-15.
30. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, Fery I, Curnow K, Jeunemaitre X, Corvol P, Pascoe L, Soubrier F: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998;32:198-204.
31. Brand E, Schorr U, Ringel J, Beige J, Distler A, Sharma AM: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism in Caucasians from the Berlin salt-sensitivity trial (BeSST). *J Hypertens* 1999;17:1563-1567.
32. Cameron JD, McGrath BP, Dart AM: Use of radial artery applanation tonometry and a generalized transfer function to determine aortic pressure augmentation in subjects with treated hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1214-1220.
33. Cardon LR, Palmer LJ: Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604.
34. Carretero OA, Oparil S: Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation* 2000;101:329-335.
35. Chen CH, Nevo E, Fetis B, Pak PH, Yin FC, Maughan WL, Kass DA: Estimation of central aortic pressure waveform by mathematical transformation of radial tonometry pressure. Validation of generalized transfer function. *Circulation* 1997;95:1827-1836.
36. Chen CH, Ting CT, Nussbacher A, Nevo E, Kass DA, Pak PH, Wang SP, Chang MS, Yin FC: Validation of carotid artery tonometry as a means of estimating augmentation index of ascending aortic pressure. *Hypertension* 1996;27:168-175.
37. Chlebus H: Value of examination of carotid pulse by means of resonance electrospychmographs in relation to intra-arterial pressure tracing. *Am Heart J* 1962;64:22-28.
38. Ciechanowicz A: Genetyka molekularna nadciśnienia tętniczego. *Terapia* 2000;9:18-24.
39. Ciechanowicz A: Genetyka molekularna w diagnostyce nadciśnienia tętniczego. *Terapia* 2001;8:20-25.

40. Ciechanowicz A, Adler G, Wrona A, Ciechanowicz S, Czekalski S: T-344C polymorphism of aldosterone synthase (CYP11B2) gene and salt-sensitivity of blood pressure in Polish hypertensives. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:A77.
41. Ciechanowicz A, Widecka K, Drozd R, Adler G, Cyryłowski L, Czekalski S: Lack of association between Gly460Trp polymorphism of alpha-adducin gene and salt sensitivity of blood pressure in Polish hypertensives. *Kidney Blood Press Res* 2001;24:201-206.
42. Clark CJ, Davies E, Anderson NH, Farmer R, Friel EC, Fraser R, Connell JM: alpha-adducin and angiotensin I-converting enzyme polymorphisms in essential hypertension. *Hypertension* 2000;36:990-994.
43. Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM, White PC, Rainey WE: Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common *cis* elements. *Mol Endocrinol* 1997;11:638-649.
44. Cockcroft JR, Wilkinson IB: Large artery stiffness: an important therapeutic target. *J Hum Hypertens* 2000;14:533-535.
45. Covic A, Goldsmith DJ, Panaghiu L, Covic M, Sedor J: Analysis of the effect of hemodialysis on peripheral and central arterial pressure waveforms. *Kidney Int.* 2000;57:2634-2643.
46. Culleton BF, Larson M, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D: Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999;56:2214-2219.
47. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G: Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997;349:1353-1357.
48. Cwynar M, Staessen JA, Tichá M, Nawrot T, Tizzoni L, Kuznetsova T, Wojciechowska W, Stolarz K, Filipovsky J, Kawecka-Jaszcz K, Grodzicki T, Struijker-Boudier HA, Thijs L, Van Bortel LM, Bianchi G: Epistatic interaction between alpha- and gamma- adducin influences peripheral and central pulse pressures in white europeans. Abstract, XIV Meeting of European Society of Hypertension, Paris 2004.
49. Cwynar M, Wojciechowska W, Kawecka-Jaszcz K, Grodzicki T: Mechanizmy przebudowy dużych naczyń tętniczych. *Przegl Lek* 2002;53 (Supl 3):1-8.
50. Czekalski S: Podłoże molekularne nadciśnienia pierwotnego - koncepcja fenotypów pośrednich. Ciechanowicz A, Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyło W (red). *Genetyka chorób układu krążenia. Medycyna Praktyczna*. Kraków 2002;185-190.
51. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Connell JM: Aldosterone excretion rate and blood

pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension* 1999;33:703-707.

