

**Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**  
**Wydział Lekarski**

**Agnieszka Olszanecka**

**Polimorfizm podjednostki  $\beta$ 3 białka G (C825T)**  
**u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym**  
**- badania rodzin**

*Rozprawa doktorska*

*Promotor: Prof. dr hab. med. Kalina Kawecka-Jaszcz*

Bibl. Medyczna CM UJ



1816034114

*I Klinika Kardiologii*  
*Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego*

**Kraków 2003**

*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

Wstęp.....	5
Materiał i metodyka.....	15
Wyniki.....	29
Charakterystyka badanej populacji.....	29
Częstość występowania genotypów polimorfizmu C825T GNB3.....	36
Polimorfizm C825T genu podjednostki beta 3 białka G a parametry struktury i funkcji serca i naczyń – analiza asocjacji.....	39
Standardowe pomiary ciśnienia tętniczego krwi.....	41
24-godzinne automatyczne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi.....	43
Parametry struktury i funkcji lewej komory serca.....	48
Parametry struktury i funkcji naczyń tętniczych.....	53
Test nierównowagi transmisji.....	54
Dyskusja i omówienie wyników.....	55
Wnioski.....	68
Streszczenie pracy.....	69
Spis tabel i rysunków umieszczonych w pracy.....	72
Piśmiennictwo.....	74

## Słowniczek najczęściej używanych skrótów

- ABPM** – *ambulatory blood pressure monitoring* – 24-godzinne ambulatoryjne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi białka G
- BMI** – *body mass index* – wskaźnik masy ciała
- BSA** – *body surface area* – pole powierzchni ciała
- cAMP** – cykliczny monofosforan adenozyliny
- C825T** – tranzycja cytozyny na tyminę w pozycji 825 genu podjednostki  $\beta 3$
- CTK** – ciśnienie tętnicze krwi
- FS** – *fractional shortening* – frakcja skracania włókien wsierdza lewej komory
- G $\beta 3$**  – produkt białkowy genu podjednostki  $\beta 3$  białka G
- G $\beta 3$ -s** - produkt białkowy zmutowanego genu podjednostki  $\beta 3$  białka G, produkt alternatywnego składania (*splice variant*) białko delecyjne, zmniejszone i inaczej przestrzennie złożone w porównaniu do typu dzikiego
- GDP** – dwufosforan guaniny
- GNB3** - gen podjednostki  $\beta 3$  białka G
- GTP** – trójfosforan guaniny
- IMT** – *intima-media thickness* – grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej
- IVRT** – *isovolumetric relaxation time* – czas rozkurczu izowolumetrycznego
- IVS<sub>d</sub>** – *interventricular septum thickness in diastole*– grubość przegrody w rozkurczu
- LVH** – *left ventricular hypertrophy* – przerost lewej komory serca
- LVID<sub>d</sub>**– wymiar końcowo-rozkurczowy lewej komory serca
- LVID<sub>s</sub>** – wymiar końcowo-skurczowy lewej komory serca
- LVM** – *left ventricular mass* – masa lewej komory serca
- LVMI** – *left ventricular mass index* – wskaźnik masy lewej komory serca
- LVPW<sub>d</sub>** – *posterior wall thickness in diastole* – grubość tylnej ściany lewej komory międzykomorowej w rozkurczu
- mRNA** – informacyjny kwas rybonukleinowy
- NHE** - (*sodium-hydrogen exchanger*) – wymiennik sodowo-protonowy
- PCR** – *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy
- Pokolenie I** – pokolenie zakwalifikowanych do programu rodziców
- Pokolenie II** – pokolenie dorosłych dzieci (potomków)
- PWV** – *pulse wave velocity* – prędkość fali tętna

**RFLP** - *restriction fragment length polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

**RWT** – *relative wall thickness* – względna grubość ściany lewej komory serca

**SD** – *standard deviation* – odchylenie standardowe

**SE** – *standard error* – błąd standardowy

**SERCA2** – ATP-aza wapniowa retikulum sarkoplazmatycznego

**SNP** – *single nucleotide polymorphism* – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

**SR** – retikulum sarkoplazmatyczne

**TDT** – *transmission disequilibrium test* – test nierównowagi transmisji

**TDT<sub>Q</sub>** – *transmission disequilibrium test for quantitative traits* - test nierównowagi transmisji dla zmiennych ilościowych

**WHR** – *waist-to-hip ratio* – wskaźnik talia-biodra

## Wstęp

Nadciśnienie tętnicze stanowi jeden z najważniejszych problemów współczesnej medycyny, co wynika z jego rozpowszechnienia i następstw, jakie powoduje w układzie sercowo-naczyniowym. Nadciśnienie jest jednym z głównych czynników sprzyjających rozwojowi miażdżycy, która leży u podłoża choroby wieńcowej, zawału serca, udaru mózgu czy chorób naczyń obwodowych.

W badaniach patogenezy nadciśnienia tętniczego bardzo wcześnie zwrócono uwagę na rolę czynników dziedzicznych. Pierwsze obserwacje sięgają wieku XVIII, kiedy to Morgagni zainteresował się częstszym występowaniem „apopleksji” u potomków osób, które zmarły z powodu wylewu krwi do mózgu [57]. Wprowadzenie przez Scipione Riva-Rocci sfigmomanometru do pomiaru ciśnienia w 1896 roku pozwoliło na wiarygodne, nieinwazyjne pomiary ciśnienia tętniczego krwi, które rozpowszechniając się na początku XX wieku dały początek współcześnie pojmowanej nauce o nadciśnieniu tętniczym. Weitz już w latach dwudziestych XX wieku podjął próbę powiązania nadciśnienia tętniczego z obciążającym w tym kierunku wywiadem rodzinnym [101]. Podwyższone wartości ciśnienia stwierdził u około połowy rodzeństwa chorych na nadciśnienie tętnicze. W oparciu o tę obserwację wysunął koncepcję, że nadciśnienie dziedziczy się w sposób jednogenowy. Teoria jednogenowego dziedziczenia nadciśnienia została rozwinięta w latach sześćdziesiątych przez Platta. Uważał on, że rozkład ciśnienia w populacji ma charakter bimodalny, co pozwala na rozgraniczenie osób z prawidłowym ciśnieniem od pacjentów z nadciśnieniem [66]. Sugerowało to, że nadciśnienie tętnicze jest uwarunkowaną dziedzicznie jednostką chorobową, która jest zależna od jednego tylko „genu nadciśnienia”. U homozygot choroba miała się przejawiać postacią o ciężkim przebiegu klinicznym, a u heterozygot powodować umiarkowany wzrost ciśnienia tętniczego krwi. W opozycji do takiego stanowiska pozostawał Pickering, który twierdził, że nadciśnienie pierwotne nie stanowi odrębnej jednostki chorobowej, a jest jedynie ilościowym odchyleniem od normy [63]. Nadciśnienie tętnicze reprezentuje tu jedynie najwyższe wartości ciśnienia na jednomodalnej krzywej rozkładu ciśnienia w populacji. Hipoteza ta nie negując roli czynników genetycznych zakładała, że ciśnienie tętnicze dziedziczy się jako cechę ilościową, a nie jednostkę chorobową. Nadciśnienie pierwotne jest w tym ujęciu stanem o złożonej etiologii, w której czynniki środowiskowe odgrywają tak samo

ważną rolę jak czynniki genetyczne. Można więc mówić o wieloczynnikowym uwarunkowaniu nadciśnienia, obejmującym zarówno wielogenowe podłoże genetyczne, jak i wpływ różnych czynników zewnętrznych. Pomimo upływu lat teoria Pickeringa jest powszechnie akceptowana. Znajduje poparcie w wielu obserwacjach epidemiologicznych. Rozkład ciśnienia tętniczego w populacji zbliżony do normalnego przemawia za dziedziczeniem wieloczynnikowym, w którym ciśnienie zależy od dużej liczby czynników addytywnych.

O wpływie genów na wysokość ciśnienia tętniczego świadczą wyniki badań rodzinnych, które wykazały związek między ciśnieniem tętniczym u rodziców i dzieci oraz w obrębie par rodzeństwa [71]. Ogólny wniosek sformułowany na podstawie badań epidemiologicznych sprowadza się do stwierdzenia, że im bliższy stopień genetycznego pokrewieństwa, tym bardziej zbliżone wartości ciśnienia. Szacuje się, że zmienność ciśnienia tętniczego przypisana wszystkim czynnikom genetycznym waha się od 25 % w badaniach rodzin wielopokoleniowych do 65 % w badaniach bliźniąt [32].

Podkreśla się, że do końca lat osiemdziesiątych postęp w badaniach dotyczących aspektów genetycznych nadciśnienia wynikał głównie z wprowadzania coraz to doskonalszych metod statystycznych do analizy danych uzyskiwanych z dużych badań populacyjnych. Dopiero wprowadzenie technik biologii molekularnej pozwoliło na ujawnienie nowych patomechanizmów pierwotnego nadciśnienia tętniczego, odkrywanych w przeszłości na podstawie mniej wyrafinowanych technik obserwacyjnych [26]

Identyfikacja genów, które przyczyniają się do rozwoju nadciśnienia jest jednak utrudniona poprzez fakt, że fenotypy określające wysokość ciśnienia tętniczego - rzut serca i całkowity opór obwodowy - są kontrolowane przez fenotypy pośrednie, takie jak autonomiczny układ nerwowy, hormony obkurczające i rozkurczające naczynia, objętość płynów ustrojowych, strukturę układu sercowo-naczyniowego, czynność nerek i wiele innych [52, 15]. Potencjalne znaczenie w patogenezie nadciśnienia tętniczego może mieć polimorfizm w obrębie każdego z genów, którego produkt białkowy bierze udział w regulacji ciśnienia tętniczego.

W ostatnich latach charakteryzujących się gwałtownym wzrostem zainteresowania genetyką molekularną, opublikowano badania o powiązaniu wielu genów z ciśnieniem tętniczym, zwanych genami kandydatami.

Wśród genów-kandydatów znalazły się między innymi polimorfizmy w obrębie genów kodujących angiotensynogen [42], enzym konwertujący angiotensynę [1], receptor angiotensyny [9], a także w obrębie genu kodującego receptor  $\beta$ 2-adrenergiczny [92],  $\alpha$ -adducynę [16] i syntazę tlenu azotu [55].

Wśród genów, których polimorfizm może potencjalnie wiązać się z rozwojem nadciśnienia tętniczego szczególnie zainteresowanie wzbudza obecnie gen podjednostki  $\beta$ 3 białka G.

Białka G są integralnymi cząsteczkami błony cytoplazmatycznej działającymi jako przez błonowe wzmacniacze sygnałów biologicznych. Białka G sprzęgają receptory hormonów, amin biogennych, neurotransmiterów z efektorami działającymi wewnątrz komórki - z układem cykazy adenylowej, szlakiem metabolicznym trójfosforanu inozytolu czy diacyloglicerolu lub kanałami jonowymi potasowymi lub wapniowymi. Białka G są heterotrimerami - składają się z trzech podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Obecnie wyróżnia się szczegółowo definiowane klasy białek G, najogólniej dzielone na białka  $G_s$  -stymulujące oraz  $G_i$  - hamujące układy efektorowe komórki [10].

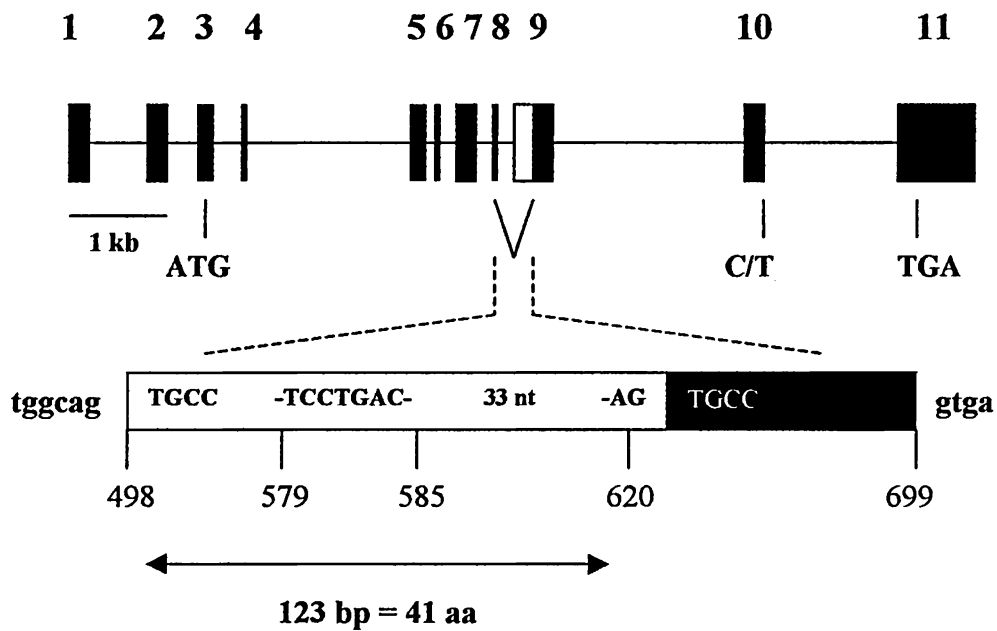
Białka G są doskonale przystosowane do swojej funkcji, tj szybkiego włączania i wyłączania sygnału. Główne domeny funkcjonalne (związane z hydrolizą trójfosforanu guaniny - GTP) mieszczą się w podjednostce  $\alpha$ . Podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$  zakotwiczą białka G w błonie i odgrywają rolę w oddziaływaniu z receptorem. Nieaktywne białko G jest trimerem. W domenie nukleotydowej podjednostki  $\alpha$  znajduje się silnie związany GDP. Połączenie receptora z ligandem powoduje przejście konformacyjne podjednostki  $\alpha$  do jej aktywnej formy, uwolnienie GDP i zastąpienie go przez GTP. Konsekwencją tych zmian jest oddysocjowanie podjednostki  $\alpha$  z trimery. Dysocjacja ta jest niezbędnym warunkiem do przekazania sygnału z receptora na efektor. Tylko wolna podjednostka  $\alpha$  lub kompleks  $\beta / \gamma$  może modulować aktywność efektor. Na etapie aktywacji efektor następuje zwielokrotnienie sygnału [22].

Na uwagę zasługuje fakt, że cały szereg czynników wazoaktywnych, a także czynników wzrostu oddziałuje na komórkę poprzez białka G. Pomimo kluczowej roli białek G w funkcjonowaniu przez błonowych układów sygnalizacyjnych komórki, dopiero niedawno zwrócono uwagę na ich potencjalny udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego [84]. Dowodów dostarczyły badania izolowanych limfoblastów i hodowle komórkowe fibroblastów pacjentów z



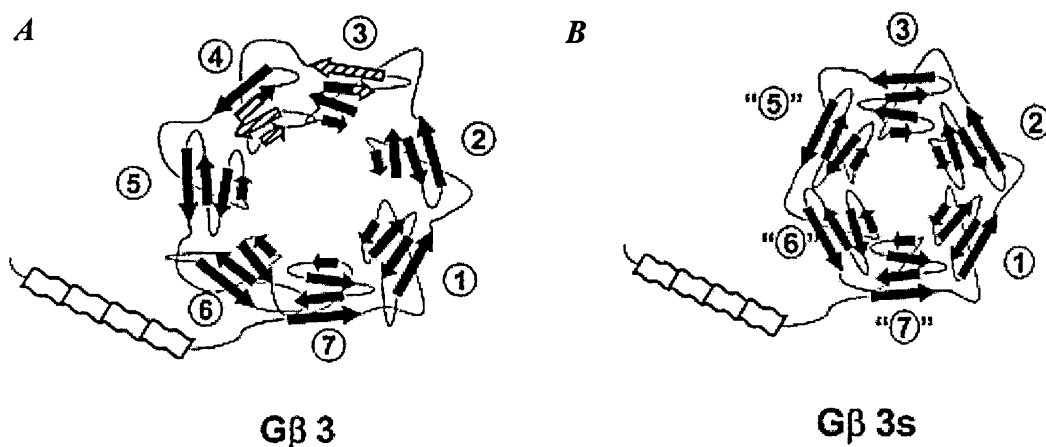
nadciśnieniem tętniczym. Niemal u połowy chorych na pierwotne nadciśnienie stwierdzano zwiększoną aktywność wymiennika sodowo-wodorowego [natrium-hydrogen exchanger – NHE]. Przyczyną tego zjawiska nie były, jak wcześniej przypuszczano, zmiany w budowie wymiennika ani też jego nadmierna ekspresja. Wykazano natomiast, że u jego podłoża leży zwiększenie aktywności systemu transdukcji związanego z białkami G wrażliwymi na toksynę krztuśca (Gi). Komórki takie cechują się znacznie zwiększoną reaktywnością na różne bodźce receptorowe - mediowaną za pośrednictwem białka Gi [86]. Analiza molekularna genu podjednostki  $\beta 3$  białka G (GNB3) wykazała obecność w 10 eksonie tego genu, zlokalizowanego w obrębie krótkiego ramienia chromosomu dwunastej pary (12p13), polimorfizmu C825T (rys 1) [64]. Obecność allelu T jest związana z wystąpieniem alternatywnej drogi składania mRNA (alternative splicing), w którym delecji ulegają nukleotydy 498 do 620 w obrębie eksonu 9, a w rezultacie powstaniem cząsteczki białka  $G\beta 3$ -s (splice variant) z ubytkiem 41 aminokwasów.

Rys. 1 *Struktura genu podjednostki  $\beta 3$  białka G. Gen złożony jest z 11 eksonów, kodon start ATG zlokalizowany jest w eksonie 3, kodon stop TGA w eksonie 11. Polimorfizm C825T znajduje się w eksonie 10. Następstwem tranzycji C  $\rightarrow$  T jest pojawienie się dodatkowego miejsca donorowego i akceptorowego, a w konsekwencji alternatywne składanie 9 eksonu GNB3. Powstały w ten sposób mRNA jest krótszy o 123 nukleotydy, co prowadzi do translacji podjednostki  $\beta 3$  krótszej o 41 aminokwasów.*



Ekspresja białka G $\beta$ 3-s jest szczególnie nasiloną u pacjentów posiadających allel T, jej to właśnie przypisuje się opisaną powyżej zwiększoną reaktywność białka G pod wpływem różnorodnych bodźców receptorowych (rys 2) [87].

Rys. 2 Proponowana przez Sifferta i wsp. [87] struktura białek G $\beta$ 3 i G $\beta$ 3-s. Białko G $\beta$ 3 należy do rodziny białek o strukturze domenowej, helikalnej, z siedmioma domenami hydrofobowymi. Ubytek 41 aminokwasów (fragment zaznaczony na rysunku A) w cząsteczce białka G $\beta$ 3-s (rys B) powoduje istotną zmianę konformacji przestrzennej i utratę jednej (czwartej) domeny.



Biologiczne znaczenie mutacji C825T potwierdzono w badaniach *in vitro*, przy użyciu radioaktywnego analogu GTP (GTP $\gamma$ S), obserwując większą aktywność białka G $_i$  w liniach komórek wykazujących ekspresję G $\beta$ 3-s [87]. Ponadto, wykazano większą aktywność chemotaktyczną pod wpływem interleukiny-8 w komórkach linii COS-7 transfekowanych G $\beta$ 3-s w porównaniu do komórek z ekspresją prawidłowego białka G [99].

Postulowany udział polimorfizmu podjednostki  $\beta$ 3 białka G w rozwoju nadciśnienia tętniczego może wynikać ze zwiększonej reaktywności mięśniówki gładkiej naczyń na czynniki wazokonstrykcyjne, stopniowej proliferacji błony środkowej naczyń i proliferacji kardiomiocytów doprowadzającej do przerostu ścian naczyń krwionośnych i mięśnia serca [79].

Dane z badań klinicznych nad rolą polimorfizmu podjednostki  $\beta 3$  białka G w rozwoju nadciśnienia tętniczego są jeszcze nieliczne. Siffert i wsp. w swoich pionierskich badaniach nad polimorfizmem podjednostki  $\beta 3$  białka G wykazał wyższą częstość występowania allelu T u osób z nadciśnieniem tętniczym [87]. W populacji japońskiej takiej asocjacji nie potwierdzono, pomimo obserwowanego w tej grupie częstszego występowania allelu T [37, 43]. Kanadyjskie badania populacji Indian Oji-Cree wykazały nawet związek allelu T genu GNB3 z niższymi wartościami ciśnienia w grupie młodych normotoników [34]. Australijskie badania pacjentów z nadciśnieniem tętniczym obciążonych wywiadem nadciśnieniowym ze strony obojga rodziców, wykazały istotnie częstsze występowanie allelu T u osób z nadciśnieniem, natomiast nie stwierdzono różnic w wartościach ciśnienia między poszczególnymi genotypami w grupie hipertoniców. Sugeruje to udział allelu T GNB3 w rozwoju nadciśnienia, bez bezpośredniego wpływu na wartości ciśnienia [7].

Rozbieżność wyników uzyskiwanych w badaniach genetycznych, w tym także badaniach dotyczących roli polimorfizmu GNB3, może wynikać zarówno ze złożoności mechanizmów etiopatogenetycznych jak i niedoskonałości stosowanych metod badawczych.

Polimorfizm danego genu może odgrywać rolę jedynie u osób w określonym wieku i tylko w określonych warunkach środowiskowych. Należy podkreślić, że różne grupy rasowe i geograficzne mają różną dystrybucję alleli poszczególnych genów. Istnieje więc możliwość, że polimorfizm danego genu ma znaczenie kliniczne jedynie w określonych populacjach, co może częściowo tłumaczyć rozbieżne wyniki.

Realizacja oraz interpretacja wyników badań dotyczących analizy związku pomiędzy nadciśnieniem tętniczym a polimorfizmami w obrębie genów kandydatów jest związana także z dużymi trudnościami we właściwym doborze grupy badanej i kontrolnej, które muszą być wystarczająco liczne, jednorodne etnicznie i dobrze scharakteryzowane fenotypowo. Klasyczną metodą analizy wyników jest analiza asocjacji, która polega na porównaniu dystrybucji alleli tego samego genu u niespokrewnionych osób chorych na nadciśnienie tętnicze i u osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia. Przyjmuje się, że allel określonego genu jest zasocjowany z cechą, jeśli występuje ze znacznie większą częstością wśród chorych niż w grupie kontrolnej. Podstawową wadą tej metody jest duże ryzyko

otrzymania wyników fałszywie dodatnich (jeżeli badana cecha jest stosunkowo częsta w badanej populacji, to asocjację będzie wykazywał każdy częsty w tej populacji allel). Z tego powodu spore nadzieje budzą badania rodzin nuklearnych (rodzice i dzieci), z zastosowaniem metody TDT (transmission disequilibrium test – test nierównowagi transmisji). W teście tym ocenia się czy jeden z alleli nie jest przekazywany osobom chorym częściej niż drugi. W klasycznym wariancie tej metody analizie poddaje się osoby dotknięte chorobą oraz heterozygotycznych w zakresie badanego polimorfizmu rodziców. Ponieważ metoda TDT nie daje wyników fałszywie dodatnich, obecnie przeważa pogląd, że wszystkie pozytywne wyniki badań opartych na analizie asocjacji wymagają potwierdzenia metodą TDT [3].

Należy także zaznaczyć, że w związku z normalnym charakterem rozkładu ciśnienia w populacji ogólnej oraz poligenowym uwarunkowaniem nadciśnienia, badania genetyczne powinny być skoncentrowane raczej na poszukiwaniu genów prowadzących do podwyższenia ciśnienia tętniczego, a nie konieczne uwarunkowania nadciśnienia.

Rozwój metod analizy statystycznej w badaniach genetyczno-epidemiologicznych pozwala obecnie na ocenę stopnia dziedziczności zmiennych ilościowych jak ciśnienie tętnicze. Także metoda TDT została rozwinięta i przystosowana do oceny zmiennych ciągłych (TDT<sub>Q</sub> – *transmission disequilibrium test for quantitative traits*, test nierównowagi transmisji dla zmiennych ilościowych) [2]. Nie trzeba więc badać wyłącznie osób z nadciśnieniem, aby wykazać ilościowy, związek wartości ciśnienia z występowaniem określonego allelu danego genu. Użycie tej metody pozwala na wykrycie polimorfizmu badanego genu-kandydata związanego z wyższymi wartościami ciśnienia, pomimo znacznej heterogenności i poligenowego charakteru dziedziczenia nadciśnienia.

Gen podjednostki  $\beta 3$  białka G jest nowym genem w rodzinie "genów kandydatów" warunkujących wartości ciśnienia tętniczego, o udokumentowanym znaczeniu funkcjonalnym. W literaturze światowej pojawiły się nieliczne doniesienia na temat związku polimorfizmu tego genu z nadciśnieniem tętniczym. W polskiej populacji brak jest danych na temat częstości występowania alleli

genów GNB3 w populacji ogólnej, brak też danych określających ich związek z wybranymi parametrami układu krążenia.

Ocena wpływu czynników genetycznych na złożone fenotypy końcowe, jakim jest między innymi ciśnienie tętnicze krwi, wymaga bardzo precyzyjnej charakterystyki fenotypowej uczestników badania. Większość opublikowanych badań dotyczących związku ciśnienia z polimorfizmem GNB3 oparta jest na tradycyjnych pomiarach ciśnienia sfigmomanometrem rtęciowym. Tymczasem wykorzystanie metody 24-godzinnego monitorowania ciśnienia tętniczego, pozwalającego na obserwację zmian ciśnienia zachodzących w czasie, może znacznie wzbogacić wiedzę dotyczącą aspektów genetycznych regulacji ciśnienia tętniczego. Wartości ciśnienia uzyskane w pomiarach całodobowych, dzięki uwzględnieniu zmienności ciśnienia, korelują znacznie lepiej niż wyniki pomiarów tradycyjnych z powikłaniami narządowymi nadciśnienia [97]. Najważniejszą jednak zaletą całodobowego pomiaru ciśnienia krwi jest możliwość oceny rytmu dobowego i zmian ciśnienia w krótkich przedziałach czasu. Zmienność i rytm dobowy ciśnienia traktowane są obecnie jako czynniki modyfikujące przebieg, powikłania i prognozę nadciśnienia. Wyniki prac wskazują jednoznacznie na większe zagrożenie rozwojem powikłań u chorych, u których spadek ciśnienia w godzinach nocnych nie przekracza 10 % wartości z okresu czuwania [98]. Podkreśla się także wartość zmienności ciśnienia, jako parametru określającego wielkość ryzyka sercowo-naczyniowego [97]. Powszechnie przyjętym wykładnikiem zakresu zmienności ciśnienia jest wielkość odchylenia standardowego wszystkich pomiarów wykonanych w danym przedziale czasu [61]. Warty uwagi jest fakt, że prace określające ryzyko wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego w zależności od wartości odchylenia standardowego uwzględniały bezwzględne wartości ciśnienia krwi i obserwowany wpływ zmienności ciśnienia był tu od nich niezależny [61, 28, 98].

Przerost lewej komory serca stanowi uznany czynnik ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych zarówno u chorych na nadciśnienie tętnicze jak i w populacji ogólnej [13, 50]. Przerost lewej komory obejmuje wszystkie elementy tworzące mięsień sercowy. Należą do nich przede wszystkim stanowiące 75 % masy serca komórki mięśnia sercowego, jak również fibroblasty, komórki mięśni gładkich i komórki śródbłonna naczyniowego [19]. Mimo

postępu, jaki dokonał się w rozumieniu procesów stanowiących podstawę rozwoju przerostu lewej komory, wciąż nie ma całościowego obrazu tego zjawiska, gdyż bardzo różne procesy i substancje jak np.: noradrenalina, angiotensyna II, hormon wzrostu, tyroksyna, insulina, aldosteron, endotelina czy inne, mogą stymulować przerost, korzystając ze swoistych szlaków wewnątrzkomórkowych [29, 60, 41]. Większość z nich wykorzystuje w transmisji sygnału układ receptorowy sprzężony z białkiem G. Polimorfizm genu podjednostki  $\beta 3$  białka G jest więc bardzo atrakcyjnym “genem kandydatem”, który funkcjonalnie może być związany z podwyższeniem masy lewej komory [88].

Przedmiotem podjętego badania jest analiza związku między polimorfizmem genu podjednostki  $\beta 3$  białka G a wartościami i zmiennością ciśnienia tętniczego w 24-godzinnej rejestracji, morfologią i funkcją lewej komory oraz strukturą i czynnością dużych naczyń w grupie chorych z nadciśnieniem oraz w populacji ogólnej, z wykorzystaniem metod analizy asocjacji oraz testu TDT dla zmiennych ciągłych, opartych na danych z badań rodzin.

### **Cele pracy:**

1. Określenie częstości występowania alleli polimorficznych (C825T) genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w populacji regionu krakowskiego.
2. Porównanie częstości występowania poszczególnych alleli polimorficznych GNB3 u osób z prawidłowym ciśnieniem i chorych z nadciśnieniem tętniczym.
3. Ocena w oparciu o badanie rodzin związku polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G z wartością, zmiennością i profilem dobowym ciśnienia tętniczego krwi, parametrami morfologii i funkcji lewej komory oraz sztywności i przebudowy dużych naczyń tętniczych.

## **Material i metodyka**

Praca została zrealizowana w ramach europejskiego projektu, dotyczącego badań nad dziedzicznością nadciśnienia tętniczego – European Project on Genes in Hypertension (EPOGH) [45].

Badaniem objęto 86 dwupokoleniowych rodzin (rodziny nuklearne) o określonej strukturze (rodzice i co najmniej dwoje dzieci), z czego 55 rodzin zrekrutowano z populacji ogólnej, kolejne 31 stanowiły rodziny pacjentów Poradni Nadciśnieniowej I Kliniki Kardiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

Rekrutacji podlegały rodziny spełniające kryteria włączenia do badania:

- *Udział w badaniu przynajmniej jednego z rodziców i co najmniej dwojga z dzieci.*
- *Wiek badanych osób od 18 do 60 r.ż.*
- *Pisemna zgoda na badanie osoby wylosowanej i pozostałych członków rodziny uczestniczących w programie.*

Rodziny z populacji ogólnej wybrano spośród mieszkańców Miasta i Gminy Niepołomice, regionu rolniczo-przemysłowego, położonego w pobliżu Krakowa. Drogą losowania wybierano pojedyncze osoby, następnie sprawdzano strukturę ich rodzin i spełnienie kryteriów włączenia do badania.

Losowania dokonywano na podstawie aktualnych list wyborczych, metodą warstwową, proporcjonalną, posługując się tabelami liczb losowych, gdzie warstwy stanowiło dziesięć okręgów wyborczych na terenie Gminy Niepołomice.

Szczegółowe informacje o charakterze i celu badania oraz warunkach uczestnictwa w badaniu, do wszystkich osób wybranych losowo przekazano drogą listowną. W kolejnym etapie, po uzyskaniu wstępnej zgody na udział w programie, w grupie osób z odpowiadającą założeniom programu strukturą rodziny, ustalano termin wizyty informacyjnej.

Wylosowano 500 osób, spośród tej grupy, kontakt był możliwy z 464 osobami. Odpowiednią dla badania strukturę rodziny stwierdzono u 101 osób. Zgodę na udział w badaniu wyraziło natomiast 55 rodzin. (54.5 %).

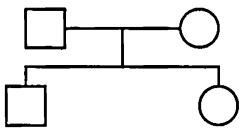
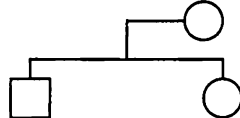
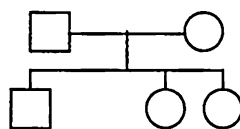
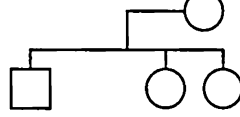
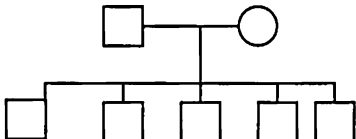
Badaniem objęto także rodziny stałych pacjentów Poradni Nadciśnieniowej I Kliniki Kardiologii CMUJ. Podstawowym kryterium włączenia była odpowiednia



struktura rodziny. Do udziału w badaniu zaproszono kolejnych 33 pacjentów mieszkających w Krakowie wraz z rodzinami, zgodę na udział w programie uzyskano od 32 rodzin. Jedną z badanych rodzin wykluczono ze względu na rozpoznanie wtórnego charakteru nadciśnienia u jednego z dzieci pacjenta Poradni Nadciśnieniowej. Do dalszych analiz włączono więc 31 rodzin.

Łącznie badana grupa liczyła 326 osób z 86 rodzin (141 osób z pokolenia rodziców, 185 z pokolenia dzieci).

Tab. 1 Struktura i liczebność rodzin badanej populacji.

Rodzice + Dzieci	Liczba
2 + 2 	50 (58.1 %)
1 + 2 	26 (30.2 %)
2 + 3 	5 (5.8 %)
1 + 3 	4 (4.7 %)
2 + 5 	1 (1.2 %)

U wszystkich badanych przeprowadzono dwie wizyty domowe w odstępie 1 – 2 tygodni. Podczas pierwszej wizyty ponownie udzielono wyczerpującej informacji na temat prowadzonego badania, ze szczegółowym omówieniem protokołu.

Wszyscy biorący udział w badaniu, udzielili pisemnej zgody na uczestnictwo w programie oraz odrębnej zgody na udział w badaniu genetycznym.

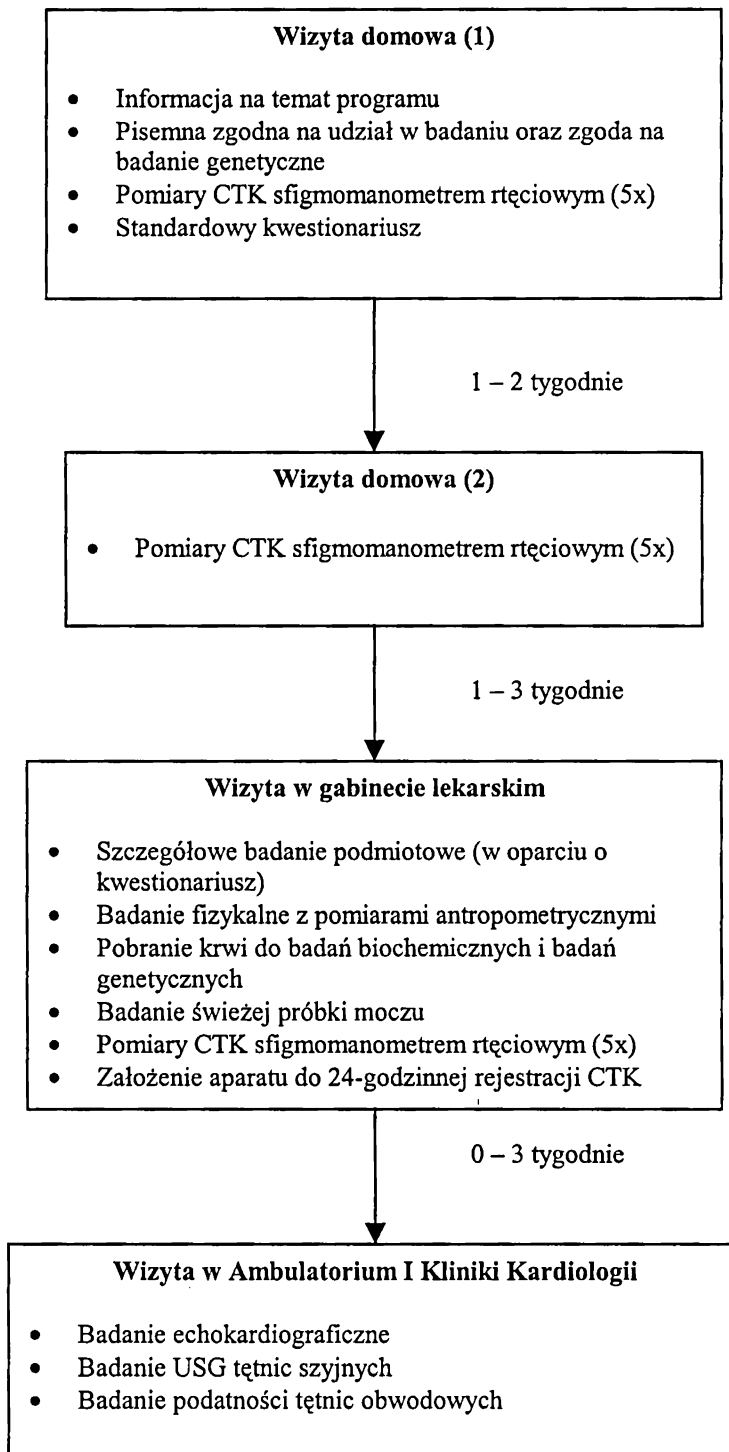
Szczegółowe badanie podmiotowe (w oparciu o wystandaryzowany kwestionariusz) oraz badanie fizykalne, jak również pobranie krwi oraz próbek moczu do analiz wykonano podczas trzeciej wizyty - w gabinecie lekarskim. Podczas tej wizyty zakładano także aparat do 24-godzinnej rejestracji ciśnienia tętniczego.

Czwarta wizyta - w Ambulatorium I Kliniki Kardiologii obejmowała badania dodatkowe – badanie echokardiograficzne, badanie podatności tętnic oraz ultrasonograficzną ocenę tętnic szyjnych.

U wszystkich osób na podstawie badania fizykalnego oraz wywiadu lekarskiego i przeprowadzonych badań dodatkowych oraz ewentualnie badań obrazowych wykluczono wtórny charakter nadciśnienia tętniczego.

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego (decyzja nr KBET/24/B/2001 z dnia 22 luty 2001).

Rys. 3 Schemat badania.



## ***Pomiary ciśnienia tętniczego krwi***

Pomiarów ciśnienia tętniczego dokonywano sfigmomanometrem rtęciowym, zgodnie z wytycznymi Brytyjskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego [62]. Ciśnienie tętnicze zmierzono w trakcie pierwszej wizyty na obu ramionach, następnie wszystkich pomiarów dokonywano na ramieniu, na którym stwierdzono wyjściowo wyższe CTK, a w przypadku jednakowej wartości ciśnienia na obu ramionach - na ramieniu niedominującym.

Standardowe pomiary ciśnienia wykonywano podczas trzech oddzielnych wizyt, pięciokrotnie w czasie każdej wizyty, w odstępach dwuminutowych.

Nadciśnienie tętnicze rozpoznawano w oparciu o wywiad lekarski oraz w oparciu o pomiary ciśnienia sfigmomanometrem rtęciowym. Nadciśnienie tętnicze stwierdzano jeżeli średnia tradycyjnych pomiarów ciśnienia z dwóch oddzielnych wizyt przekraczała wartości prawidłowe (dla ciśnienia skurczowego: wartości równe lub wyższe niż 140 mmHg, rozkurczowego równe lub wyższe niż 90 mmHg), lub osoba badana stosowała preparaty hipotensyjne.

### ***24-godzinne automatyczne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi***

W celu dokładnej oceny ciśnienia tętniczego krwi wykorzystano metodę całodobowej rejestracji ciśnienia, przy użyciu aparatu SpaceLabs 90207. Pomiary ciśnienia i tętna były wykonywane co 15 minut w ciągu dnia (6.00 – 22.00) i co 30 minut w nocy (22.00 – 6.00). Za fazę czuwania przyjęto okres od 8.00 do 22.00, natomiast za fazę snu przedział między 0.00 – 6.00.

Położenie mankietu weryfikowano przez porównanie wyników pomiaru automatycznego i poprzedzającego go pomiaru wykonanego sfigmomanometrem rtęciowym (różnica nie przekraczająca 5 mmHg).

Przy analizie danych wykorzystano kryteria eliminacji pomiarów niewiarygodnych zaproponowane przez Staessena i wsp [91] i przyjęto, że pomiarami niewiarygodnymi były te, w których:

- skurczowe CTK przekraczało 240 mmHg, lub było niższe niż 50 mmHg
- rozkurczowe CTK wyższe od 140 mmHg lub poniżej 40 mmHg,
- ciśnienie tętna (różnica między skurczowym i rozkurczowym CTK) była niższa niż 10 % wartości CTK skurczowego,

- częstość tętna była większa niż 150/min lub niższa niż 40/min.

Na podstawie uzyskanych zapisów obliczano średnie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego z całej doby oraz oddzielnie z okresu snu i czuwania. Obliczono procentową wielkość spadku nocnego ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w stosunku do godzin dziennych. Za miarę zmienności ciśnienia przyjęto odchylenie standardowe wartości ciśnienia w poszczególnych przedziałach czasowych.

Metodyka oraz interpretacja wyników całodobowego monitorowania ciśnienia krwi pozostawała w zgodności z oficjalnym stanowiskiem proponowanym przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego [31].

### ***Pomiary antropometryczne***

U każdego uczestnika programu, badanie fizykalne rozszerzono o dokładne pomiary antropometryczne. Ciężar ciała i wzrost posłużyły do wyliczenia indeksu masy ciała - Body Mass Index (BMI), a obwód pasa (mierzony na poziomie pępka) i bioder (mierzony na poziomie krętarzy większych) do oceny stosunku obwodu talii do bioder - wskaźnika WHR (waist to hip circumference ratio). Pomiaru grubości fałdów skórnych – ramieniowego (nad mięśniem trójgłowym ramienia) i podłopatkowego - dokonano przy użyciu fałdomierza skórniego (*Instytut Miar i Wag, Politechnika Łódzka*).

### ***Standardowy kwestionariusz***

Badanie podmiotowe zostało rozszerzone przez wypełnienie szczegółowego kwestionariusza dotyczącego informacji na temat danych demograficznych, statusu socjoekonomicznego, przebytych i współistniejących chorób, aktualnie zażywanych leków oraz stylu życia - aktywności fizycznej i używek. Jednolita forma uzyskania tych danych pozwoliła na wymierną i porównawczą ocenę analizowanych później parametrów (w tym wielkości wysiłku fizycznego czy ilości spożywanego alkoholu).