52. Dembińska-Kieć A: Mechanizmy przebudowy ścian naczyń i serca w chorobach układu krążenia. Nadciśnienie tętnicze. *Medycyna Praktyczna* 2000;35-44.
53. Dieulafoy M: Rôle de l'hérédité dans la production de l'hémorragie cérébrale. *Gazette Hebdo Med Chir* 1876;38:595-597.
54. Donzelot E, Meyer-Heine A, Chartrain E: La piezographie arterielle, son interet dans l'hypertension et les atteintes arterielles . *Presse Med* 1954;62:379-391.
55. Draaijer P, Kool MJ, Maessen JM: Vascular distensibility and compliance in salt-sensitive and salt-resistant borderline hypertension. *J Hypertens* 1993;11:1199-1207.
56. Drzewiecki G, Melbin J, Noordegraaf AV: Arterial tonometry: review and analysis. *J Biomech* 1983;16:141-152.
57. Duprez D, De Buyzere M, Rietzschel ER, Clement DL: Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:327-334.
58. Et-taouil K, Schiavi P, Lévy BI, Plante GE: Sodium intake, large artery stiffness, and proteoglycans in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2001;38:1172-1176.
59. Ferrandi M, Salardi S, Tripodi G, Barassi P, Rivera R, Manunta P, Goldshleger R, Ferrari P, Bianchi G, Karlsh SJD: Evidence for an interaction between adducin and Na⁺-K⁺ATPase:relation to genetic hypertension. *Am J Physiol* 1999;277:1338-1349.
60. Fetis B, Nevo E, Chen CH, Kass DA: Parametric model derivation of transfer function for noninvasive estimation of aortic pressure by radial tonometry. *IEEE Trans Biomed Eng* 1999;46:698-706.
61. Franklin SS, Gustin W, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D: Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1997;96:308-315.
62. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D: Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham Heart Study. *Circulation* 1999;100:354-360.
63. Gatzka CD, Cameron JD, Kingwell BA, Dart AM: Relation between coronary artery disease, aortic stiffness, and left ventricular structure in a population sample. *Hypertension* 1998;32:575-578.
64. Gąsowski J: Czynniki warunkujące strukturę i funkcję mechaniczną dużych naczyń tętniczych. Praca doktorska. *Wydz.Lek.UJ* 2001.

65. Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB, Lifton RP: Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 2000;289:119-123.
66. Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Schifter S, Bayer M, Chang SS, Lifton RP: Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat Genet* 1998;19:279-281.
67. Giannattasio C, Mangoni AA, Failla M, Stella ML, Carugo S, Bombelli M, Sega R, Mancina G: Combined effects of hypertension and hypercholesterolemia on radial artery function. *Hypertension* 1997;29:583-586.
68. Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-1438.
69. Gilligan DM, Lozovatsky L, Gwynn B, Brugnara C, Mohondas N, Peters LL: Targeted disruption of the beta adducin gene (Add2) causes red blood cell spherocytosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10717-10722.
70. Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, Troffa C, Stella P, Barlassina C, Lombardi C, Soro A, Dettori F, Parpaglia P, Alibrandi MT, Cusi D, Bianchi G: The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study. *Hypertension* 1999;34:649-654.
71. Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NH, Williams GH: Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002;39:191-196.
72. Grodzicki T, Jachymczyk T, Gryglewska B: Przebudowa dużych naczyń tętniczych jako czynnik ryzyka i cel terapeutyczny. *Terapia* 2001;8:14-19.
73. Gryglewska B, Gąsowski J, Grodzicki T: Ciśnienie tętna – nowy czynnik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych. *Terapia* 2000;9:57-63.
74. Hales S: *Statical Essays: Containing Haemostatics*. Vol 2. Innys and Manby. London. 1733; Reprinted. History of Medicine Series, Library of New York Academy of Medicine, New York. Hafner Publishing 1964;22.
75. Harrap SB: Hypertension: Genes versus environment. *Lancet* 1994;344:169-171.
76. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H: Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994;269:24316-24320.
77. Hautanena A, Lankinen L, Kupari M, Janne OA, Adlercreutz H, Nikkila H, White PC: Associations between aldosterone synthase gene polymorphism and the adrenocortical function in males. *J Intern Med* 1998;244:11-18.