### ***Badanie echokardiograficzne.***

U wszystkich badanych zostało wykonane badanie echokardiograficzne M-mode, 2D i badanie metodą Dopplera dla oceny morfologii i funkcji lewej komory serca aparatem Hewlett-Packard, Sonos 2000, głowicą o częstotliwości 2.5 MHz według standardów American Society of Echocardiography [76, 77]. Analizowano następujące parametry strukturalne: wymiar późnorozkurczowy lewej komory (LVID<sub>d</sub>), wymiar późnoskurczowy lewej komory (LVID<sub>s</sub>), grubość tylnej ściany w rozkurczu (LVPW<sub>d</sub>), grubość przegrody międzykomorowej w rozkurczu (IVS<sub>d</sub>), względną grubość ściany lewej komory (RWT). Masę lewej komory (LVM) oceniano na podstawie formuły zaproponowanej przez Devereux i wsp. [19]:

$$LVM = 0.8 \times [1.04 \times (IVS_d + LVID_d + LVPW_d)^3 - LVID_d^3] + 0.6$$

Wskaźnik masy lewej komory (LVMI) obliczono jako iloraz masy lewej komory i powierzchni ciała (LVM/BSA). Za kryterium przerostu przyjęto wartości LVMI przekraczające 134 g/m<sup>2</sup> dla mężczyzn i 110 g/m<sup>2</sup> dla kobiet. [20, 46].

Za wskaźnik czynności skurczowej lewej komory przyjęto frakcję skracania włókien wsierdzia lewej komory (FS), obliczoną według wzoru [72]:

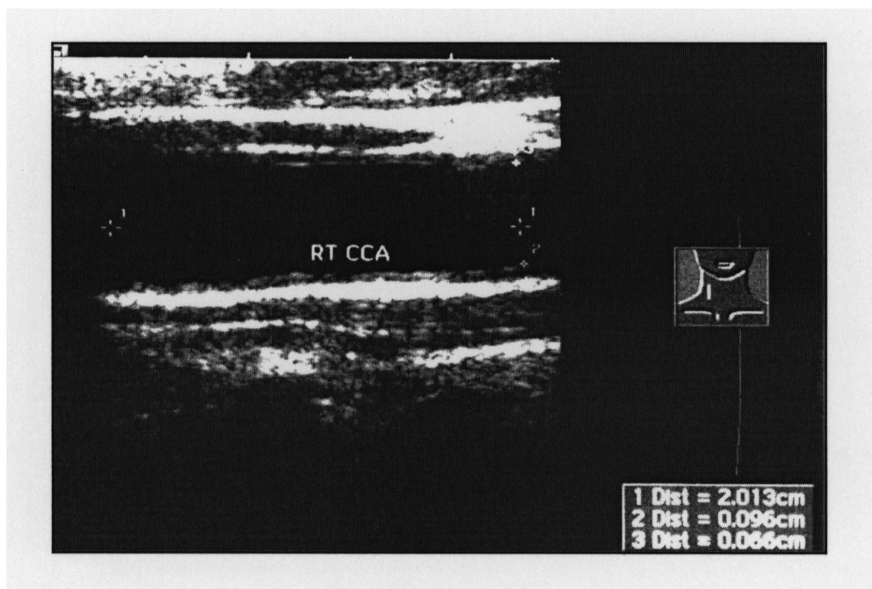
$$FS = (LVID_d - LVID_s) / LVID_d$$

W ocenie czynności rozkurczowej lewej komory analizowano krzywą napływu mitralnego. Pomiar wykonano z zastosowaniem fali pulsacyjnej w projekcji koniuszkowej czterojamowej. Próbkę dopplerowską umieszczono na poziomie krawędzi płatków zastawki mitralnej, tak aby rejestrowane krzywe napływu charakteryzowały się największą prędkością. Do analizy użyto 3 ewolucji, uzyskanych podczas spokojnego wydechu, charakteryzujących się największą prędkością wczesnego napływu mitralnego. Oceniano następujące parametry: maksymalną prędkość napływu w fazie wczesnego napełniania (E), maksymalną prędkość napływu w fazie późnego napełniania (A), stosunek E/A. Analizie poddano także wskaźnik funkcji rozkurczowej lewej komory serca - czas rozkurczu izowolumetrycznego (IVRT), mierzony między tonem dopplerowskim (kliknięciem) zamknięcia zastawki aortalnej i tonem otwarcia zastawki mitralnej [90].

Z dalszej analizy wykluczono osoby z zaburzeniami funkcji skurczowej lewej komory i wadami zastawkowymi serca.

## ***Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych***

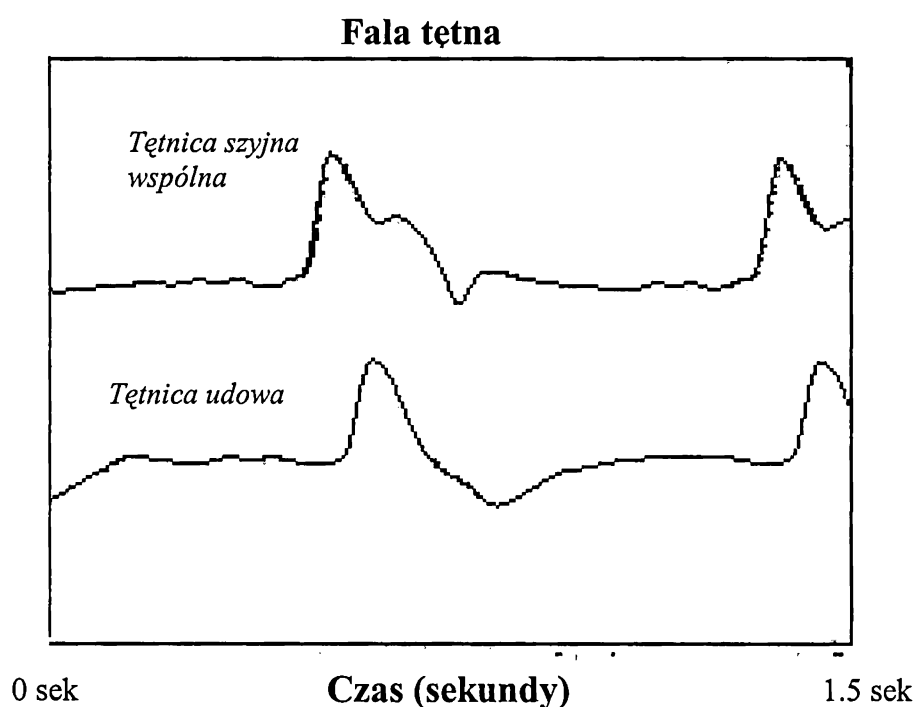
Nasilenie procesu miażdżycy zostało ocenione poprzez ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych z oceną grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych wspólnych. Badanie wykonano aparatem Hewlett Packard Sonos 2000, z głowicą sektorową 7.5 MHz. Pomiarów grubości kompleksu intima-media dokonywano w tętnicy szyjnej wspólnej, na ścianie bliższej i dalszej, w odległości 2 cm od podziału na tętnicę szyjną wewnętrzną i zewnętrzną. Wynik wyrażano jako średnią z pomiaru grubości kompleksu intima-media na ścianie bliższej i dalszej, prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej [65].



*Rys 4. Ocena grubości kompleksu intima-media w tętnicy szyjnej wspólnej.*

### ***Badanie podatności naczyń.***

Ocenę podatności ściany dużych naczyń tętnicznych przeprowadzono poprzez pomiar centralnej szybkości fali tętna (PWV). Badanie wykonano przy pomocy automatycznego rejestratora komputerowego i programu do analizy wyników Complior® (Complior, Colson, Garges les Genosse, France). Czujniki (Pressure sensitive transducers TY-306-Fukuda (Fukuda, Tokyo, Japan)) umieszczano nad prawą tętnicą szyjną i prawą tętnicą udową. PWV obliczano jako iloraz odległości między czujnikami i czasu między szczytem fali tętna rejestrowanej nad tętnicą szyjną i nad tętnicą udową. Do wyznaczenia prędkości fali tętna uśredniono zapis z co najmniej 25 poprawnych pojedynczych pomiarów.



*Rys 5 Zapis fali tętna z tętnicy szyjnej wspólnej i tętnicy udowej (aparatur Complior)*

### ***Badania laboratoryjne***

U wszystkich badanych wykonano badania laboratoryjne obejmujące: morfologię krwi, lipidogram, poziom glikemii na czczo, poziom elektrolitów (sód, potas), poziom kreatyniny oraz badanie ogólne moczu metodą paskową.



U badanych wykonano także oznaczenia grupy krwi w układzie ABO i Rh, oraz sprawdzono zgodność genotypów podjednostki  $\beta 3$  białka G w obrębie rodzin (rodzice - dziecko, zakładając dziedziczenie mendlowskie), w celu ewentualnego wykluczenia z analizy dzieci wychowywanych przez osoby nie będące ich rodzicami biologicznymi. U żadnej z badanych rodzin nie zachodziła konieczność wyłączenia jej z populacji badanej na podstawie niezgodności grup krwi i/lub genotypów badanego polimorfizmu.

### ***Badania genetyczne - oznaczenia polimorfizmu podjednostki $\beta 3$ białka G***

Badania genetyczne zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Klinicznej Katedry Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego – Kierownik: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć.

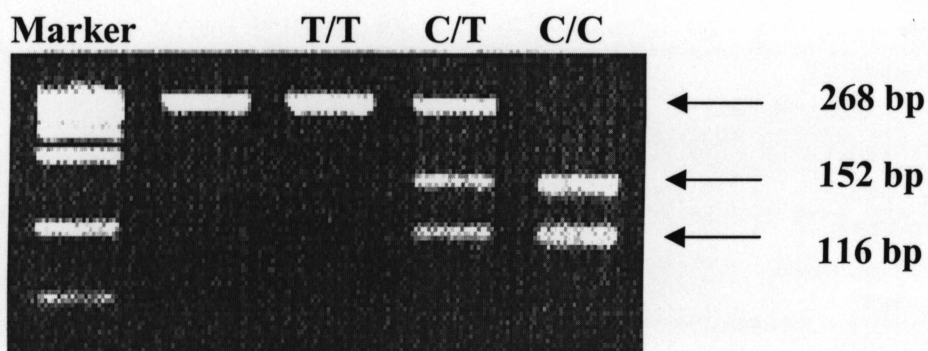
Genomowy DNA został wyizolowany z krwi obwodowej, pobranej na wersenian dwusodowy (EDTA), za pomocą zestawu firmy QIAGEN (QIAamp DNA Blood Mini Kit). W tabeli 2 zestawiono startery, które posłużyły do powielenia w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) fragmentów genu GNB3 zawierających zmutowane miejsca.

*Tab 2. Startery służące do powielania w reakcji PCR fragmentów genu GNB3 zawierających zmutowane miejsca.*

<b>Polimorfizm GNB3</b>	<b>SEKWENCJA OLIGONUKLEOTYDU</b>
Starter sensowny	5'- TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC- 3'
Starter antysensowny	5' -GCA GCA GCC AGG GCT GGC- 3'

Detekcja mutacji C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G była możliwa dzięki zastosowaniu metody RFLP (*restriction fragment length polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych*) przy użyciu enzymu restrykcyjnego BseDI (*Fermentas*). Produkty trawienia rozłożono w 2.5 % żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Produkty reakcji zostały uwidocznione w świetle UV. Produkty nie strawione enzymem restrykcyjnym (genotyp TT – homozygota zmutowana) odpowiadały pojedynczemu prążkowi o wielkości 268 bp, całkowite strawienie (genotyp CC – homozygota typu dzikiego) dawało w efekcie podwójny prążek o wielkości 116 bp i 152 - odpowiednio [87].

Ry 6. Przykładowy rozkład elektroforetyczny



## Analiza statystyczna

W celu opracowania wyników pracy posłużono się pakietem statystycznym programu SAS wersja 6.12 (SAS Institute, Cary, North California, USA) z wykorzystaniem następujących metod statystycznych:

1. Statystyki opisowe - z określeniem wartości średnich, odchylenia standardowego od średniej, procentowego rozkładu zmiennych.
2. Porównania wartości średnich między dwoma niezależnymi grupami dokonano za pomocą testu t-studenta, natomiast porównania proporcji między grupami za pomocą testu chi-kwadrat.
3. W celu porównania wartości średnich pomiędzy trzema genotypami badanego polimorfizmu posłużono się testem analizy wariancji w klasyfikacji pojedynczej (ANOVA).
4. Zgodność obserwowanego rozkładu częstości genotypów z rozkładem przewidywanym według prawa Hardy-Weinberga potwierdzono przy użyciu testu chi-kwadrat.
5. W celu wyodrębnienia czynników powiązanych z analizowaną zmienną posłużono się analizą regresji krokowej. W ten sposób, przy założeniu wartości progowej dla statystyki F Snedecora (dla wejścia i pozostania w modelu regresji zmiennych) wartości 0.1, zidentyfikowano zmienne istotnie powiązane z ocenianymi parametrami struktury i funkcji układu krążenia. W kolejnych etapach analizy, wpływ czynników genetycznych na wybrane parametry układu krążenia, oceniono z zastosowaniem modelu regresji wieloczynnikowej z uwzględnieniem zdefiniowanych w modelu regresji krokowej zmiennych powiązanych.
6. W celu oceny ryzyka związanego z obecnością zmutowanego allelu wykorzystano analizę regresji logistycznej.
7. Analiza asocjacji. Ze względu na strukturę badanej populacji analizę asocjacji zmiennych z czynnikami genetycznymi przeprowadzono osobno dla każdej grupy pokoleniowej: osobno dla pokolenia rodziców i ich potomków.

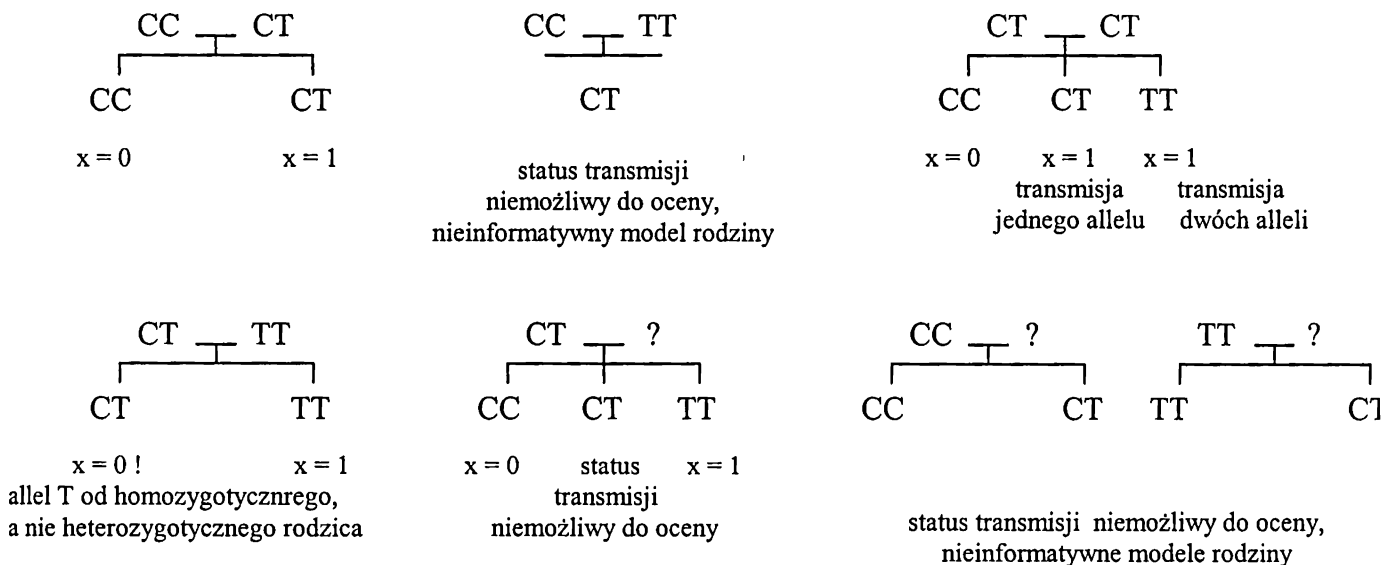
Porównano wybrane parametry opisujące strukturę i funkcję układu krążenia (fenotypy) w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 z wykorzystaniem analizy wariancji. Następnie uwzględniono w modelu regresji wieloczynnikowej zmienne powiązane, wyznaczając dla trzech grup genotypowych wartości średnie wystandaryzowane oraz standardowy błąd pomiarów.

Wobec obecności w pokoleniu potomków osób ze sobą spokrewnionych (pary rodzeństwa), w kolejnym modelu regresji wieloczynnikowej uwzględniono współczynniki korelacji zmiennych fenotypowych pomiędzy rodzeństwem (PROC GENMOD w pakiecie statystycznym SAS [94]).

### 8. Test nierównowagi transmisji.

Pozytywne wyniki uzyskane w analizie asocjacji w pokoleniu potomków poddano następnie weryfikacji w teście nierównowagi transmisji. Do analizy TDT włączono potomków, których przynajmniej jedno z rodziców było heterozygotą pod względem mutacji 825T GNB3. Transmisję allelu T definiowano jako odziedziczenie allelu T po rodzicu heterozygotycznym (rys 7) [2].

Rys.7 Przykład definiowania statusu transmisji.



Porównując fenotypy w analizie regresji wieloczynnikowej i analizie wariancji w zależności od statusu transmisji, uzyskano wartość estymatora współczynnika regresji na określonym poziomie istotności statystycznej [2]. Analizę powtórzono osobno dla przypadków transmisji tylko jednego allelu T (model addytywny dziedziczenia) oraz transmisji obu zmutowanych alleli (model recesywny dziedziczenia).

## Wyniki

### *Charakterystyka badanej populacji*

Dobrana w sposób losowy próba z terenu Miasta i Gminy Niepołomice obejmowała 55 rodzin - 206 osób. Trzydzieści jeden rodzin - 120 osób zrekrutowano poprzez Poradnię Nadciśnieniową I Kliniki Kardiologii Collegium Medicum. Badana grupa liczyła więc łącznie 326 osób z 86 dwupokoleniowych rodzin: 142 osoby z pokolenia rodziców (84 kobiety i 58 mężczyzn) i 184 z pokolenia ich potomków (91 kobiet i 93 mężczyzn).

Liczebność i strukturę badanych rodzin przedstawiono w tabeli 2 (materiał).

Średni wiek badanych rodziców wynosił  $50.3 \pm 5.0$  lat, natomiast potomków  $24.0 \pm 4.7$  lat. Wskaźnik masy ciała ( $28.7 \pm 4.8$  vs  $22.9 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup>), wskaźnik talia-biodra ( $0.90 \pm 0.08$  vs  $0.80 \pm 0.07$ ) oraz grubość fałdu skórniego ( $23.0 \pm 9.5$  vs  $14.6 \pm 6.6$  mm) były istotnie większe w pokoleniu I (rodzice) niż w pokoleniu II (potomkowie) (dla wszystkich wymienionych wartości różnice między pokoleniami na poziomie istotności  $p < 0.001$ ).

W pokoleniu starszym częściej stwierdzano nadwagę - BMI 25 - 30 kg/m<sup>2</sup> (43.0 % vs 20.7 %,  $p < 0.05$ ) i otyłość - BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> (35.2 % vs 2.2 %,  $p < 0.001$ ) w porównaniu do pokolenia II.

W pokoleniu rodziców obserwowano także istotnie wyższe niż w pokoleniu II wartości ciśnienia tętniczego, zarówno w pomiarach tradycyjnych sfigmomanometrem rtęciowym (skurczowe CTK  $135.8 \pm 22.1$  vs  $119.7 \pm 13.3$  mmHg, rozkurczowe CTK  $85.8 \pm 10.3$  vs  $73.4 \pm 8.9$  mmHg,  $p < 0.001$ ); jak i w 24-godzinnej rejestracji ciśnienia (24-godzinne skurczowe CTK:  $124.1 \pm 11.8$  vs  $117.2 \pm 8.3$  mmHg, 24-godzinne rozkurczowe CTK  $76.4 \pm 8.0$  vs  $67.7 \pm 6.3$  mmHg,  $p < 0.001$ ).

Częstość występowania nadciśnienia tętniczego była także istotnie większa w pokoleniu rodziców niż pokoleniu potomków (66.9 % vs 19.0 %,  $p < 0.001$ ). W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym leczenie farmakologiczne stosowało 58.5 % osób z pokolenia starszego i 45.8 % z pokolenia młodszego. Skuteczną kontrolę ciśnienia stwierdzono jednak zaledwie u niespełna jednej trzeciej pacjentów (28 % z pokolenia I i 29.2 % z pokolenia II – vide rysunek 8).

W obu pokoleniach, mężczyźni charakteryzowali się istotnie wyższym wskaźnikiem talia-biodra, mniejszą grubością fałdu skórniego przy podobnym do kobiet wskaźniku masy ciała (tabela 3).

Wartości ciśnienia tętniczego nie różniły się w zależności od płci jedynie w pokoleniu rodziców. W pokoleniu potomków obserwowano częstsze występowanie nadciśnienia u mężczyzn oraz wyższe wartości ciśnienia tętniczego u mężczyzn niż kobiet (tabela 3).

Cukrzycę (rozpoznaną w oparciu o wywiad i/lub pomiary glikemii na czczo) stwierdzono u 15 osób (4.6 %), spośród których jedna osoba stosowała insulinoterapię, 3 pacjentów - doustne leki hipoglikemizujące, a 7 - dietę cukrzycową.

Zaburzenia lipidowe (*hipercholesterolemia i/lub hipertriglicerydemia*) obserwowano istotnie częściej u osób z pokolenia starszego (82 % vs 29.7 %,  $p < 0.05$ ).

Palenie tytoniu deklarowało 45 osób (31.7 %) z pokolenia I (mężczyźni nieznacznie częściej niż kobiety). Istotnie mniej palaczy ( $n=44$  (23.9 %),  $p < 0.01$ ) stwierdzono wśród osób z pokolenia młodszego, w tej grupie wiekowej częściej palenie tytoniu deklarowali mężczyźni (tabela 3).

Regularne spożycie alkoholu (powyżej 5 g etanolu/dzień), oceniane na podstawie standaryzowanego kwestionariusza, odnotowano w obu pokoleniach istotnie częściej wśród mężczyzn (tabela 3).

**Tabela 3 Charakterystyka kliniczna badanej populacji z uwzględnieniem podziału na pokolenia oraz ze względu na płeć.**

	POKOLENIE I		POKOLENIE II	
	Ojcowie N=58	Matki N=84	Synowie N=91	Córki N=93
<i>Charakterystyka kliniczna</i>				
Wiek (lata)	50.9 (4.8)	49.9 (5.2)	23.2 (4.4)	24.8 (4.9)*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.5 (3.7)	28.9 (5.4)	23.2 (3.1)	22.6 (3.4)
Wskaźnik talia-biodra	0.96 (0.06)	0.86 (0.06)***	0.84 (0.05)	0.76 (0.05)***
Grubość fałdu skórniego (mm)	17.4 (7.2)	26.9 (8.9)***	12.3 (6.3)	16.8 (6.0)***
Skurczowe CTK (mmHg)†	136.6 (16.6)	135.2 (19.0)	125.7 (12.3)	113.8 (11.6)***
Rozkurczowe CTK (mmHg)†	86.3 (9.1)	85.4 (9.8)	76.4 (10.6)	71.5 (7.9)***
Nadciśnienie tętnicze (n)	40 (69%)	55 (65.5%)	27 (29%)	8 (8.6%)***
Nadciśnienie tętnicze leczone (n)	17 (29.3%)	37 (44.1%)	7 (8%)	2 (2.2%)
Cukrzyca (n)	9 (15.5%)	5 (6%)	1 (1%)	0
Otyłość (n)	21 (36.2%)	29 (34.5%)	2 (2.2%)	2 (2%)
Nadwaga (n)	25 (43.1%)	36 (42.9%)	23 (25.3%)	15 (16.1%)
Palenie tytoniu (n)	20 (34.5%)	25 (29.8%)	29 (31.9%)	15 (16.1%)**
Regularne spożycie alkoholu (n) #	22 (37.9%)	4 (4.8%)***	30 (33%)	4 (4.3%)***

W tabeli przedstawione są wartości średnie (SD) lub liczebność grup (%).

Istotne statystycznie różnice między kobietami i mężczyznami w obrębie każdego pokolenia: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

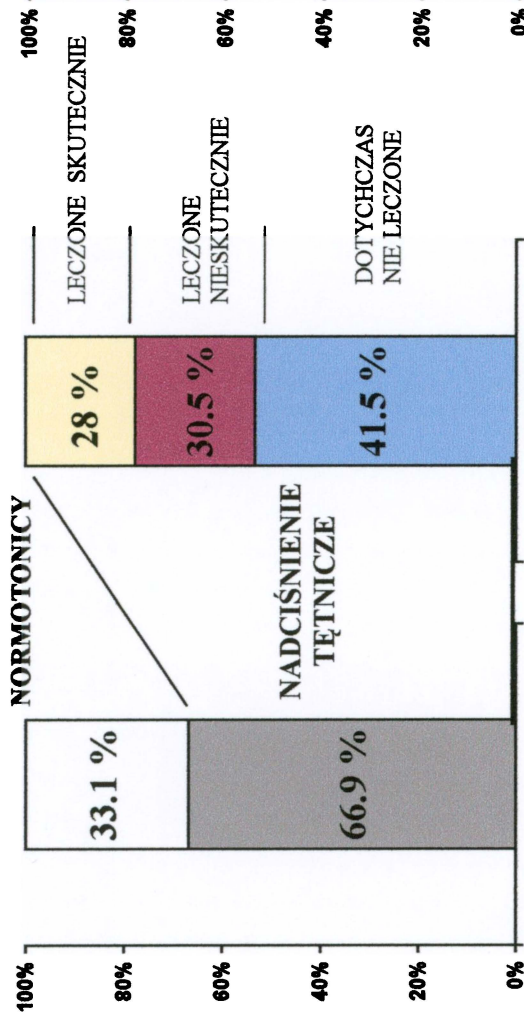
† średnia 5 pomiarów dokonanych podczas dwóch wizyt domowych

# spożycie alkoholu > 5g etanolu/dzień

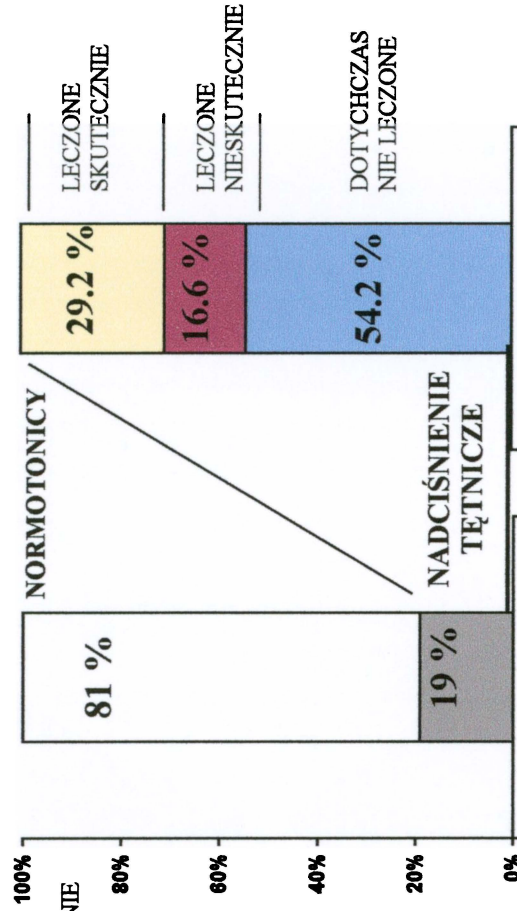


Rys. 8 Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w badanej populacji oraz skuteczność jego kontroli.

**POKOLENIE I  
(rodzice)**



**POKOLENIE II  
(potomkowie)**



## ***Parametry struktury i funkcji serca i naczyń***

Zgodę na badanie echokardiograficzne wyraziło 300 osób z badanej populacji. Z dalszych analiz wykluczono jedną osobę ze stwierdzoną upośledzoną funkcją skurczową lewej komory, dwie osoby z istotną hemodynamicznie wadą serca oraz 11 osób, u których jakość uzyskiwanego obrazu echokardiograficznego nie pozwalała na ocenę analizowanych parametrów.

Dalsze analizy przeprowadzono więc w oparciu o dane echokardiograficzne 286 osób, których charakterystykę podano w tabeli 2.

W pokoleniu rodziców obserwowano istotnie wyższe wartości masy lewej komory serca ( $198.6 \pm 53.4$  vs  $157.0 \pm 37.4$  g,  $p < 0.001$ ) oraz wskaźnika masy lewej komory serca ( $105.1 \pm 22.2$  vs  $87.0 \pm 16.2$  g/m<sup>2</sup>) w porównaniu do pokolenia dzieci. W pokoleniu I także istotnie częściej odnotowano obecność przerostu mięśnia lewej komory (23 % vs 3.4 %,  $p < 0.01$ ). W obu pokoleniach u mężczyzn obserwowano istotnie wyższe wartości masy lewej komory i wskaźnika masy lewej komory w porównaniu do kobiet (tabela 4).

Nie obserwowano istotnych różnic w funkcji skurczowej lewej komory w zależności od grupy pokoleniowej ani w zależności od płci. Stwierdzono natomiast istotne różnice w tych podgrupach w funkcji rozkurczowej lewej komory. Pokolenie rodziców charakteryzowało się istotnie niższą prędkością fali E wczesnego napełniania lewej komory ( $66.2 \pm 16.5$  vs  $85.0 \pm 15.1$  cm/s,  $p < 0.01$ ) oraz wyższą prędkością fali A późnego napełniania ( $64.5 \pm 14.0$  vs  $51.2 \pm 11.4$  cm/s,  $p < 0.05$ ). W konsekwencji w grupie osób należących do pokolenia rodziców obserwowano niższe wartości wskaźnika E/A w porównaniu do pokolenia potomków ( $1.13 \pm 0.34$  vs  $1.70 \pm 0.30$ ,  $p < 0.001$ ). W pokoleniu II nie obserwowano różnic w wartościach parametrów napływu mitralnego w zależności od płci. Natomiast w pokoleniu rodziców zauważono u kobiet istotnie wyższą prędkość fali E wczesnego napełniania oraz fali A późnego napełniania. Wskaźnik E/A był także u kobiet wyższy niż u mężczyzn (dane zestawiono w tabeli 4).

Badanie podatności naczyń obwodowych wykonano u 281 osób. Istotnie wyższe wartości PWV obserwowano w grupie starszej ( $10.5 \pm 1.6$  vs  $8.32 \pm 1.24$  m/s,  $p < 0.001$ ). W pokoleniu I podatność naczyń nie różniła się w zależności od płci, w

pokoleniu młodszym stwierdzono natomiast wyższą wartość PWV u mężczyzn niż u kobiet (tabela 4).

Grubość kompleksu intima-media tętnicy szyjnej oceniono u 281 osób. Podobnie jak w przypadku pozostałych ocenianych parametrów pokolenie I różniło się istotnie od pokolenia II grubością IMT ( $0.797 \pm 0.044$  vs  $0.569 \pm 0.027$  mm,  $p < 0.01$ ), nie obserwowano dalszych różnic w zależności od płci.

**Tabela 4 Charakterystyka badanej populacji. Parametry struktury i funkcji serca oraz naczyń z uwzględnieniem podziału na pokolenia oraz ze względu na płeć.**

	POKOLENIE I		POKOLENIE II	
	Ojcowie N=48	Matki N=73	Synowie N=82	Córki N=83
<i>Parametry echokardiograficzne</i>				
Masa lewej komory (g)	228.7 (47.0)	178.8 (48.1)***	177.2 (34.3)	137.0 (29.0)***
Wskaźnik masy lewej komory LVMl (g/m <sup>2</sup> )	113.9 (18.6)	99.3 (22.5)***	92.8 (15.8)	81.4 (14.4)***
Frakcja skracania (%)	38.1 (4.8)	40.7 (4.1)	38.9 (4.2)	35.2 (7.6)
Prędkość fali E wczesnego napełniania (cm/s)	60.1 (15.1)	68.8 (17.8)***	84.5 (16.1)	85.5 (14.7)
Prędkość fali A późnego napełniania (cm/s)	63.2 (14.0)	66.9 (14.1)*	50.1 (11.9)	51.9 (10.9)
Wskaźnik E/A	1.05 (0.3)	1.19 (0.34)*	1.73 (0.34)	1.66 (0.27)
Czas rozkurczu izowolumetrycznego (msek)	106.1 (17.6)	103.1 (20.3)	82.9 (11.0)	78.9 (13.2)
Częstość akcji serca (uderzenia/min)‡	67.9 (12.1)	70.4 (9.8)	70.8 (11.4)	72.4 (10.0)
Płzerost lewej komory serca	6 (12.5 %)	22 (30.1 %)	1 (1 %)	2 (2.4 %)
<i>Parametry struktury i funkcji naczyń</i>				
Grubość kompleksu intima-media (mm)	0.774 (0.032)	0.813 (0.05)	0.582 (0.032)	0.553 (0.019)
Prędkość fali tętna (cm/sek)	10.5 (1.4)	10.5 (1.7)	8.67 (1.13)	8.00 (1.26)*

*W tabeli przedstawione są wartości średnie (SD) lub liczebność grup (%).*

*Istotne statystycznie różnice między kobietami i mężczyznami w obrębie każdego pokolenia: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001*

‡ częstość akcji serca w trakcie badania echokardiograficznego

## **Częstość występowania genotypów polimorfizmu C825T genu podjednostki $\beta$ 3 białka G w badanej populacji**

Rozkład częstości genotypów polimorfizmu C825T podjednostki  $\beta$ 3 białka G w badanej populacji (tabela 5) był zgodny z przewidywanym według prawa Hardy-Weinberga ( $p=0.21$ ).

Grupa pacjentów z nadciśnieniem tętniczym nie różniła się w istotny sposób od grupy osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu ( $p=0.89$ ). Nie stwierdzono różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu C825T GNB3 w zależności od płci ani grupy pokoleniowej.

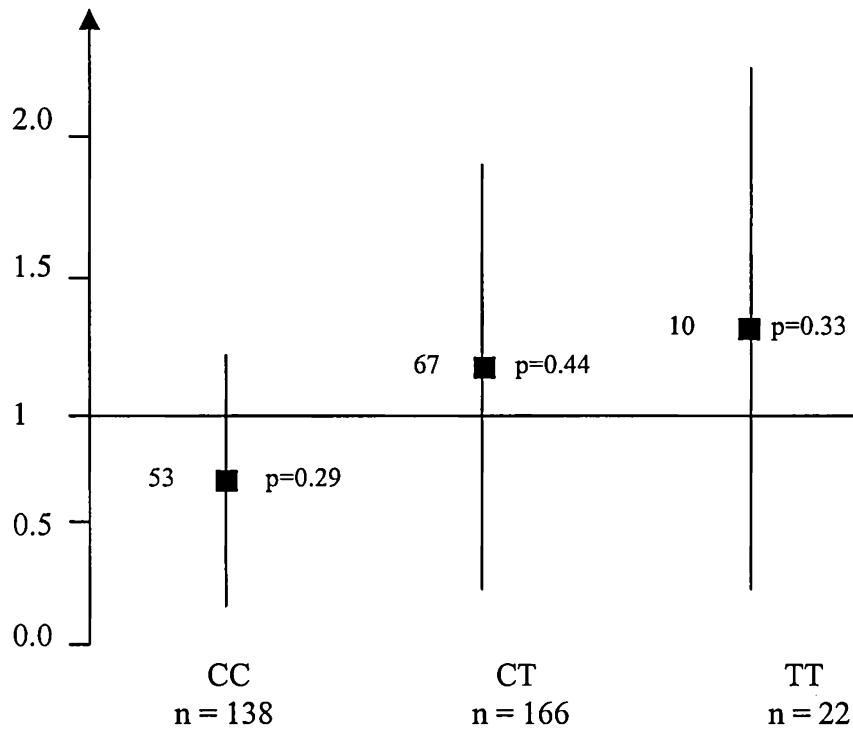
Podobną częstość mutacji 825T GNB3 obserwowano w grupie osób zrekrutowanych do badania poprzez Poradnię Nadciśnieniową i wśród osób wybranych losowo z populacji ogólnej ( $p=0.9$ ).

W analizie regresji logistycznej obliczono ryzyko względne nadciśnienia tętniczego związane z obecnością mutacji 825T GNB3. Ryzyko względne nadciśnienia tętniczego wrasta wraz z liczbą zmutowanych alleli T, do wartości 1.29 u homozygot TT chociaż wartość ta nie osiąga istotności statystycznej (dane przedstawiono na diagramie – rys 9).

*Tabela 5 Częstość rozkładu poszczególnych genotypów polimorfizmu C825T genu podjednostki β3 białka G w badanej populacji.*

	Genotyp			Allele	
	CC	CT	TT	C	T
Ogółem	138 (42.3 %)	166 (50.9 %)	22 (6.8 %)	442 (67.8 %)	210 (32.2 %)
Nadciśnienie	53 (40.8 %)	67 (51.5 %)	10 (7.7 %)	173 (66.5 %)	87 (33.5 %)
Normotonicy	85 (43.4 %)	99 (50.5 %)	12 (6.1 %)	269 (68.6 %)	123 (31.4 %)
Mężczyźni	65 (43.6 %)	75 (50.3 %)	9 (6.1 %)	205 (68.8 %)	93 (31.2 %)
Kobiety	73 (41.2 %)	91 (51.4 %)	13 (7.4 %)	237 (66.9 %)	117 (33.1 %)
<i>Pokolenie I</i>	62 (43.7 %)	70 (49.3 %)	10 (7.0 %)	194 (68.3 %)	90 (31.7 %)
<i>Pokolenie II</i>	76 (41.3 %)	96 (52.2 %)	12 (6.5 %)	248 (67.4 %)	120 (32.6 %)
Poradnia NT	51 (42.5 %)	61 (50.8 %)	8 (6.7 %)	163 (67.9 %)	77 (32.1 %)
Niepołomice	87 (42.2 %)	105 (51.0 %)	14 (6.8 %)	279 (67.7 %)	133 (32.3 %)

Rys.9 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne nadciśnienia tętniczego w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, BMI).



## **polimorfizm C825T genu podjednostki beta 3 białka G a parametry struktury i funkcji serca i naczyń – analiza asocjacji**

### **parametry demograficzne i pomiary antropometryczne**

W obu grupach pokoleniowych nie stwierdzono różnic wieku pomiędzy osobami należącymi do poszczególnych grup genotypowych badanego polimorfizmu. Wiek kobiet był porównywalny niezależnie od polimorfizmu C825T GNB3.

Nie stwierdzono także różnic między genotypami podjednostki  $\beta 3$  białka G w zakresie analizowanych parametrów antropometrycznych. Wskaźnik masy ciała, wskaźnik talia-biodra oraz grubość fałdu skórniego były porównywalne w każdym pokoleniu między poszczególnymi grupami genotypowymi (tabela 6). Podobnie, częstość występowania nadwagi i otyłości była niezależna od genotypu C825T GNB3 (tabela 6).



*Tabela.6 Parametry antropometryczne oraz częstość występowania nadwagi, otyłości i nadciśnienia tętniczego w zależności od genotypu polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w obu pokoleniach badanej populacji.*

	POKOLENIE I			POKOLENIE II		
	CC n=62	CT n=70	TT n=10	CC n=76	CT n=96	TT n=12
Wiek (lata)	49.8 (5.2)	50.6 (4.9)	51.0 (5.0)	23.2 (4.2)	24.6 (5.0)	24.3 (5.6)
Płeć (liczba kobiet (n))	33 (53 %)	45 (64.1 %)	6 (60 %)	38 (50 %)	47 (49 %)	8 (66 %)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 (5.3)	28.3 (4.0)	28.2 (6.9)	23.2 (3.6)	22.8 (3.0)	21.6 (2.6)
Nadwaga (n)	24 (38.7 %)	34 (48.6 %)	3 (30 %)	17 (22.4 %)	20 (20.8 %)	1 (8.3 %)
Otyłość (n)	26 (41.9 %)	21 (30.0 %)	3 (30 %)	2 (2.6 %)	2 (2.6 %)	0
Wskaźnik talia-biodra	0.9 (0.08)	0.89 (0.07)	0.88 (0.08)	0.80 (0.07)	0.80 (0.06)	0.80 (0.06)
Grubość fałdu skórniego (mm)	22.8 (10.0)	23.1 (8.6)	22.9 (12.7)	15.3 (7.6)	14.1 (10.3)	14.2 (6.6)
Nadciśnienie tętnicze (n)	42 (67.7 %)	46 (65.7 %)	7 (70 %)	11 (14.5 %)	21 (21.9 %)	3 (25 %)
Leczenie hipotensyjne (n)	23 (37.1 %)	26 (37.1 %)	5 (50 %)	1 (1.3 %)	6 (6.3 %)	2 (16.7 %)

*W tabeli przedstawione są wartości średnie (SD) lub liczebność grup (%).*

## Ciśnienie tętnicze krwi

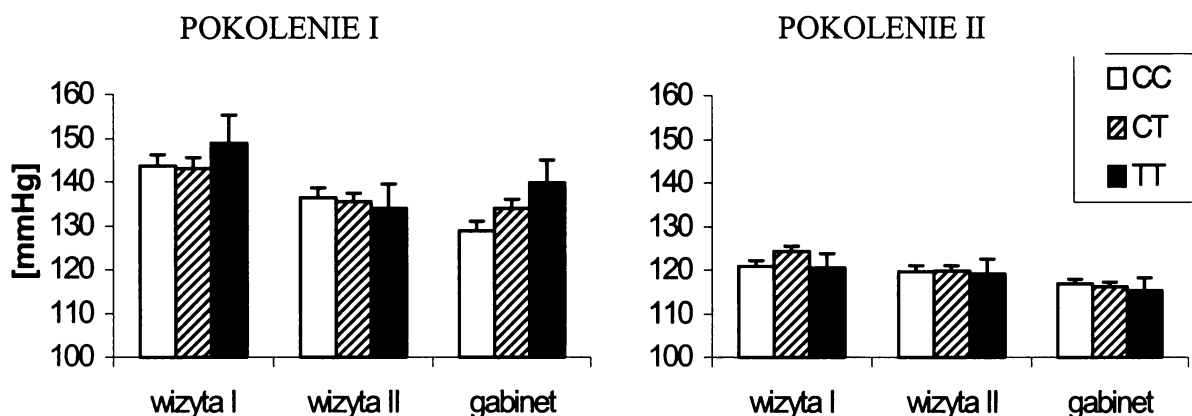
W pomiarach tradycyjnych ciśnienia tętniczego krwi nie obserwowano istotnych różnic w wysokości ciśnienia tętniczego między poszczególnymi genotypami polimorfizmu C825T GNB3 w pokoleniu potomków.