78. Hayward C, Kelly RP: Gender-related differences in the central arterial pressure wave form. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1863-1871.
79. Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogihara T: Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men: the Suita Study. *Circulation* 2000;101:2060-2065.
80. Hoeks APG, Brands PJ, Smeets FAM, Reneman RS: Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:121-128.
81. Ishikawa K, Katsuya T, Sato N, Nakata Y, Takami S, Takiuchi S, Fu Y, Higaki J, Ogihara T: No association between alpha-adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population. *Am J Hypertens* 1998;11:502-506.
82. Jones DW: Dietary sodium and blood pressure. *Hypertension* 2004;43:932-935.
83. Kamitani A, Wong ZY, Fraser R, Davies DL, Connor JM, Foy CJ, Watt GC, Harrap SB: Human alpha-adducin gene, blood pressure, and sodium metabolism. *Hypertension* 1998;32:138-143.
84. Kannel WB, Gordon T, Schwartz MJ: Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Cardiol* 1971;27:335-346.
85. Kannel WB, Wolf PA, McGee DL, Dawber TR, McNamara P, Castelli WP: Systolic blood pressure arterial rigidity and risk of stroke. The Framingham Study. *JAMA* 1981;245:1225-1229.
86. Karamanoglu M, O'Rourke MF, Avolio AP, Kelly RP: An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. *Eur Heart J* 1993;14:160-167.
87. Kawecka-Jaszcz K: European Project on Genes in Hypertension (EPOGH) - informacja o programie. *Nadciśn Tętn* 2000;4:221-223.
88. Kawecka-Jaszcz K: Badanie EPOGH - European Project on Genes in Hypertension. *Nadciśn Tętn* 2002;Supl A:43-45.
89. Kawecka-Jaszcz K, Czarnecka D, Olszanecka A, Rajzer M, Jankowski P: The effect of hormone replacement therapy on arterial blood pressure and vascular compliance in postmenopausal women with arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 2002;16:509-516.
90. Kawecka-Jaszcz K, Staessen J, Olszanecka A: Aspekty genetyczne nadciśnienia tętniczego w badaniach populacyjnych. Ciechanowicz A, Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W (red). *Genetyka chorób układu krążenia. Medycyna Praktyczna, Kraków* 2002;199-205.

91. Kelly RP, Hayward C, Avolio AP, O'Rourke MF: Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. *Circulation* 1989;80:1652-1659.
92. Kelly RP, Hayward C, Ganis J, Daley J, Avolio A, O'Rourke MF: Noninvasive registration of the arterial pressure pulse waveform using high-fidelity applanation tonometry. *J Vasc Med Biol* 1989;1:142-149.
93. Kelly RP, Ting CT, Yang TM, Liu CP, Maughan WL, Chang MS, Kass DA: Effective arterial elastance as index of arterial vascular load in humans. *Circulation* 1992;86:513-521.
94. Klocke R, Cockcroft JR, Taylor GJ, Hall IR, Blake DR: Arterial stiffness and central blood pressure, as determined by pulse wave analysis, in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:414-418.
95. Komiya I, Yamada T, Takara M, Asawa T, Shimabukuro M, Nishimori T, Takasu N: Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. *Hypertension* 2000;35:699-703.
96. Konturek S: Krzywa obwodowego ciśnienia tętniczego. Tętno tętnicze. *Fizjologia człowieka. Układ krążenia* 2000;190-193.
97. Kumar NN, Benjafield AV, Lin RC, Wang WY, Stowasser M, Morris BJ: Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1331-1337.
98. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, White PC: Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* 1998;97:569-575.
99. Kuznetsova T, Staessen JA, Kawecka-Jaszcz K, Babeanu S, Casiglia E, Filipovsky J, Nachev C, Nikitin Y, Peleska J, O'Brien E: Quality control of the blood pressure phenotype in the European project on genes in hypertension. *Blood Press. Monit.* 2002;7:215-224.
100. Kuznetsova T, Staessen JA, Stolarz K, Ryabikov A, Tikhonoff V, Olszanecka A, Bianchi G, Brand E, Casiglia E, Dominiczak A, Fagard RH, Malyutina S, Nikitin Y, Kawecka-Jaszcz K: European Project On Genes in Hypertension (EPOGH) Investigators. Relationship between left ventricular mass and the ACE D/I polymorphism varies according to sodium intake. *J Hypertens* 2004;22:287-295.
101. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M: Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats : effects of eplerenone. *Circulation* 2002;106:2848-2853.
102. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A: Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:662-667.

103. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A: Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001;37:1236-1241.
104. Lijnen P, Petrov V: Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:865-879.
105. Lin B, Nasir J, McDonald H, Graham R, Rommens JM, Goldberg YP, Hayden MR: Genomic organization of the human alpha-adducin gene and its alternately spliced isoforms. *Genomics* 1995;25:93-99.
106. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP: Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992;71:503-510.
107. London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME: Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension* 2001;38:434-438.
108. Luft FC: Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1871-1878.
109. Luft FC, Miller JZ, Grim CE, Fineberg NS, Christian JC, Daugherty SA, Weinberger MH: Salt sensitivity and resistance of blood pressure. Age and race as factors in physiological responses. *Hypertension* 1991;17 (Suppl 1):I102-I108.
110. Luft FC, Fineberg NS, Sloan RS: Estimating dietary sodium intake in individuals receiving a randomly fluctuating intake. *Hypertension* 1982;4:805-808.
111. MacGregor GA: Sodium is more important than calcium in essential hypertension. *Hypertension* 1985;7:628-637.
112. Mancia G, Parati G: Ambulatory blood pressure monitoring and organ damage. *Hypertension* 2000;36:394-399.
113. Manunta P, Burnier M, D'Amico M, Buzzzi L, Maillard M, Barlassina C, Lanella G, Cusi D, Bianchi G: Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. *Hypertension* 1999;33:694-697.
114. Manunta P, Cusi D, Barlassina C, Righetti M, Lanzani C, D'Amico M, Buzzzi L, Citterio L, Stella P, Rivera R, Bianchi G: Alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in essential hypertensive patients. *Kidney Int* 1998;53:1471-1478.
115. Matsubara M, Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H, Omori F, Fujiwara T, Suzuki M, Michimata M, Hozawa A, Katsuya T, Higaki J, Tsuji I, Araki T, Ogiwara T, Satoh H, Hisamichi S, Nagai K, Kitaoka H, Imai Y: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and

nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population : the Ohasama study. *J Hypertens* 2001;19:2179-2184.

116. Matsuoka Y, Benneitt V: Adducin: structure, function, and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:884-895.
117. McArdle WD, Katch EI, Katch VL: Exercise physiology. Energy, nutrition, and human performance. Philadelphia: Lea and Febiger. Philadelphia: Lea and Febiger 1991.
118. Melander O: Genetic factors in hypertension - What is known and what does it mean? *Blood Pressure* 2001;10:254-270.
119. Millasseau SC, Patel SJ, Redwood SR, Ritter JM, Chowienczyk PJ: Pressure wave reflection assessed from the peripheral pulse: is a transfer function necessary ? *Hypertension* 2003;41:1016-1020.
120. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson M, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D: Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;43:1239-1245.
121. Mulatero P, Williams TA, Milan A, Paglieri C, Rabbia F, Fallo F, Veglio F: Blood pressure in patients with primary aldosteronism is influenced by bradykinin B(2) receptor and alpha-adducin gene polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3337-3343.
122. Nichols WW, O'Rourke MF: Sphygmocardiography. W: Nichols WW, O'Rourke MF, eds. McDonalds's Blood flow in arteries. London, Arnold 1998;450-477.
123. Nurnberger J, Keflioglu-Scheiber A, Opazo Saez AM, Wenzel RR, Philipp T, Schaefers RF: Augmentation index is associated with cardiovascular risk. *J Hypertens* 2002;20:2407-2414.
124. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson M, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;97:1766-1772.
125. O'Rourke MF: Mechanical principles in arterial disease. Second workshop on structure and function of large arteries. *Hypertension* 1995;26:1-9.
126. O'Rourke MF, Gallagher DE: Pulse wave analysis. *J.Hypertens.Suppl.* 1996;14:S147-S157.
127. O'Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ: Pulse wave analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:507-522.