W pokoleniu rodziców stwierdzono istotnie wyższe wartości ciśnienia rozkurczowego u homozygot TT w pomiarach wykonanych w gabinecie lekarskim ( $p=0.04$ ) oraz tendencję do wyższych wartości skurczowego ciśnienia w pomiarach domowych (wyniki przedstawiono na diagramie – rys 10).

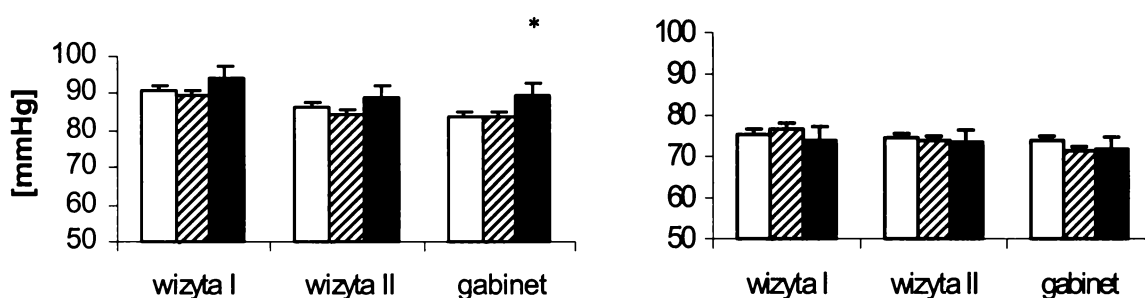
Częstość występowania nadciśnienia tętniczego oraz odsetek osób leczonych hipotensyjnie nie różniły się w zależności od genotypu C825T GNB3 w obu pokoleniach (tabela 5).

Rys.10 Ciśnienie tętnicze krwi – wyniki pomiarów tradycyjnych, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3. Na rysunku przedstawiono średnią z pięciu kolejnych pomiarów ciśnienia skurczowego z wizyt domowych oraz wizyty w gabinecie lekarskim w obydwu grupach pokoleniowych (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, stosowania leczenia hipotensyjnego, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE).

### Skurczowe ciśnienie tętnicze



### Rozkurczowe ciśnienie tętnicze



\*p < 0.05 homozygoty TT vs nosiciele allelu C

## 24-godzinne monitorowanie ciśnienia tętniczego

Wyniki 24-godzinnego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi ujawniły różnice w wartościach ciśnienia tętniczego w zależności od genotypu badanego polimorfizmu w pokoleniu rodziców (wartości testu ANOVA dla skurczowego ciśnienia z całej doby, okresu dnia oraz nocy były dla tych zmiennych na poziomie istotności  $p < 0.15$  dla trzech genotypów). Ponieważ konsekwentnie stwierdzano wyższe wartości ciśnienia wśród homozygot TT, w następnym etapie analizy porównywano wyniki homozygot TT z nosicielami allelu C, zakładając recesywny model efektu fenotypowego polimorfizmu C825T GNB3. Potwierdzono w ten sposób znamienność różnic: wyższe wartości skurczowego CTK z 24-godzin rejestracji, okresu dnia oraz nocy u homozygot TT w porównaniu z genotypami CC + CT ( $p < 0.04$  dla wszystkich zmiennych, wyniki przedstawiono na diagramach – rys 11). Różnice w wartości rozkurczowego ciśnienia między homozygotami TT a nosicielami allelu C osiągnęły znamienność dla wartości z całej doby ( $p=0.03$ ), natomiast były na granicy istotności statystycznej dla okresu dnia ( $p=0.07$ ) oraz nocy ( $p=0.08$ ).

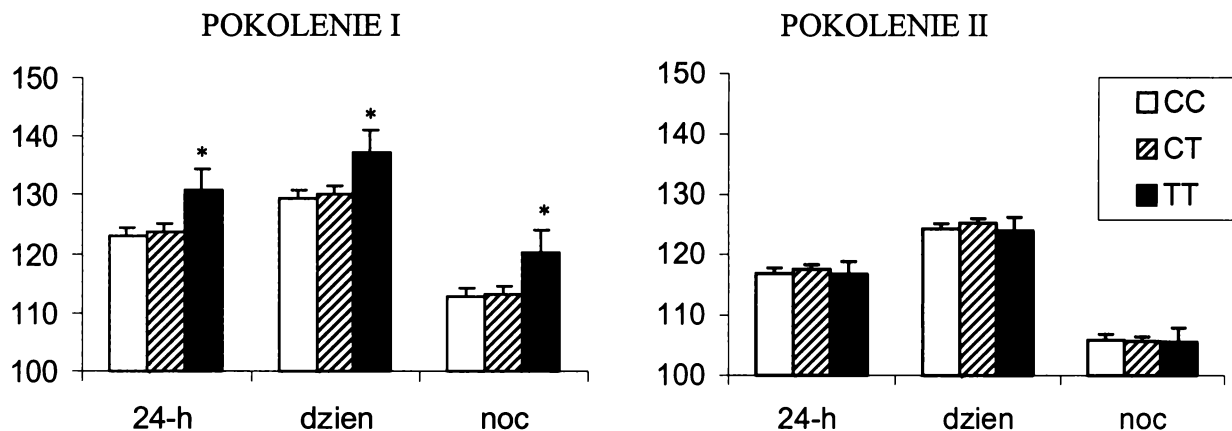
W profilu dobowym skurczowego ciśnienia tętniczego krwi w grupie rodziców istotnie wyższe wartości ciśnienia stwierdzono u homozygot TT w przedziałach czasowych: 8.00 – 10.00; 14.00 – 22.00 oraz 1.00 – 3.00. Rozkurczowe ciśnienie tętnicze było istotnie wyższe u homozygot TT w godzinach: 8.00 – 10.00; 14.00 – 16.00 i 20.00 – 21.00.

W pokoleniu potomków, podobnie jak w przypadku standardowych pomiarów ciśnienia, wyniki uzyskane w 24-godzinnej rejestracji ciśnienia nie różniły się istotnie pomiędzy genotypami polimorfizmu GNB3.

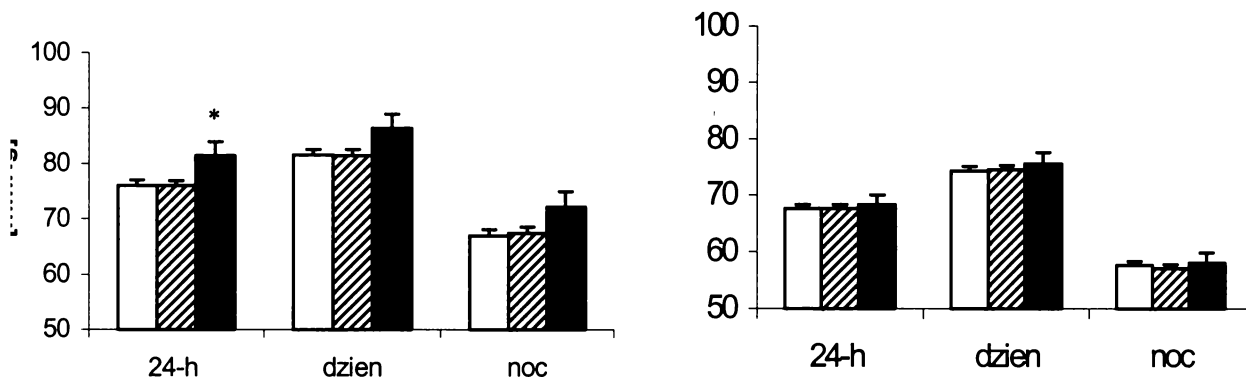
Nie stwierdzono także różnic w profilu dobowym ciśnienia między genotypami GNB3 w pokoleniu II (wykres – rys 12).

Rys.11 Ciśnienie tętnicze krwi – wyniki 24-godzinnej rejestracji ciśnienia, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, stosowania leczenia hipotensyjnego, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE).

### Skurczowe ciśnienie tętnicze z 24-godz rejestracji



### Rozkurczowe ciśnienie tętnicze z 24-godz rejestracji



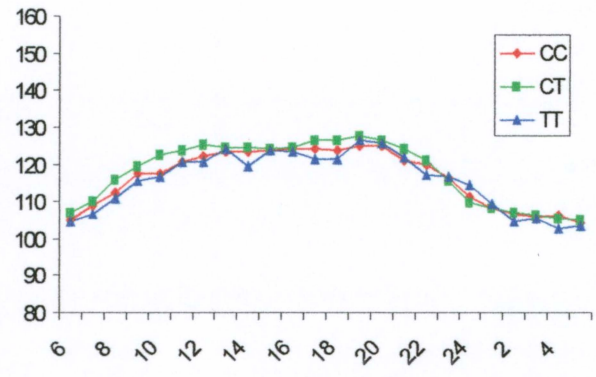
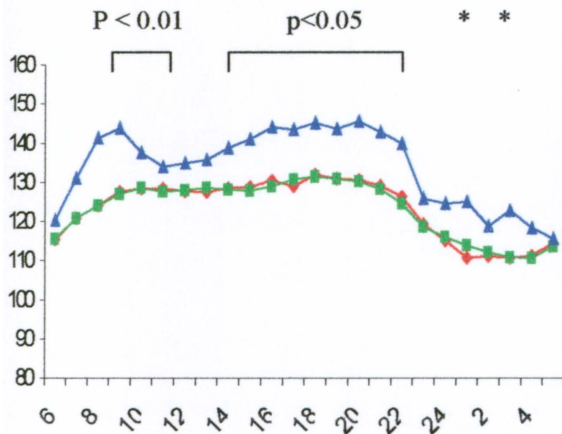
\*p<0.05 homozygoty TT vs nosiciele allelu C

Rys12. Profil dobowy ciśnienia tętniczego krwi w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.

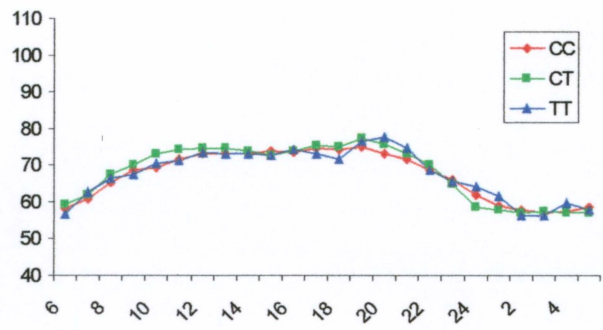
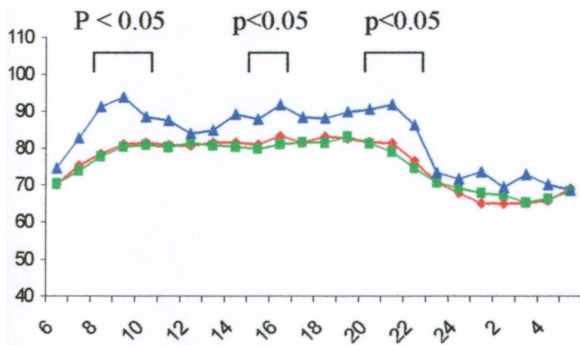
**POKOLENIE I**

**POKOLENIE II**

**Skurczowe ciśnienie tętnicze**



**Rozkurczowe ciśnienie tętnicze**



\* p<0.05 homozygoty TT vs nosiciele allelu C

### ***Spadek nocny ciśnienia tętniczego***

Analizując wielkość nocnego spadku ciśnienia tętniczego krwi w obu pokoleniach, nie stwierdzono różnic tego parametru dla ciśnienia skurczowego ani rozkurczowego, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (tabela 7).

Podobnie, liczba osób definiowanych jako „non-dippers” (*wartość spadku nocnego ciśnienia skurczowego i/lub rozkurczowego poniżej 10 %*) nie różniła się między genotypami badanego polimorfizmu (tabela 7).

### ***Zmienność ciśnienia tętniczego***

W pokoleniu rodziców obserwowano wyższe wartości zmienności ciśnienia tętniczego krwi u osób będących nosicielami allelu 825T polimorfizmu genu GNB3.

Najwyższe różnice między genotypami badanego polimorfizmu stwierdzono dla wartości odchylenia standardowego z pomiarów okresu dnia w 24-godzinnym monitorowaniu ciśnienia, zarówno dla ciśnienia skurczowego, jak i rozkurczowego. W pokoleniu I homozygoty TT wykazywały najwyższe wartości zmienności ciśnienia, heterozygoty CT pośrednie, natomiast homozygoty CC najniższe (ANOVA  $p=0.04$ , dane przedstawia tabela 7).

Nie stwierdzono różnic w analizowanych parametrach dobowej zmienności ciśnienia tętniczego w zależności od polimorfizmu GNB3 w pokoleniu II (tabela 7).

## Parametry struktury i funkcji lewej komory serca

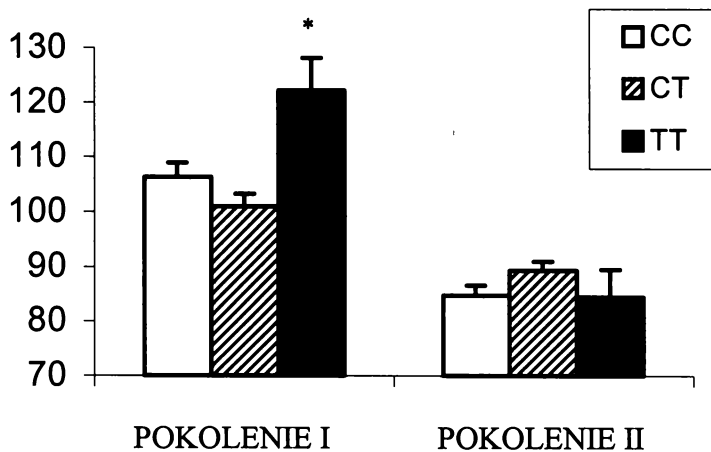
### *Masa lewej komory serca*

W pokoleniu rodziców, u homozygot TT badanego polimorfizmu GNB3 stwierdzono wyższy wskaźnik masy lewej komory serca (rysunek 13).

Częściej także wśród homozygot TT w pokoleniu starszym obserwowano występowanie przerostu lewej komory serca ( TT – 40.0 % vs CT - 19.3 % vs CC – 24.1 %), ta różnica jednak, ze względu na liczebność grupy, nie osiągnęła znamienności statystycznej.

W pokoleniu II nie obserwowano różnic masy lewej komory serca między genotypami polimorfizmu GNB3 (rysunek 13).

*Rys.13 Wskaźnik masy lewej komory serca, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, stosowania leczenia hipotensyjnego oraz skurczowego ciśnienia tętniczego, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE).*

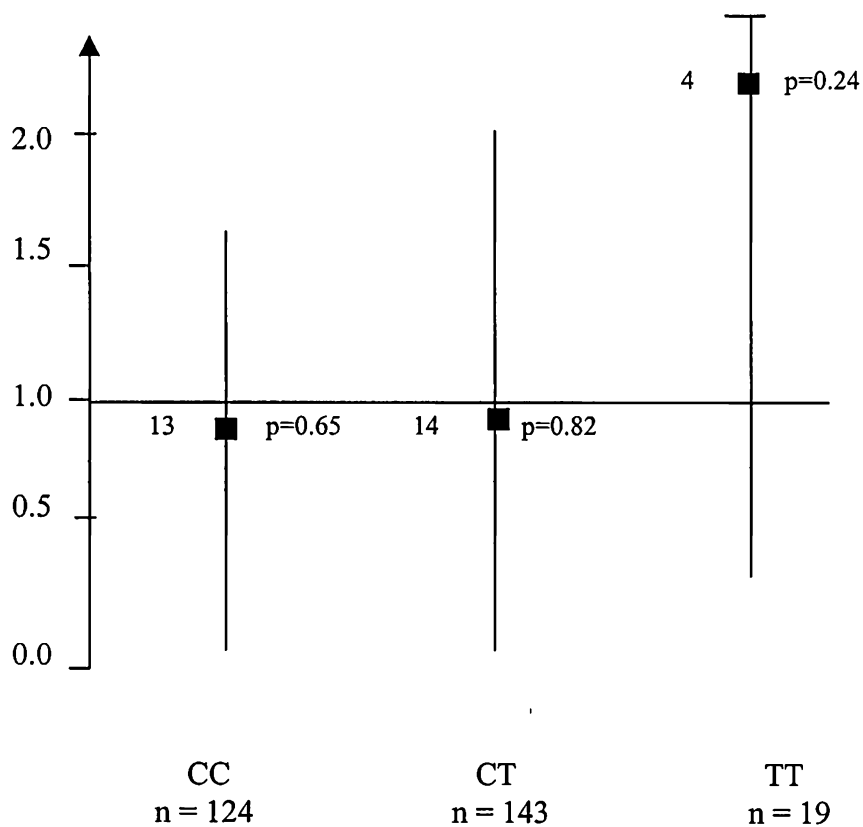


\*  $p < 0.05$  homozygoty TT vs nosiciele allelu C



Wyniki analizy regresji logistycznej w całej badanej grupie wskazują na wyższe ryzyko przerostu lewej komory serca u osób będących homozygotami T825T GNB3, chociaż ze względu na liczebność wzrost ryzyka nie osiąga znamienności statystycznej (rys 14).

*Rys.14 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne przerostu lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, BMI, skurczowego ciśnienia tętniczego).*



### *Funkcja skurczowa lewej komory serca*

W obu pokoleniach nie stwierdzono zależności frakcji skracania lewej komory od genotypu podjednostki  $\beta_3$  białka G (pokolenie I: TT –  $39.7 \pm 2.8$  %, CT –  $40.6 \pm 4.8$  %, CC –  $40.1 \pm 5.0$  %, NS; pokolenie II: TT –  $39.2 \pm 5.7$  %, CT –  $39.3 \pm 4.0$  %, CC –  $39.3 \pm 3.7$  %, NS).

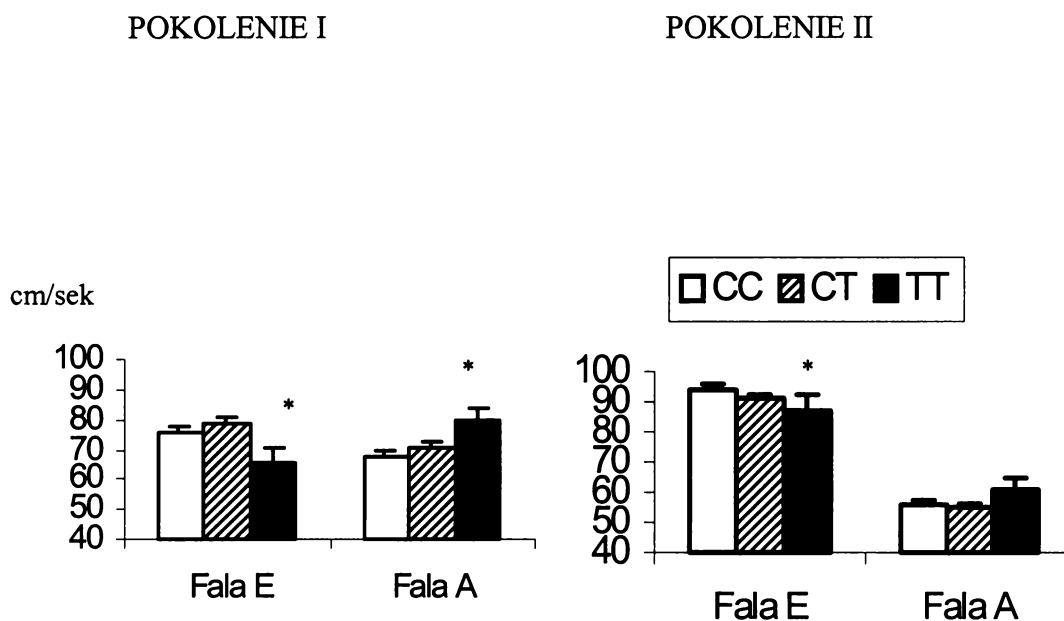
### *Funkcja rozkurczowa lewej komory serca*

W obu pokoleniach obserwowano istotną asocjację prędkości fali E wczesnego napełniania lewej komory z genotypem C825T GNB3. U osób z genotypem TT stwierdzono istotnie niższe wartości prędkości fali E niż wśród nosicieli allelu C (rysunek 15). W pokoleniu starszym obserwowano także istotnie wyższe wartości prędkości fali A późnego napełniania u homozygot TT. W pokoleniu II różnice prędkości fali A między genotypami nie osiągnęły znaczenia statystycznego (rysunek 15).

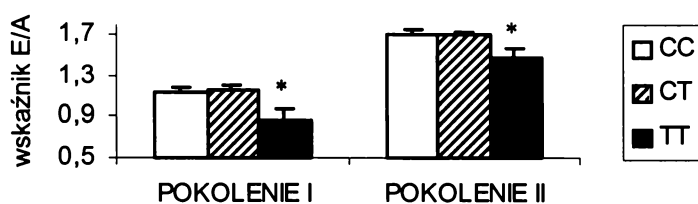
W obu pokoleniach natomiast stwierdzono istotną zależność wskaźnika E/A od genotypu C825T GNB3. Homozygoty TT charakteryzowała istotnie niższa wartość wskaźnika E/A niż nosicieli allelu C (rysunek 16).