128. O'Rourke MF, Staessen J, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE: Clinical applications of arterial stiffness; Definitions and reference value. *Am J Hypertens* 2002;15:426-444.
129. Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F: Genotype-Phenotype Relationships for the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in a Normal Population. *Hypertension* 1999;34:423-429.
130. Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND: Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension* 2001;38:932-937.
131. Petrie JC, O'Brien ET, Littler WA, de Swiet M: Recommendations on blood pressure measurement by a Working Party of the British Society of Hypertension. *Br Med J* 1989;293:611-615.
132. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R: Intimal plus medial thickness of the arterial wall: A direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;77:1399-1406.
133. Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de La Sierra A: Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 2001;38:1204-1209.
134. Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, Benetos A: Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998;11:856-860.
135. Pressman GL, Newgard PM: A transducer for the continuous measurement of arterial blood pressure. *IEEE Trans Biomed Eng* 1963;10:73-81.
136. Province MA, Arnett DK, Hunt SC, Leidencker-Foster C, Eckfeldt JH, Oberman A, Ellison RC, Heiss G, Mockrin SC, Williams RR: Association between the alpha-adducin gene and hypertension in the HyperGEN Study. *Am J Hypertens* 2000;13:710-718.
137. Psaty BM, Smith NL, Heckbert SR, Vos HL, Lemaitre RN, Reiner AP, Siscovick DS, Bis J, Lumley T, Longstreth Jr WT, Rosendaal FR: Diuretic therapy, the alpha-adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension. *JAMA* 2002;287:1680-1689.
138. Rajzer M, Kawecka-Jaszcz K: Podatność tętnic w nadciśnieniu tętniczym. Od patofizjologii do znaczenia klinicznego. *Nadciśn Tętn* 2002;6:61-73.
139. Rajzer M, Kłoczek M, Kawecka-Jaszcz K, Czarnecka D, Baran-Wojciechowska W, Dudek T, Petriczek T: Aortic pulse wave velocity in young normotensives with a family history of hypertension. *J Hypertens* 1999;17:1821-1824.
140. Ranade K, Hsuing AC, Wu KD, Chang MS, Chen YT, Hebert J, Chen JJ, Olshen R, Curb D, Dzau V, Botstein D, Cox D, Risch N: Lack of evidence

for an association between alpha-adducin and blood pressure regulation in Asian populations. *Am J Hypertens* 2000;13:704-709.