Podobne różnice między genotypami obserwowano także dla drugiego analizowanego parametru funkcji rozkurczowej lewej komory – czasu rozkurczu izowolumetrycznego. W obu pokoleniach wartość IVTR była istotnie wyższa dla homozygot TT niż nosicieli allelu C (pokolenie I: TT –  $109.6 \pm 16.7$  msec, CT –  $103.1 \pm 14.5$  msec, CC –  $104.0 \pm 21.1$  msec,  $p=0.03$  TT vs CT+CC; pokolenie II: TT –  $90.7 \pm 9.5$  msec, CT –  $83.1 \pm 11.0$  msec, CC –  $79.8 \pm 13.2$  msec,  $p=0.04$  TT vs CT+CC).

Rys.15 Prędkość fali E i A napełniania lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 w obu pokoleniach (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, skurczowego ciśnienia tętniczego, częstości akcji serca w trakcie badania echokardiograficznego oraz stosowania leczenia hipotensyjnego, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE).



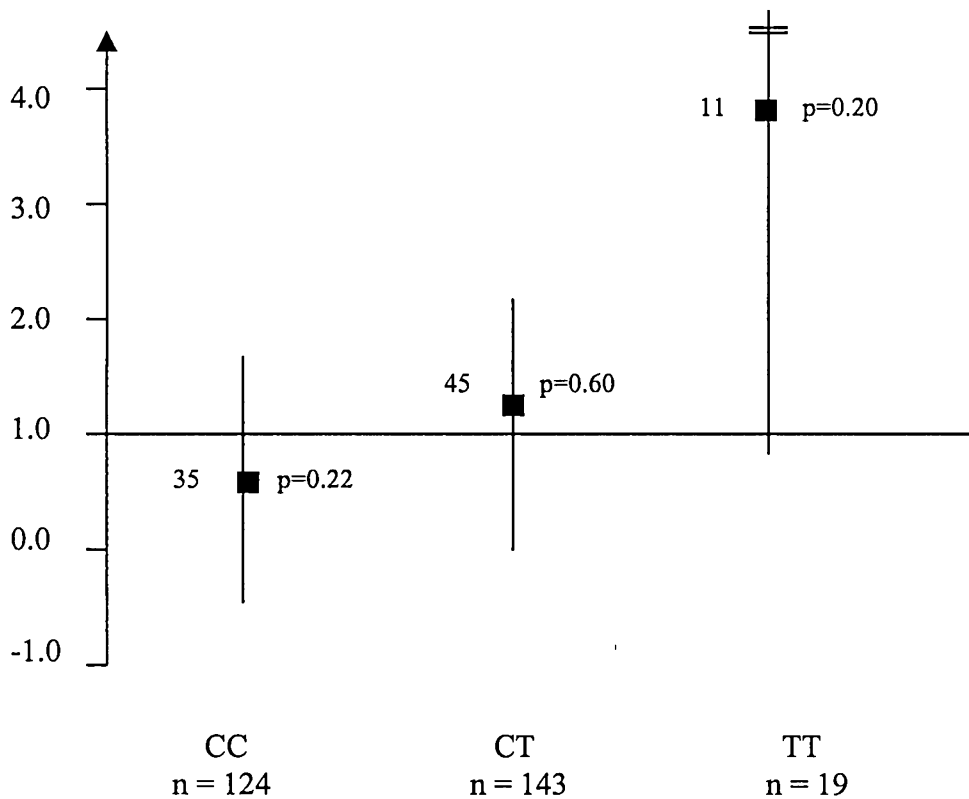
Rys.16 Stosunek prędkości fali E/A napełniania lewej komory w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, skurczowego ciśnienia tętniczego, częstości akcji serca w trakcie badania echokardiograficznego oraz stosowania leczenia hipotensyjnego, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE)



\*  $p < 0.05$  homozygoty TT vs nosiciele allelu C

Ryzyko dysfunkcji rozkurczowej lewej komory (wartość wskaźnika E/A poniżej 1.0) jest ponad trzykrotnie wyższe dla osób będących homozygotami TT polimorfizmu GNB3. Zwraca uwagę jednak szeroki przedział ufności i w związku z tym brak istotności statystycznej tego spostrzeżenia.

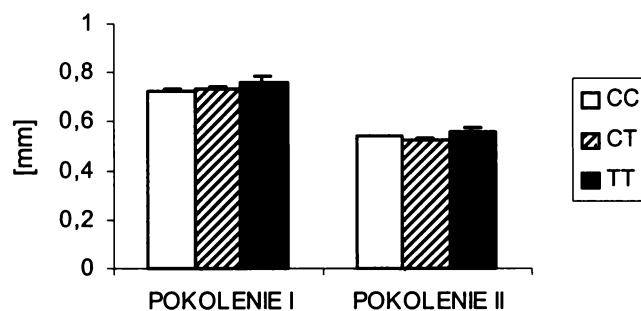
*Rys.17 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne dysfunkcji rozkurczowej lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, BMI, skurczowego ciśnienia tętniczego).*



## Parametry struktury i funkcji naczyń tętniczych

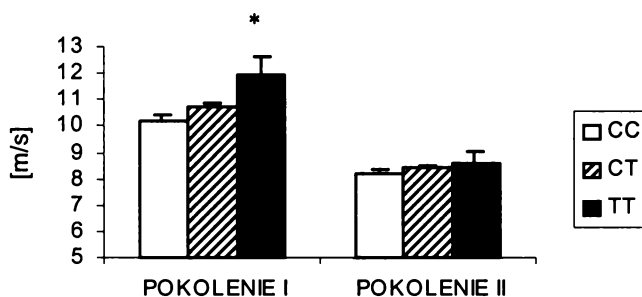
Nie stwierdzono istotnych różnic grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej wspólnej między genotypami badanego polimorfizmu (rys 18).

*Rys.18 Grubość kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, skurczowego ciśnienia tętniczego, stosowania leczenia hipotensyjnego i palenia tytoniu, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE)*



W analizie prędkości fali tętna obserwowano różnice między genotypami GNB3 tylko w pokoleniu rodziców: istotnie wyższe wartości prędkości fali tętna u homozygot TT niż u nosicieli allelu C (rys 19). W grupie osób młodszych nie stwierdzono zależności PWV od genotypu C825T GNB3.

*Rys.19 Prędkość fali tętna w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 (wartości wystandaryzowane do płci, wieku, BMI, leczenia hipotensyjnego i palenia tytoniu, słupki przedstawiają wartości średnie oraz SE)*



\*  $p < 0.05$  homozygoty TT vs nosiciele allelu C

## Test nierównowagi transmisji

W analizie TDT nie stwierdzono różnic w analizowanych parametrach struktury i funkcji układu krążenia w zależności od statusu transmisji allelu T.

Potwierdzono natomiast pozytywne wyniki analizy asocjacji w pokoleniu potomków.

Stwierdzono istotnie niższe wartości fali E wczesnego napełniania lewej komory oraz niższy wskaźnik E/A u osób z transmisją obu alleli 825T GNB3 (dane zestawiono w tabeli 8).

Tabela 8. Wyniki analizy TDT w pokoleniu II.

	MODEL ADDYTYWNY		MODEL RECESYWNY	
	n=59		n=8	
	Estymator Współczynnika regresji (SE)	p	Estymator Współczynnika regresji (SE)	p
24-godz skurczowe CTK [mmHg]	- 0.18 (1.14)	0.87	+0.23 (1.52)	0.87
24-godz rozkurczowe CTK [mmHg]	-0.57 (0.9)	0.52	-0.09 (1.05)	0.93
Skurczowe CTK – dzień [mmHg]	-0.19 (1.28)	0.94	-0.12 (1.87)	0.94
Rozkurczowe CTK – dzień [mmHg]	-0.58 (1.05)	0.58	-0.19 (1.28)	0.86
Skurczowe CTK – noc [mmHg]	-1.6 (1.32)	0.22	+0.31 (1.80)	0.86
Rozkurczowe CTK – noc [mmHg]	-1.4 (1.03)	0.17	+0.48 (1.39)	0.73
Wskaźnik masy lewej komory [g/m <sup>2</sup> ]	-2.69 (4.9)	0.58	+2.69 (4.9)	0.58
Fracja skracania lewej komory [%]	+0.62 (0.88)	0.47	-1.30 (1.63)	0.42
Prędkość fali E [cm/s]	+1.29 (2.73)	0.63	<b>-6.88 (3.19)</b>	<b>0.03</b>
Prędkość fali A [cm/s]	-0.52 (1.74)	0.76	+1.38 (2.37)	0.56
Wskaźnik E/A	+0.06 (0.08)	0.42	<b>-0.24 (0.07)</b>	<b>0.002</b>
PWV [m/s]	+0.07	0.84	+0.09	0.76
IMT [mm]	+0.004	0.96	+0.005	0.89

## Dyskusja i omówienie wyników badań

### *Częstość występowania alleli polimorficznych C825T GNB3*

Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w badanej populacji wynosiła 67.8 % dla allelu typu dzikiego oraz 32.2 % dla zmutowanego allelu 825T.

W oryginalnym, zbiorczym opracowaniu Sifferta i wsp [85], stwierdzono istotne różnice w częstości występowania mutacji 825T GNB3 w zależności od badanej grupy etnicznej i rasowej. Na podstawie wyników genotypowania 5254 osób z 55 grup etnicznych z Afryki, Ameryki, Europy, Azji, Australii i Nowej Gwinei stwierdzono najwyższą częstość występowania allelu 825T dla rasy czarnej (79 - 88 %), pośrednią dla rasy żółtej (40 - 50 %) i najniższą dla rasy białej (24 - 35 %). W Europie, najniższą częstość występowania allelu T (21-25 %) obserwowano w Rosji [85; 83] i Finlandii [85, 89]; natomiast w populacji Niemiec [87, 78, 80, 73], Francji [11], Irlandii [11], Hiszpanii [67; 68] i Włoch [82] allel T występował z częstością 30 – 34 %.

Częstość występowania zmutowanego allelu 825T GNB3 w badanej populacji regionu krakowskiego była więc bardzo zbliżona do wyników uzyskanych dla innych populacji europejskich.

Dane z niniejszej pracy trudno jednak odnieść do wyników dystrybucji genotypów C825T GNB3 z innych regionów geograficznych Polski. Dotychczas ukazały się bowiem tylko dwie publikacje dotyczące polimorfizmu genu podjednostki  $\beta 3$  białka G pochodzące z ośrodków polskich, obie jednak dotyczyły związku polimorfizmu GNB3 z cukrzycą typu 2 i były oparte na badaniach tej wybranej grupy chorych [23, 106]. W pracy Dzidy i wsp [23] z ośrodka lubelskiego częstość allelu 825T GNB3 obliczona na podstawie genotypów 172 osób z cukrzycą typu 2 wynosiła 35 % i była istotnie wyższa niż w grupie osób zdrowych (28 %). W drugiej pracy [106] oceniano związek zmienności allelicznej GNB3 z rozwojem powikłań cukrzycy typu 2. Częstość występowania allelu 825T w tej grupie chorych z regionu Górnego Śląska wynosiła 32.2 %.



### ***Polimorfizm C825T podjednostki $\beta$ 3 białka G a nadciśnienie tętnicze***

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia. Podobnie, odsetek osób z nadciśnieniem nie różnił się znamienne między poszczególnymi genotypami polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta$ 3 białka G. Ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego w badanej grupie rosło z obecnością zmutowanego allelu T, ale nie osiągnęło poziomu istotności statystycznej.

Związek polimorfizmu podjednostki  $\beta$ 3 białka G z nadciśnieniem tętniczym został po raz pierwszy wykazany dla populacji niemieckiej, w której dla nosicieli zmutowanego allelu 825T stwierdzono względne ryzyko nadciśnienia tętniczego na poziomie 1.44 (95 % CI 1.09 – 1.88,  $p=0.02$ ) [87].

W późniejszych publikacjach wyniki analiz asocjacji polimorfizmu genu podjednostki  $\beta$ 3 białka G z nadciśnieniem tętniczym były jednak niejednoznaczne.

Obok prac potwierdzających silny związek mutacji 825T GNB3 z rozwojem nadciśnienia tętniczego, pojawiły się doniesienia negujące taką zależność.

Beige i wsp [6] objęli badaniem genetycznym 479 pacjentów z utrwalonym nadciśnieniem tętniczym i 1000 osób z populacji ogólnej Niemiec. Autorzy stwierdzili istotny wzrost ryzyka nadciśnienia u nosicieli allelu T GNB3 (odds ratio 1.5,  $p=0.01$ ), nie obserwowali jednak zależności wysokości ciśnienia od genotypu badanego polimorfizmu.

W grupie ponad dwóch tysięcy uczestników programu epidemiologicznego MONICA również potwierdzono związek nadciśnienia tętniczego z genotypem C825T GNB3 [36]. Częstość występowania nadciśnienia tętniczego była istotnie wyższa w grupie homozygot TT niż homozygot CC (41.8 % vs 32.5 %,  $p=0.02$ ). Zwraca także uwagę fakt, że w grupie homozygot TT był najwyższy odsetek pacjentów z ciężkim nadciśnieniem - zdefiniowanym przez autorów jako rozkurczowe CTK > 105 mmHg (TT – 14.4 % vs CT – 7.3 % vs CC 4.9 %,  $p=0.002$ ).

Ryzyko względne nadciśnienia związane z homozygotycznością TT polimorfizmu C825T GNB3 zostało tu oszacowane na 1.51 i było istotnie wyższe niż dla nosicieli allelu C ( $p<0.05$ ).



Badania osób rasy białej w Australii, wykazały istotne różnice w rozkładzie genotypów polimorfizmu podjednostki  $\beta 3$  białka G między osobami z nadciśnieniem tętniczym i obciążeniem nadciśnieniem ze strony obojga rodziców (allel 825T - 43 %), a normotonikami, bez wywiadu rodzinnego chorób układu krążenia (allel 825T – 25 %,  $p < 0.001$  dla różnicy między badanymi grupami) [7].

W przeciwieństwie do cytowanych wyżej badań, w pracy Brand i wsp [11] opartej na ocenie genotypów uczestników badania PEGASE i ECTIM we Francji i Irlandii, nie stwierdzono różnic w częstości występowania mutacji 825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w grupie chorych na nadciśnienie w porównaniu do osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia.

Nie obserwowano także związku polimorfizmu GNB3 z nadciśnieniem tętniczym w populacji fińskiej, w kohorcie 903 osób poddanych czteroletniej obserwacji [89].

Ponieważ na podstawie wcześniej opublikowanych badań można było przypuszczać, że polimorfizm GNB3 odgrywa rolę jedynie u chorych z ciężkim nadciśnieniem, podjęto próbę oceny genotypów podjednostki  $\beta 3$  białka G wśród osób hospitalizowanych z powodu kryzy nadciśnieniowej [12]. Nie potwierdzono jednak różnic w rozkładzie genotypów między badaną grupą chorych z nadciśnieniem, a dobraną według płci i wieku jednakowo liczebną grupą normotoników.

Podobnie jak dla rasy kaukaskiej, wyniki badań asocjacji polimorfizmu podjednostki  $\beta 3$  białka G z nadciśnieniem nie są także jednoznaczne w innych grupach etnicznych. Wśród osób rasy czarnej, w stosunkowo dużym badaniu przekrojowym w USA, nie stwierdzono związku polimorfizmu GNB3 z nadciśnieniem tętniczym [49], podczas gdy taką asocjację obserwowano w badaniu Dong i wsp przeprowadzonym w grupie czarnoskórych pacjentów z Wielkiej Brytanii [21].

W populacji japońskiej, częstość występowania allelu T w grupie z nadciśnieniem tętniczym była istotnie wyższa niż u normotoników (63 % vs 56 %,  $p=0.04$ ) w badaniu Tozawy [95], czego nie obserwowano (odpowiednio: 49.6 % vs 49.0 %, NS) we wcześniejszym badaniu Kato i wsp. [43].

Rozbieżności wyników przytoczonych prac potwierdzają tezę, że złożony, wielogenowy charakter nadciśnienia tętniczego utrudnia wykrycie wariantów allelicznych związanych z jego dziedziczeniem. Podkreśla się obecnie fakt, że badania oparte na analizie zależności pomiędzy polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP) a występowaniem nadciśnienia tętniczego są obarczone ryzykiem błędu wynikającego z częstego występowania mutacji SNP w genomie i możliwością

wykrycia przypadkowego związku. Co więcej, często nawet analizy dużych grup populacyjnych w aspekcie wpływu czynników genetycznych na ciśnienie tętnicze nie dostarczają powtarzalnych wyników w związku ze względnie małym udziałem poszczególnych, pojedynczych mutacji w zmienności ciśnienia na poziomie populacji. Stąd, wobec świadomości wielogenowego charakteru nadciśnienia, w prowadzonych badaniach należy poszukiwać nie tylko związku danego czynnika genetycznego z utrwalonym nadciśnieniem, ale także, traktując ciśnienie tętnicze jaką zmienną ciągłą, ważne jest poszukiwanie asocjacji z wartościami ciśnienia.

### ***Polimorfizm C825T podjednostki $\beta$ 3 białka G a wartość, rytm dobowy i zmienność ciśnienia tętniczego krwi***

W badanej populacji nie stwierdzono istotnych różnic między genotypami polimorfizmu GNB3 w tradycyjnych pomiarach ciśnienia sfigmomanometrem ręciowym. Różnice zależne od genotypu ujawniono dopiero oceniając parametry 24-godzinnej rejestracji ciśnienia. Wyniki tej analizy wskazują na różną rolę polimorfizmu podjednostki  $\beta$ 3 białka G w regulacji ciśnienia tętniczego w poddanych analizie dwóch grupach pokoleniowych. Wpływ polimorfizmu C825T na wartości dobowego ciśnienia tętniczego był tu zależny od wieku i zauważalny tylko w starszej grupie pokoleniowej. U osób homozygotycznych pod względem zmutowanego allelu 825T w pokoleniu rodziców obserwowano wyższe wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w 24-godzinnym monitorowaniu.

Porównanie wyników własnego badania z innymi opublikowanymi dotychczas napotyka na trudność polegającą na odmiennej metodyce badania. Wyniki prac oceniających związek polimorfizmu C825T GNB3 z ciśnieniem tętniczym są oparte przeważnie na tradycyjnych pomiarach ciśnienia. Metoda 24-godzinnej rejestracji, chociaż pozwala na dokładniejszą ocenę wartości ciśnienia oraz ocenę jego rytmu dobowego i zmienności, jest znacznie bardziej kosztowna i stosunkowo rzadko stosowana w badaniach dużych grup populacyjnych.

Ocenę dobowych wartości ciśnienia w zależności od genotypu C825T GNB3 przeprowadzono w Japonii, w grupie 352 osób z populacji ogólnej - uczestników *Ohasama Study* [38]. Nie stwierdzono tu różnic między genotypami badanego polimorfizmu a wartościami dobowego skurczowego ani rozkurczowego ciśnienia tętniczego. Autorzy nie analizowali innych parametrów ABMP jak rytm dobowy czy

zmiennosc ciśnienia. Należy jednak podkreślić, że porównanie wyników badań asocjacji tych samych polimorfizmów z ciśnieniem tętniczym w różnych grupach rasowych należy traktować z dużą ostrożnością. Zasadniczą różnicą między badaniem własnym, a cytowanym japońskim jest bowiem częstość występowania zmutowanego allelu 825T w badanych populacjach: istotnie wyższa dla rasy żółtej (51.5 % w Ohasama Study vs 32.2 % w badaniu własnym).

W populacjach europejskich, metodę 24-godzinnej rejestracji ciśnienia stosowano w cytowanej już wyżej pracy Beige i wsp [6]. Monitorowanie ciśnienia wykonano w grupie 479 pacjentów z nadciśnieniem, odstąpiono natomiast od tej metody oceny ciśnienia tętniczego w grupie normotoników. ABPM posłużyło tu wyłącznie do weryfikacji rozpoznania nadciśnienia tętniczego i wykluczenia z grupy badanej osób z nadciśnieniem białego fartucha. Pomimo potwierdzenia asocjacji zmienności allelicznej GNB3 z nadciśnieniem tętniczym, autorzy tej publikacji nie wykazali różnic dobowych wartości ciśnienia między genotypami wśród hipertoniczków.

W pracy Jacobi i wsp [39] także scharakteryzowano fenotyp ciśnienia tętniczego z wykorzystaniem ABPM. Badaniu poddano jednak małą grupę 34 chorych z łagodnym nadciśnieniem tętniczym, obserwując tendencję do wyższych wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia wśród nosicieli allelu 825T GNB3.

W badaniu własnym, oprócz wyższych wartości ciśnienia, obserwowano także istotnie wyższą zmienność ciśnienia w grupie homozygot TT w starszej grupie pokoleniowej. Zmienność ciśnienia jest istotnym czynnikiem, który niezależnie od podwyższonej wartości ciśnienia, wpływają na rozwój się szkód narządowych [28]. W piśmiennictwie nie ukazały się dotychczas żadne prace na temat związku zmienności allelicznej podjednostki  $\beta 3$  białka G ze zmiennością ciśnienia.

Uzyskane w przeprowadzonym badaniu wyniki oceny zmienności ciśnienia u homozygot TT dopełniają informacje o wpływie polimorfizmu GNB3 na ciśnienie tętnicze, stanowiąc podłoże tezy o udziale tego czynnika genetycznego w regulacji ciśnienia.

Na szczególną uwagę zasługują, podkreślane już wcześniej, różnice w obserwowanym, zależnym od wieku, wpływie polimorfizmu podjednostki  $\beta 3$  białka G na ciśnienie tętnicze. Analiza przyczyny tego zjawiska, przy założeniu istotnej roli GNB3 w regulacji ciśnienia, wykracza poza ramy tego opracowania. Wydaje się

jednak, że prawdopodobnym wytłumaczeniem braku wpływu polimorfizmu GNB3 na wartości ciśnienia w młodszej grupie wiekowej, może być obecność w młodszym wieku sprawnie funkcjonujących fizjologicznych mechanizmów kompensujących (jak np. nerkowe wydalanie sodu czy duża podatność naczyń obwodowych), niwelujących zależny od tego czynnika genetycznego wzrost ciśnienia. Wraz z wiekiem możliwości kompensacyjne ulegają ograniczeniu i może się ujawniać, obserwowany w niniejszym badaniu, niekorzystny wpływ czynnika genetycznego.

### ***Polimorfizm C825T podjednostki $\beta$ 3 białka G a struktura i funkcja lewej komory serca***

Ze względu na postulowany udział polimorfizmu podjednostki  $\beta$ 3 białka G w proliferacji kardiomiocytów [87], masa lewej komory serca stanowi bardzo istotny parametr w ocenie znaczenia klinicznego tego czynnika genetycznego.

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono wyższe wartości masy lewej komory i jej wskaźnika w pokoleniu starszym, u osób homozygotycznych pod względem zmutowanego allelu 825T GNB3. Różnica ta pozostała także istotna po standaryzacji względem ciśnienia tętniczego. Sugeruje to niezależny od wartości ciśnienia wpływ zmienności allelicznej GNB3 na parametry struktury lewej komory serca w starszym pokoleniu.

Pierwsze dane oceniające strukturę lewej komory w zależności od polimorfizmu GNB3 pochodzą z cytowanej już pracy Jacobi i wsp [39]. W niewielkiej grupie – 34 hipertoniców - oceniano tu ciśnienie tętnicze oraz strukturę i funkcję lewej komory serca. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic masy lewej komory między genotypami.

Pozytywny wynik asocjacji allelu 825T genu podjednostki  $\beta$ 3 białka G uzyskano natomiast w pracy Pocha i wsp [67]. U nosicieli allelu 825T stwierdzono większy wymiar końcowo-rozkurczowy lewej komory, większą grubość tylnej ściany lewej komory oraz wyższy wskaźnik masy lewej komory w porównaniu do homozygot CC. Ryzyko względne przerostu lewej komory serca oszacowano na 3.03 dla nosicieli allelu T przy szerokim 95 % przedziale ufności: 1.14 – 8.05. W badaniu własnym ryzyko przerostu lewej komory było wyższe, ale jedynie dla homozygot TT i przy wartości 2.4 - nie znamienne statystycznie.

W pracy autorów włoskich oceniano masę lewej komory serca w grupie 207 młodych chorych (średni wiek  $31.8 \pm 9.6$ ), z łagodnym i nie leczonym dotychczas nadciśnieniem tętniczym [81]. U nosicieli allelu 825T stwierdzono większą grubość tylnej ściany lewej komory i istotnie wyższy wskaźnik masy lewej komory ( $95.1 \pm 15.2$  vs  $89.7 \pm 14.6$  g/m<sup>2</sup> dla homozygot CC). Ponieważ masa lewej komory pozostawała w badanej grupie w zakresie wartości prawidłowych, ryzyko związane z allelem 825T określono dla wyższych wartości LVMI (najwyższy kwartył LVMI), a nie dla przerostu lewej komory. Ryzyko podwyższenia wskaźnika masy lewej komory serca było czterokrotnie większe dla nosicieli mutacji 825T GNB3 niż homozygot CC (OR 4.1, 95% CI 1.6 – 10.3, p=0.003).

Odmienne wyniki przedstawiono natomiast w publikacji Shlyakhto i wsp [83]. W grupie 135 pacjentów z pierwotnym, łagodnym i umiarkowanym nadciśnieniem tętniczym nie stwierdzono różnic w wartościach LVMI pomiędzy poszczególnymi genotypami GNB3, przy czym obserwowano jednocześnie nieznacznie wyższą częstość allelu 825T wśród pacjentów z przerostem lewej komory niż u osób bez przerostu (odpowiednio 32 % vs 28%).

Największym badaniem dotyczącym wpływu polimorfizmu GNB3 na parametry struktury i funkcji lewej komory serca jest publikacja Sedlacka i wsp oparta na danych echokardiograficznych 1720 uczestników populacyjnego badania MONICA w Niemczech [80]. W pracy tej (przy dużej mocy statystycznej badania) nie stwierdzono asocjacji polimorfizmu GNB3 z żadnym z analizowanych parametrów struktury lewej komory serca. Duża liczebność grupy pozwoliła także na analizę relacji polimorfizmu GNB3 z masą lewej komory w różnych podgrupach: nadciśnieniowców i normotoników, osób poniżej i powyżej 55 roku życia, u kobiet i mężczyzn, osób otyłych i z prawidłowym BMI. Podział badanej populacji na mniejsze, bardziej jednorodne grupy, także nie ujawnił różnic masy lewej komory serca między genotypami polimorfizmu GNB3. W analizie regresji wieloczynnikowej nie stwierdzono istotnego udziału genotypu GNB3 w kształtowaniu fenotypu końcowego jakim jest masa lewej komory.

W badaniu własnym stwierdzono wpływ zmienności allelicznej GNB3 na parametry funkcji rozkurczowej lewej komory. W obu pokoleniach, u homozygot TT stwierdzono istotnie niższe wartości prędkości fali E wczesnego napełniania lewej

komory oraz wskaźnika E/A. Pozytywne wyniki analizy asocjacji potwierdzono także w modelu recesywnym testu nierównowagi transmisji (TDT).

Wyniki własnego badania korespondują z rezultatami Jacobi i wsp. [39], którzy u nosicieli allelu 825T obserwowali niższe wartości prędkości fali E wczesnego napełniania i wyższe fali A późnego napełniania, w konsekwencji istotne obniżenie wskaźnika E/A.

W przytaczanych już badaniach Shlyakhato i wsp [83] oraz Sedlacka [80], nie potwierdzono jednak wpływu genotypu C825T GNB3 na parametry profilu napływu mitralnego opisujące funkcję rozkurczową lewej komory.

Stwierdzenie w niniejszej pracy związku polimorfizmu genu podjednostki  $\beta 3$  białka G z czynnością rozkurczową lewej komory jest obserwacją bardzo ciekawą. Trzeba zauważyć, że wyniki analizy asocjacji w starszej grupie pokoleniowej są bardzo spójne. Homozygoty TT cechuje bowiem wyższe ciśnienie tętnicze oraz większa masa lewej komory, co może tłumaczyć obserwowaną również upośledzoną relaksację lewej komory. Pewnym zaskoczeniem było jednak istotne obniżenie prędkości fali E wczesnego napełniania i wskaźnika E/A u homozygot TT w pokoleniu młodszym, w którym wartości ciśnienia i parametry struktury lewej komory nie wykazywały zależności od analizowanego czynnika genetycznego. Należy jednak podkreślić, że w młodszej grupie pokoleniowej wartości średnie wskaźników czynności rozkurczowej lewej komory zarówno u homozygot TT, jak i nosicieli dzikiego allelu C, pozostają w granicach norm podawanych przez Spirito i wsp [90]. Wyjaśnienie mechanizmów i ocena znaczenia klinicznego wpływu polimorfizmu GNB3 na relaksację lewej komory u osób młodych wymaga potwierdzenia zarówno w badaniach z dziedziny nauk podstawowych, jak i badaniach klinicznych z odległą obserwacją.

## ***Polimorfizm C825T podjednostki $\beta$ 3 białka G a struktura i funkcja naczyń tętnicznych***

W wykonanym badaniu nie stwierdzono różnic grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej wspólnej między poszczególnymi genotypami polimorfizmu C825T GNB3. Podobne wyniki uzyskał w populacji japońskiej Ishikawa i wsp [38], nie obserwując zależności między polimorfizmem GNB3 a grubością kompleksu intima –media tętnicy szyjnej wspólnej.

Niniejsze badanie wskazuje natomiast na istotny wpływ zmienności allelicznej C825T GNB3 na podatność naczyń. Podwójna mutacja 825T w pokoleniu starszym istotnie wiązała się z większą prędkością szyjno-udowej fali tętna, będącą wykładnikiem większej sztywności naczyń tętnicznych.

W świetle uzyskanych wyników, trudno jednoznacznie ocenić, które ze zmian w układzie krążenia obserwowanych u osób homozygotycznych 825TT pojawiają się wcześniej: wzrost ciśnienia tętniczego krwi czy zwiększenie sztywności dużych tętnic. W tym przypadku trudno jest bowiem odróżnić następstwa od przyczyn: związek między ciśnieniem tętniczym, a sztywnością tętnic jest bezpośredni. Wysokie ciśnienie w tętnicy powoduje zmiany strukturalne, przebudowę włóknistą i wzrost sztywności naczynia, ta z kolei implikuje wzrost skurczowego ciśnienia tętniczego. Zależność ma charakter błędnego koła [69, 30].

W dotychczas opublikowanych pracach brak jest danych na temat związku polimorfizmu podjednostki z podatnością naczyń tętnicznych

## ***Potencjalne mechanizmy wpływu polimorfizmu C825T podjednostki $\beta$ 3 białka G na ciśnienie tętnicze oraz parametry struktury i funkcji serca oraz naczyń***

Podstawową zasadą projektowania badań klinicznych nad rolą czynników genetycznych w patogenezie różnych jednostek chorobowych uwarunkowanych wielogenowo jest poszukiwanie asocjacji badanego czynnika genetycznego z fenotypem, z którym czynnik genetyczny jest związany na drodze patofizjologii.

Należy z drugiej strony pamiętać, że stwierdzenie asocjacji nie dowodzi w żadnym stopniu związku przyczynowego.

Podobnie, obserwacje dokonane w niniejszej pracy są obserwacjami epidemiologicznymi i nie mają za zadanie wyjaśnienia bezpośredniego związku

przyczynowo- skutkowego. Interpretacja przyczyn obserwowanych związków może być jedynie oparta o wyniki dotychczasowych publikacji z dziedziny nauk podstawowych: biologii molekularnej czy farmakologii, a ostateczna weryfikacja rzeczywistej patofizjologicznej roli wariantów genu podjednostki  $\beta 3$  białka G przekracza możliwości i założenia tego projektu. Trzeba jednak zaznaczyć, że nawet częściowe przenoszenie wiedzy i obserwacji z badań na zwierzętach bezpośrednio do wyjaśnienia zjawisk ujawnianych w badaniach ludzi może być obarczone dużym błędem. Z drugiej strony, potwierdzone w kilku populacjach, pozytywne wyniki asocjacji danego wariantu polimorficznego z określonym fenotypem, pozwalają na pełniejsze zrozumienie patofizjologicznego znaczenia zmienności allelicznej określonego genu i na ukierunkowanie badań podstawowych w celu weryfikacji tych obserwacji.

O ile bowiem efekt fenotypowy allelu 825T GNB3 na poziomie komórkowym został dość dobrze poznany – jest nim zwiększona aktywność białka  $G_i$ , o tyle mechanizm patogenetyczny łączący wzmocnienie transdukcji sygnału przez błonę komórkową z wystąpieniem podwyższonego ciśnienia tętniczego nie jest jasno sprecyzowany.

Jedną z przyjmowanych hipotez jest zwiększona aktywność wymiennika jonowego sodowo-protonowego [NHE] u nosicieli mutacji 825T [87]. Występujący powszechnie w błonach komórkowych NHE pośredniczy w elektroobojętnej wymianie zewnątrzkomórkowych jonów sodowych na wewnątrzkomórkowe jony wodorowe. Izoformy NHE spełniają ważną rolę w procesie reabsorpcji sodu w cewkach nerkowych, zwłaszcza w ich części proksymalnej, ale także w dystalnej części nefronu [4]. Zwiększona aktywność NHE może być jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój nadciśnienia, gdyż powoduje zwiększenie zawartości sodu w organizmie i hiperwolemię [74]. Obserwacje kliniczne dostarczają danych dla poparcia tej tezy. Zeltner i wsp [105] w grupie młodych normotoników i młodych osób z łagodnym nadciśnieniem tętniczym zaobserwował, że nosiciele allelu 825T cechuje większa szybkość zwrotnej resorpcji sodu w kanalikach nerkowych niż homozygoty CC. W pracy Schunkerta i wsp opartej na badaniu osób z populacji ogólnej stwierdzono obniżenie aktywności reninowej osocza u nosicieli allelu 825T GNB3 [79]. Turner i wsp stwierdził natomiast większy o 5-6 mmHg spadek ciśnienia tętniczego w odpowiedzi na leczenie diuretykiem u homozygot TT niż homozygot typu CC [96].



W badaniu własnym nie stwierdzono jednak - jak można się spodziewać przy wzroście ciśnienia zależnym od przeciążenia objętościowego - różnicy w wymiarze końcowo-rozkurczowym lewej komory między genotypami GNB3.

Innym wytłumaczeniem wzrostu ciśnienia zależnego od polimorfizmu C825T podjednostki  $\beta_3$  białka G jest zwiększona aktywność układu współczulnego. Mutacja 825T GNB3 może prowadzić do podwyższenia ciśnienia poprzez zwiększoną przezłonową transdukcję sygnału związaną z receptorami adrenergicznymi  $\alpha$  i  $\beta$  [24]. Pośrednich dowodów potwierdzających takie przypuszczenie dostarczają badania Fossuma i wsp. [27]. U osób będących nosicielami mutacji punktowych w obrębie receptorów  $\alpha_{2a}$  i  $\beta_2$  (prowadzących także do zwiększonej aktywacji mediowanego sygnału), autorzy stwierdzili wyższy poziom katecholamin we krwi w odpowiedzi na stres. Rolę polimorfizmu GNB3 w autonomicznej regulacji układu krążenia podkreślił też Tabara i wsp [93], którzy obserwowali tendencję do hipotonii ortostatycznej zależną od genotypu C825T.

Obserwacje innych autorów dostarczają danych o relacji między mutacją w obrębie genu podjednostki  $\beta_3$  białka G a oporem obwodowym, która w tym mechanizmie prowadzi do podwyższenia ciśnienia tętniczego. Wzrost oporu obwodowego może być zależny zarówno od napięcia ściany naczyniowej, jak i od jej strukturalnej przebudowy. W pracy Meirhaeghe i wsp [54] stwierdzono, że odpowiedź tętnic wieńcowych na czynniki naczynioskurczowe jest u nosicieli allelu 825T GNB3 znacznie wyższa niż u homozygot CC. Podobne wyniki uzyskali Baumgart i wsp [5], obserwując większe upośledzenie przepływu w tętnicach wieńcowych po aktywacji receptorów  $\alpha_2$  u nosicieli allelu 825T. Wzmoczona wazokonstrykcja w odpowiedzi na endotelinę-1, angiotensynę II oraz noradrenalinę charakteryzowała także nosicieli allelu 825T GNB3 w grupie młodych normotoników w badaniu Wenzela i wsp [102].

U osób będących nosicielami mutacji 825T GNB3 może także dochodzić do silniejszej odpowiedzi proliferacyjnej mięśniówki gładkiej. Proliferacja miocytów błony środkowej naczyń w odpowiedzi na angiotensynę II działającą przez receptor  $AT_1$ , jest mediowana poprzez układ sygnałowy związany z białkiem G wrażliwym na toksynę krztuśca [84]. Z drugiej też strony, zwiększona aktywność NHE,

stanowiąca fenotyp pośredni genu podjednostki  $\beta_3$  białka G jest także związana z wzmożoną aktywnością proliferacyjną zarówno w obrębie ścian naczyń [53], jak i proliferacją kardiomiocytów i fibroblastów w sercu [82, 58, 17].

Wyniki badania własnego, w którym zauważono związek polimorfizmu C825T GNB3 z podatnością naczyń oraz masą lewej komory serca, mogą być kliniczną ilustracją takiego mechanizmu wpływu czynnika genetycznego. Zwiększona proliferacja fibroblastów w sercu z następującą syntezą kolagenu może prowadzić u nosicieli allelu 825T GNB3 do włóknienia miocardium i obniżenia podatności lewej komory.

Trudno jednak przyjąć taką hipotezę dla wytłumaczenia obserwacji zależności allelu T z funkcją rozkurczową lewej komory w pokoleniu młodszym., w którym nie obserwowano różnicy ciśnienia tętniczego ani masy lewej komory między genotypami. Tak więc, w grę wchodzić mogą inne mechanizmy.

Podjęto więc próbę interpretacji tego zjawiska w oparciu o rolę jonów wapnia w procesie rozkurczu lewej komory. Rozkurcz kardiomiocytów jest procesem aktywnym, wymagającym energii [47]. Czas jego trwania zależy od szybkości usuwania jonów wapnia z cytozolu do retikulum sarkoplazmatycznego (przez ATP-azę wapniową retikulum sarkoplazmatycznego – SERCA2) oraz na zewnątrz komórki przez wymiennik sodowo-wapniowy [51]. Funkcja SR/ $\text{Ca}^{2+}$  - ATP-azy modulowana jest przez przenoszący odpowiedź adrenergiczną z receptorów  $\beta$ , ulegający fosforylacji fosfolamban (pobudzenie receptorów  $\beta \rightarrow \uparrow \text{cAMP} \rightarrow$  fosforylacja fosfolambanu  $\rightarrow$  zmniejszenie hamowania SR/ $\text{Ca}^{2+}$  - ATP-azy  $\rightarrow$  dodatni efekt lusitropowy) [47]. Receptory  $\beta$ -adrenergiczne w sercu wykorzystują głównie system transdukcji błonowej związany głównie z aktywacją białek  $G_s$ . [44]. Ostatnie badania kardiomiocytów gryzoni wykazały jednak, że receptory  $\beta_2$ -adrenergiczne wykorzystują w celu przekazania sygnału także białka  $G_i$  - których aktywacja prowadzi do hamowania syntezy cyklicznego AMP [56; 103; 104; 48].

Polimorfizm C825T GNB3, który związany jest ze wzmocnieniem transdukcji sygnału mediowanego przez białka  $G_i$ , może być odpowiedzialny za obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, hamowanie fosforylacji fosfolambanu i upośledzenie relaksacji kardiomiocytów. Pośrednim tego odzwierciedleniem mogłoby być, obserwowane w badaniu własnym, upośledzenie wczesnej relaksacji lewej komory u homozygot TT.

Innym potencjalnym mechanizmem wpływu polimorfizmu podjednostki  $\beta 3$  białka G na czynność układu krążenia jest jego rola w patogenezie otyłości i insulinooporności. Białka G odgrywają bowiem kluczową rolę w procesie adipogenezy [100, 70]. Ważną rolę w regulacji metabolizmu tłuszczów i węglowodanów odgrywa także zwiększona aktywność wymiennika sodowo-protonowego [14, 18]. U nosicieli zmutowanego allelu T GNB3 obserwowano zahamowanie lipolizy zależnej od stymulacji adrenergicznej [75]. Asocjację allelu 825T GNB3 z otyłością i insulinoopornością obserwowano w kilku populacjach [68, 85, 70, 25] ale opublikowano też wyniki nie potwierdzające takiego związku [8, 37]. Podobnie, w badaniu własnym także nie stwierdzono zależności między polimorfizmem GNB3 a nadwagą, otyłością czy grubością fałdu skórniego.

Wyniki przeprowadzonego badania ilustrują jak złożone i wielokierunkowe działanie może wywoływać polimorfizm pojedynczego genu w determinowaniu właściwości układu sercowo-naczyniowego i w klinicznym ujawnieniu się zmian patologicznych. Obserwowany brak bezpośredniego związku zmienności allelicznej GNB3 z nadciśnieniem tętniczym wydaje się być efektem wieloczynnikowego charakteru choroby.

Warianty polimorficzne pojedynczych genów nie odgrywają zwykle roli podstawowych czynników etiologicznych w chorobach poligenowych – działają głównie jako czynniki modulujące odpowiedź organizmu. Do ujawnienia się patologii konieczne jest współdziałanie wielu genów, z których każdy wywiera tylko słaby efekt oraz ich interakcja ze środowiskowymi, niegenetycznymi czynnikami ryzyka. Niemniej jednak, trzeba zauważyć, że ich rola, także rola badanego polimorfizmu GNB3, zaznacza się na każdym etapie rozwoju choroby: wpływając na czynniki ryzyka (ciśnienie tętnicze), modyfikując stany przedkliniczne (patologiczna przebudowa ścian tętnic), wpływając na ostateczne konsekwencje i powikłania (przerost lewej komory, dysfunkcja rozkurczowa), w końcu modyfikując efekty postępowania leczniczego.

Pomimo oczywistych ograniczeń i trudności w wykazaniu klinicznej użyteczności, analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów pozostaje nadal uznaną metodą badań i do zrozumienia patogenyzy złożonych chorób cywilizacyjnych.