141. Rosenbloom J: Familial hypertension with report of a case. *J Lab Clin Med* 1923;8:681-693.
142. Saba PS, Roman MJ, Pini R, Spitzer M, Ganau A, Devereux RB: Relation of arterial pressure waveform to left ventricular and carotid anatomy in normotensive subjects. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1873-1880.
143. Safar ME, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Guyonvarc'h PM, London GM: Central pulse pressure and mortality in end - stage renal disease. *Hypertension* 2002;39:735-744.
144. Safar ME, Levy BJ, Laurent S, London GM: Hypertension and the arterial system: clinical and therapeutic aspects. *J Hypertens* 1990;8 (Suppl 7):113-119.
145. Safar ME, Thuilliez C, Richard V, Benetos A: Pressure-independent contribution of sodium to large artery structure and function in hypertension. *Cardiovasc Res* 2000;46:269-276.
146. Sato T, Nishinaga M, Kawamoto A, Ozawa T, Takatsuji H: Accuracy of a continuous blood pressure monitor based on arterial tonometry. *Hypertension* 1993;21:866-874.
147. Schork NJ, Chakravarti A: A nonmathematical overview of modern gene mapping techniques applied to human disease. Mockrin SC (red) *Molecular genetics and gene therapy of cardiovascular disease*. Marcel Dekker, Inc., New York 1996;79-109.
148. Sciarra M, Stella P, Barlassina C, Manunta P, Lanzani C, Bianchi G, Cusi D: ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. *Hypertension* 2003;41:398-403.
149. Scriver CR, Waters PJ: Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-272.
150. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C: Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998;273:4883-4891.
151. Sirianni R, Seely JB, Attia G, Stocco DM, Carr BR, Pezzi V, Rainey WE: Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol* 2002;174:R13-R17.
152. Smith JC, Page MD, John R, Wheeler MH, Cockcroft JR, Scanlon MF, Davies JS: Augmentation of central arterial pressure in mild primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3515-3519.

153. Snieder H, Hayward CS, Perks U, Kelly RP, Kelly PJ, Spector TD: Heritability of central systolic pressure augmentation a twin study. *Hypertension* 2000;35:574-579.
154. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;52:506-516.
155. Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, Joossens JV, Lijnen P, Amery A: Salt intake and blood pressure in the general population: a controlled intervention trial in two towns. *J Hypertens.* 1988;6:965-973.
156. Staessen JA, Bulpitt CJ, O'Brien E, Cox J, Fagard RH, Stanton A, Thijs L, Van Hulle S, Vyncke G, Amery A: Diurnal blood pressure profile. A population study. *Am J Hypertens* 1992;5:386-392.
157. Staessen JA, Fagard RH, Amery A: Life style as a determinant of blood pressure in the general population. *Am J Hypertens* 1994;7:685-694.
158. Staessen JA, Wang JG, Brand E, Barlassina C, Birkenhager WH, Herrmann SM, Fagard RH, Tizzoni L, Bianchi G: Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens* 2001;19:1349-1358.
159. Stanton A, Mayet J, Chapman N, Foale RA, Hughes AD, Thom SA: Ethnic differences in carotid and left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 2002;20:539-543.
160. Stolarz K, Staessen JA, Kawecka-Jaszcz K, Brand E, Bianchi G, Kuznetsova T, Tikhonoff V, Thijs L, Reineke T, Babeanu S, Casiglia E, Fagard R, Filipovsky J, Peleska J, Nikitin Y, Struijker-Boudier HA, Grodzicki T: Genetic Variation in CYP11B2 and AT1R Influences Heart Rate Variability Conditional On Sodium Excretion. *Hypertension* 2004;44:156-162.
161. Struthers D: Aldosterone: Cardiovascular assault. *Am Heart J* 2002;144:S2-S7.
162. Sugimoto K, Hozawa A, Katsuya T, Matsubara M, Ohkubo T, Tsuji I, Motone M, Higaki J, Hisamachi S, Imai Y, Ogihara T: Alpha-Adducin Gly460Trp polymorphism is associated with low renin hypertension in younger subjects in the Ohasama study. *J Hypertens* 2002;20:1779-1784.
163. Sullivan JM: Salt sensitivity-definition, conception, methodology. *Hypertension* 1991;17(suppl I):61-68.
164. Sun Y, Ramires FJ, Weber KT: Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 1997;35:138-147.
165. Takeda Y: Pathophysiological roles of vascular 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aldosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:443-447.

166. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H: Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 2000;141:1901-1904.
167. Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M: Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* 1999;33:266-270.
168. Timberlake DS, O'Connor DT, Parmer RJ: Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:71-77.
169. Trégouët DA, Ducimetière P, Tired L: Testing associations between candidate-gene markers and phenotype in related individuals by use of estimating equations. *Am J Hum Genet* 1997;61:189-199.
170. Tripodi G, Valtorta F, Torielli L, Chierregatti E, Salardi S, Trusolino L, Menegon A, Ferrari P, Marchisio PC, Bianchi G: Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest* 1996;97:2815-2822.
171. Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Tamaki S, Kinoshita M, Mannami T, Ogata J, Baba S: Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita study. *Hypertens Res* 2001;24:105-109.
172. Tsukada K, Ishimitsu T, Teranishi M, Saitoh M, Yoshii M, Inada H, Ohta S, Akashi M, Minami J, Ono M, Ohru M, Matsuoka H: Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2002;16:789-793.
173. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA, Safar ME: Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* 2001;38:914-921.
174. Van der Heijden-Spek J: Large artery properties and cardiovascular risk: a population study. *Unigraphic, Maastricht* 2000;3-47.
175. Van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks AP, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC: Association between arterial stiffness and atherosclerosis- The Rotterdam Study. *Stroke* 2001;32:454-456.
176. Verdecchia P, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Schillaci G, Sacchi G, Santucci A, Santucci C, Reboldi G, Porcellati C: Prognostic significance of blood pressure variability in essential hypertension. *Blood Press Monit* 1996;1:3-11.
177. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Pede S, Porcellati C: Ambulatory pulse pressure: a potent predictor of total cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension* 1998;32:983-988.

178. Waldman ID, Robinson BF, Rowe DC: A logistic regression based extension of the TDT for continuous and categorical traits. *Ann Hum Genet* 1999;63:329-340.
179. Wang JG, Staessen JA: Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 2000;410:289-302.
180. Wang JG, Staessen JA, Messaggio E, Nawrot T, Fagard R, Bianchi G, Manunta P: Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population. *J Hypertens* 2003;21:1475-1481.
181. Wang JG, Staessen JA, Tizzoni L, Brand E, Birkenhager WH, Fagard RH, Herrmann SM, Bianchi G: Renal function in relation to three candidate genes. *Am J Kidney Dis* 2001;38:1158-1168.
182. Weber KT: Aldosteronism revisited: perspectives on less well-recognized actions of aldosterone. *J Lab Clin Med* 2003;142:71-82.
183. Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R, Eber B: Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. *Circulation* 2004;109:184-189.
184. White PC, Slutsker L: Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 1995;21:437-442.
185. Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR, Webb DJ: Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens* 1998;16:2079-2084.
186. Wilkinson IB, Mohammad NH, Tyrrell S, Hall IR, Webb DJ, Paul VE, Levy T, Cockcroft JR: Heart rate dependency of pulse pressure amplification and arterial stiffness. *Am.J.Hypertens.* 2002;15:24-30.
187. Wilkinson IB, Prasad K, Hall IR, Thomas A, MacCallum H, Webb DJ, Frenneaux MP, Cockcroft JR: Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1005-1011.
188. Williams GH, Dluhy RG, Lifton RP, Moore TJ, Gleason R, Williams R, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NK: Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. *Hypertension* 1992;20:788-796.
189. Wojciechowska W, Cwynar M, Gryglewska B, Kawecka-Jaszcz K: Analiza fali tętna. Od podstaw do zastosowań. *Przegl Lek* 2002;59 (suppl 3):9-14.
190. Wojciechowska W, Staessen JA, Stolarz K, Nawrot T, Filipovský J, Tichá M, Bianchi G, Brand E, Cwynar M, Grodzicki T, Kuznetsova T, Struijker-Boudier HA, Svobodová V, Thijs L, Van Bortel LM, Kawecka-Jaszcz K: Association of peripheral and central arterial wave reflections with the CYP11B2 -344C allele and sodium excretion. *J Hypertens* 2004;w druku.

191. Yasmin, Brown MJ: Similarities and differences between augmentation index and pulse wave velocity in the assessment of arterial stiffness. *Q J Med* 1999;92:595-600.
192. Zieliński T: Przydatność badania ultrasonograficznego tętnic szyjnych w diagnostyce i ocenie terapii nadciśnienia tętniczego. *Terapia* 2002;7-8:8-12.