## **Wnioski:**

1. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w populacji regionu krakowskiego jest zbliżona do obserwowanej w innych populacjach europejskich.
2. Osoby z nadciśnieniem tętniczym nie różnią się istotnie od normotoników pod względem częstości występowania alleli polimorficznych C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G.
3. Wpływ polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G na ciśnienie tętnicze krwi oraz parametry struktury serca oraz funkcji naczyń jest istotny tylko w starszej grupie pokoleniowej badanej populacji. Wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi, wyższy wskaźnik masy lewej komory serca oraz obniżoną podatność naczyń tętniczych stwierdzono u homozygot TT w porównaniu z nosicielami allelu C. Obserwacja ta przemawia za recesywnym modelem efektu fenotypowego polimorfizmu C825T GNB3 ujawniającym się w starszej grupie pokoleniowej.
4. Obecność podwójnej mutacji 825T w locus genu podjednostki  $\beta 3$  białka G istotnie wpływa na funkcję rozkurczową lewej komory serca w obu badanych pokoleniach. Asocjację polimorfizmu C825T ze wskaźnikami funkcji rozkurczowej lewej komory potwierdzono także w recesywnym modelu analizy TDT.

## Streszczenie pracy

Pierwotne nadciśnienie tętnicze jest chorobą o złożonej i wieloczynnikowej etiologii. Istnieje wiele dowodów na to, że w patogenezie nadciśnienia tętniczego ważną rolę odgrywają czynniki genetyczne. W ciągu ostatnich kilku lat opublikowano szereg badań o powiązaniu różnych genów z ciśnieniem tętniczym krwi.

Wśród genów, których polimorfizm może potencjalnie wiązać się z rozwojem nadciśnienia tętniczego szczególne zainteresowanie wzbudza obecnie gen podjednostki  $\beta 3$  białka G (GNB3) i opisany w jego obrębie polimorfizm C825T.

Celem pracy było określenie częstości występowania alleli polimorficznych (C825T) genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w populacji regionu krakowskiego oraz porównanie częstości występowania poszczególnych alleli polimorficznych GNB3 u osób z prawidłowym ciśnieniem i chorych z nadciśnieniem tętniczym. Ponadto ocena, w oparciu o badanie rodzin, związku polimorfizmu C825T GNB3 z wartością, zmiennością i profilem dobowym ciśnienia tętniczego krwi, parametrami morfologii i funkcji lewej komory oraz sztywności i przebudowy dużych naczyń tętniczych.

Badaniem objęto 86 dwupokoleniowych rodzin o określonej strukturze (rodzice i co najmniej dwoje dzieci), z czego 55 rodzin zrekrutowano z populacji ogólnej, kolejne 31 stanowiły rodziny pacjentów Poradni Nadciśnieniowej I Kliniki Kardiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Łącznie w badaniu uczestniczyło 326 osób.

U każdej osoby wykonano standardowe pomiary ciśnienia, podczas trzech oddzielnych wizyt, pięciokrotnie w czasie każdej wizyty. W celu jeszcze dokładniejszej oceny ciśnienia tętniczego krwi wykorzystano metodę całodobowej rejestracji ciśnienia (*aparatury SpaceLabs 90207*), z częstością pomiarów co 15 minut w dzień i co 30 minut w nocy. U wszystkich badanych zostało wykonane badanie echokardiograficzne M-mode, 2D i badanie metodą Dopplera dla oceny morfologii i funkcji lewej komory serca (*Hewlett-Packard, Sonos 2000, głowica o częstotliwości 2.5 MHz*). Nasilenie procesu miażdżycy zostało ocenione poprzez ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych z oceną grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych wspólnych. Ocenę podatności ściany dużych naczyń tętniczych przeprowadzono poprzez pomiar centralnej szybkości fali tętna (*aparatury Complior®*). Oznaczenia polimorfizmu C825T wykonano z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy i trawienia produktów amplifikacji przy użyciu enzymu restrykcyjnego BseDI.

Rozkład częstości genotypów polimorfizmu C825T podjednostki  $\beta_3$  białka G w badanej populacji był zgodny z przewidywanym według prawa Hardy-Weinberga ( $p=0.21$ ) i porównywalny z opisywanym w innych populacjach europejskich. Grupa pacjentów z nadciśnieniem tętniczym nie różniła się w istotny sposób od grupy osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu ( $p=0.89$ ).

W pomiarach standardowych ciśnienia tętniczego krwi, w trakcie wizyt domowych, nie obserwowano istotnych różnic w wysokości ciśnienia tętniczego między poszczególnymi genotypami polimorfizmu C825T GNB3. Wyniki 24-godzinnego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi ujawniły różnice w wartościach ciśnienia tętniczego w zależności od genotypu badanego polimorfizmu jedynie w pokoleniu rodziców. U homozygot TT w porównaniu z genotypami CC + CT obserwowano wyższe wartości ciśnienia z 24-godzin rejestracji (odpowiednio: skurczowe  $131.2 \pm 14.2$  vs  $123.5 \pm 11.5$  mmHg, rozkurczowe:  $81.6 \pm 7.7$  vs  $76.0 \pm 7.9$  mmHg), a także skurczowego CTK z okresu dnia ( $137.5 \pm 13.9$  vs  $129.8 \pm 11.9$  mmHg) oraz nocy ( $120.6 \pm 18.1$  vs  $112.9 \pm 12.7$  mmHg). W pokoleniu rodziców obserwowano także większą zmienność ciśnienia tętniczego krwi u osób będących nosicielami allelu 825T polimorfizmu genu GNB3.

W pokoleniu rodziców, u homozygot TT badanego polimorfizmu GNB3 stwierdzono wyższy wskaźnik masy lewej komory serca w porównaniu do nosicieli allelu C (odpowiednio:  $122.0 \pm 35.0$  vs  $104.0 \pm 20.0$  g/m<sup>2</sup>). W pokoleniu potomków nie obserwowano natomiast różnic masy lewej komory serca między genotypami polimorfizmu GNB3.

W obu pokoleniach obserwowano istotną asocjację prędkości fali E wczesnego napełniania lewej komory i wskaźnika E/A z genotypem C825T GNB3. U osób z genotypem TT stwierdzono istotnie niższe wartości prędkości fali E i ilorazu E/A niż wśród nosicieli allelu C (E/A: TT -  $1.23 \pm 0.44$ ; CT -  $1.50 \pm 0.42$  CC -  $1.55 \pm 0.41$ ). Dane uzyskane w analizie asocjacji potwierdzono także testem nierównowagi transmisji, który wykazuje silny efekt odziedziczenia dwóch zmutowanych alleli T na parametry napływu lewej komory.

Nie stwierdzono istotnych różnic grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej wspólnej między genotypami badanego polimorfizmu.

W analizie prędkości fali tętna obserwowano różnice między genotypami GNB3 tylko w pokoleniu rodziców: istotnie wyższe wartości prędkości fali tętna u homozygot TT niż u nosicieli allelu C (TT –  $11.9 \pm 2.3$ ; CT –  $10.6 \pm 1.6$ ; CC –  $10.2 \pm 1.36$  cm/s). W grupie osób młodszych nie stwierdzono zależności PWV od genotypu C825T GNB3.

Podsumowując, w badanej grupie stwierdzono silny związek polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta_3$  białka G z funkcją rozkurczową lewej komory w obu pokoleniach. Natomiast wpływ polimorfizmu GNB3 na ciśnienie tętnicze krwi oraz parametry struktury serca oraz funkcji naczyń jest istotny tylko w starszej grupie pokoleniowej badanej populacji. Wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi, wyższy wskaźnik masy lewej komory serca oraz obniżoną podatność naczyń tętniczych stwierdzono u homozygot TT w porównaniu z nosicielami allelu C. Obserwacja ta przemawia za recesywnym modelem efektu fenotypowego polimorfizmu C825T GNB3 ujawniającym się w starszej grupie pokoleniowej.

## Spis tabel i rysunków umieszczonych w tekście:

- Rys 1 Struktura genu podjednostki  $\beta 3$  białka G.
- Rys 2 Proponowana przez Sifferta i wsp. struktura białek  $G\beta 3$  i  $G\beta 3$ -s.
- Rys 3 Schemat badania.
- Rys 4 Ocena grubości kompleksu intima-media w badaniu USG tętnic szyjnych wspólnych.
- Rys 5 Badanie prędkości centralnej fali tętna z użyciem aparatu Complior®.
- Rys 6 Detekcja mutacji C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G - przykładowy rozkład elektroforetyczny.
- Rys 7 Schemat definicji transmisji allelu T w teście nierównowagi transmisji.
- Rys 8 Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w badanej populacji oraz skuteczność jego kontroli.
- Rys 9 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne nadciśnienia tętniczego w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 10 Ciśnienie tętnicze krwi – wyniki pomiarów tradycyjnych, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 11 Ciśnienie tętnicze krwi – wyniki 24-godzinnej rejestracji ciśnienia, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 12 Profil dobowy ciśnienia tętniczego krwi w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 13 Wskaźnik masy lewej komory serca, w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB.
- Rys 14 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne przerostu lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 15 Prędkość fali E i A napełniania lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3 w obu pokoleniach.
- Rys 16 Stosunek prędkości fali E/A napełniania lewej komory w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.
- Rys 17 Wyniki analizy regresji logistycznej oceniającej ryzyko względne dysfunkcji rozkurczowej lewej komory serca w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.



Rys 18 Grubość kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.

Rys 19 Prędkość fali tętna w obu pokoleniach w zależności od genotypu polimorfizmu C825T GNB3.

- Tabela 1      Struktura i liczebność badanej populacji.
- Tabela 2      Startery służące do powielania w reakcji PCR fragmentów genu GNB3 zawierających zmutowane miejsca.
- Tabela 3      Charakterystyka badanej populacji z uwzględnieniem podziału na pokolenia oraz ze względu na płeć.
- Tabela 4      Charakterystyka badanej populacji - parametry struktury i funkcji serca oraz naczyń z uwzględnieniem podziału na pokolenia oraz ze względu na płeć.
- Tabela 5      Częstość rozkładu poszczególnych genotypów polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w badanej populacji.
- Tabela 6      Parametry antropometryczne oraz częstość występowania nadwagi, otyłości i nadciśnienia tętniczego w zależności od genotypu polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w obu pokoleniach badanej populacji.
- Tabela 7      Zmienność ciśnienia tętniczego krwi w zależności od genotypu polimorfizmu C825T genu podjednostki  $\beta 3$  białka G w obu pokoleniach badanej populacji.
- Tabela 8      Wyniki analizy TDT w pokoleniu II.

## **Piśmiennictwo:**

1. Abbud Z.A., Wilson A.C., Cosgrove N.M., Kostis J.B.. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1998; 81: 244-246.
2. Allison D. Transmission-disequilibrium test for quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 676-690
3. Altshuler D., Kruglyak L., Lander E. Genetic polymorphism and disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1626
4. Aviv A. The links between cellular  $Ca^{2+}$  and  $Na^+/H^+$  exchange in the pathophysiology of essential hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9: 703–707
5. Baumgart D., Naber C., Haude M., Oldenburg O., Erbel R., Heusch G., Siffert W. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation. *Circ Res* 1999; 85: 965-969
6. Beige J., Hohenbleicher H., Distler A., Sharma A.M. the G-protein subunit  $\beta$  3 C825T variant and ambulatory blood pressure on essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 1049-1051
7. Benjafeld A.V., Jeyasingam C.L., Nyholt D.R., Griffiths L.R., Morris B. . G protein  $\beta$  3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 1094-1097.
8. Benjafeld A.V., Lin R.C., Dalziel B., Gosby A.K., Caterson I.D., Morris B.J. G-protein beta3 subunit gene splice variant in obesity and overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25: 777-80.
9. Bonnardeaux A., Davies E., Jeunemaitre X., Fery I., Charru A., Clauser E., Tiret L., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-69.
10. Bourne H.R. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 134-142.
11. Brand E., Herrmann S.M. Nicaud V., Ruidavets J.B., Evans A., Arveiler D., Luc G., Plouin P.F., Tiret L., Cambien F. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit  $\beta$  3 is not related to hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 1175-1178
12. Buchmayer H., Sunder-Plassmann G., Hirschl M.M., Kletzmayer J., Woisetschlager C., Laggner A.N., Horl W.H., Fodinger M. G-protein beta3 subunit gene (GNB3)

- polymorphism 825C-->T in patients with hypertensive crisis. *Crit Care Med* 2000; 28: 3203-3206
13. Casale P.N., Devereux R.B., Milner M., Zullo G., Harshfield G.A., Pickering T.G., Laragh J.H. Value of echocardiographic left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Intern Med* 1986; 105: 173
  14. Ceolotto G., Conlin P., Clari G., Semplicini A., Canessa M. Protein kinase C and insulin regulation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol* 1997; 272: C818–C826
  15. Ciechanowicz A. Januszewicz A., Aspekty genetyczne nadciśnienia tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* 2002; 6 suppl A; A29-A42.
  16. Cusi D., Barlassina C., Azzani T., Casari G., Citterio L., Devoto M., Glorioso N., Lanzani C., Manunta P., Righetti M., 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.
  17. de La S.A., Coca A., Pare J.C., Sanchez M., Valls V., Urbano-Marquez A. Erythrocyte ion fluxes in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1993; 88: 1628–1633
  18. Delva P., Pastori C., Provoli E., Degan M., Arosio E., Montesi G., Steele A., Lechi A. Erythrocyte Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange activity in essential hypertensive and obese patients: Role of excess body weight. *J Hypertens* 1993; 11: 823–830
  19. Devereux R.B., Alonso D.R., Lutas E.M., Gottlieb G.J., Campo E., Sachs I., Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450-8.
  20. Devereux R.B., Lutas E.M., Casale P.N., Kligfield P., Eisenberg R.R., Hammond I.W., Miller D.H., Reis G., Alderman M.H., Laragh J.H.: Standardization of M-mode echocardiographic left ventricular anatomic measurements. *J Am Coll Cardiol* 1984; 4: 1222 - 1230
  21. Dong Y., Zhu H., Sagnella G.A., Carter N.D., Cook D.G., Cappuccio F.P. Association between the C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 1999; 34: 1193-1196.
  22. Downes G.B., Gautam N. The G protein subunit gene families. *Genomics* 1999; 62: 544-552.
  23. Dzida G., Golon-Siekierska P., Puzniak A., Sobstyl J., Bilan A., Mosiewicz J., Hanzlik J. G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism is associated with

- arterial hypertension in Polish patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit.* 2002; 8: 597-602.
24. Farfel Z., Bourne H.R., Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med* 1999; 340: 1012-20
  25. Fernandez-Real J.M., Penarroja G., Richard C., Castro A., Vendrell J., Broch M., Lopez-Bermejo A., Ricart W. G protein beta-3 gene variant, vascular function and insulin sensitivity in type 2 diabetes. *Hypertension* 2003; 41: 124-129
  26. Folkow B. Integration of hypertension research in the area of molecular biology: GW Pickering memorial lecture (Dublin 1994). *J Hypertens* 1995; 13: 5-18.
  27. Fossum E., Berge K.E., Hoieggen A., Moan A., Rostrup M., Kjeldsen S.E., Eide I., Berg K. Polymorphism in candidate genes for blood pressure regulation in young men with normal or elevated screening blood pressure. *Blood Press* 2001; 10: 92-100
  28. Frattola A., Parati G., Cuspidi C., Albini F., Mancia G. Prognostic value of 24-hour blood pressure variability. *J Hypertens* 1993; 11: 1133-1137.
  29. Grodzicki T., Michalewicz L., Messerli F.H. Aging and essential hypertension: effect of left ventricular hypertrophy on cardiac function. *Am J Hypertens.* 1998; 11: 425-9.
  30. Grodzicki T., Cwynar M., Gałowski J., Gryglewska B. Pulse wave velocity and the estimated risk of stroke and myocardial infarction. *Acta Cardiol* 2002; 57: 36-7
  31. Grupa Robocza Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (Sznajderman M., Kawecka-Jaszcz K., Rynkiewicz A., Łapiński M., Kabat M.) 24-godzinne monitorowanie ciśnienia tętniczego – stan obecny i perspektywy. *Pol Arch Med Wewn* 1993; 89: 251-54
  32. Harrap S.B. Hypertension: genes versus environment. *Lancet* 1994; 344: 169-170.
  33. Hauner H., Rohrig K., Siffert W. Effects of the G-protein beta3 subunit 825T allele on adipogenesis and lipolysis in cultured human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 2002; 34: 475-80
  34. Hegele R.A., Harris S.B., Hanley A.J.G., Cao H., Zinman B. G protein  $\beta$ 3 subunit variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree. *Hypertension* 1998; 32: 682-92.
  35. Hegele R.A., Anderson C., Kue Young T., Connally P.W. G-protein beta3 subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Res.* 1999; 9: 972-977.
  36. Hengstenberg C., Schunkert H., Mayer B., Doring A., Lowel H., Hense H.W., Fischer M., Riegger G.A., Holmer S.R. Association between a polymorphism in the G protein

- beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovas Res* 2001; 49: 820-827
37. Hinney A., Geller F., Neupert T., Sommerlad C., Gerber G., Gorg T., Siegfried W., Goldschmidt H., Remschmidt H., Ziegler A., Hebebrand J. No evidence for involvement of alleles of the 825-C/T polymorphism of the G-protein subunit beta 3 in body weight regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001; 109: 402-5.
38. Ishikawa K., Imai Y., Katsuya T., Ohkubo T., Tsuji I., Nagai K., Takami S., Nakata S., Satoh H., Hisamichi S., Higaki J., Ogihara J. Human G-protein  $\beta 3$  subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens* 2000; 13: 140-145.
39. Jacobi J., Hilgers K.F., Schlaich M.P., Siffert W, Schmieder R.E. 825 T allele of the G-protein  $\beta 3$  subunit gene (GNB3) is associated with impaired left ventricular diastolic filling in essential hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: 1457-1562
40. Januszewicz A., Cybulska I., Kabat M. Postępy w leczeniu nadciśnienia tętniczego. *Pol Arch Med Wewn* 2000;104: 655-63
41. Januszewicz A., Łapiński M., Symonides B., Dąbrowska E., Kuch-Wocial A., Trzepla E., Ignatowska-Świtalska H., Wocial B., Chodakowska J., Januszewicz W. Elevated endothelin-1 plasma concentration in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Risk* 1994; 1: 81-5
42. Jeunemaitre X., Inoue I., Williams C., Charru A., Tichet J., Powers M., Sharma A.M., Gimenez-Roqueplo A.P., Hata A., Corvol P., Lalouel J.M. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1448-1460.
43. Kato N., Sugiyama T., Morita H., Kurihara H., Yamori Y., Yazaki Y. G protein  $\beta 3$  subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 1998; 32: 935-938.
44. Kauman A., Bartel S., Molenaar P., Sanders L., Burrell K., Vetter D., Hempel P., Karczewski P., Krause E.G. Activation of beta-2 adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I and C protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1999; 99: 65-72
45. Kawecka-Jaszcz K. European Project on Genes in Hypertension (EPOGH) – informacja o programie. *Nadciśnienie Tętnicze* 2000; 4: 221-223

46. Koren M.J., Ulin R.J., Koren A.T., Laragh J.H., Devereux R.B.: Left ventricular mass change during treatment and outcome in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15: 1021 - 1028
47. Koss K.L., Kranias E.G. Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Res* 1996; 79: 1059-1063
48. Kuchel M., Zhou Y.Y., Cheng H., Zhang S.J., Chen Y., Lakatta E., Xiao R.P. G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta2-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 22048-52
49. Larson N., Hutchinson R., Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 2000; 35: 1297-1300
50. Levy D., Garrison R.J., Savage D.D., Kannel W.B., Castelli W.P. Prognostic implication of echocardiography determined left ventricular mass in the Framingham Study. *N Engl J Med* 1990; 332: 1561-1569
51. Li L., Desantiago J., Chu G., Kranias E.G., Bers D.M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 2000; 278: 769H-779
52. Luft F.C. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:1871 - 1878.
53. Lurbe A., Fiorento P., Maure M., LaPointe M.S., Batlle D. Growth phenotype of cultured skin fibroblasts from IDDM patients with and without nephropathy and overactivity of Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiporter. *Kidney Int* 1996; 50: 1684-1693
54. Meirhaeghe A., Bauters C., Helbecque N., Hamon M., McFadden E., Lablanche J.M., Bertrand M., Amouyel P. The human G-protein beta3 subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *Eur Heart J* 2001; 22: 845-848
55. Miamoto Y., Saito Y., Kajiyama N., Yoshimura M., Shimasaki Y., Nakayama M., Kamitani S., Harada M., Ishikawa M., Kuwahara K., Ogawa E., Hamanaka I., Takahashi N., Kaneshige T., Teraoka H., Akamizu T., Azuma N., Yoshimasa Y., Yoshimasa T., Itoh H., Masuda I., Yasue H., Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 3-8.
56. Molenaar P., Bartel S., Cochrane A., Vetter D., Jalali H., Pohlner P., Burrell K., Karczewski P., Krause E.G., Kaumann A. Both beta-2 and beta-1 adrenergic receptors mediate hastened relaxation and phosphorylation of phospholamban and

- troponin I in ventricular myocardium of Fallot infants, consistent with selective coupling of beta-2 adrenergic receptors to G<sub>s</sub>-protein. *Circulation* 2000; 102: 1814-21
57. Morgagni J.B.: *De sedibus et causis Morborum per Anatomem Indagatis*, Vol. 1 Vento, Remondiana 1761.
  58. Navarro-Lopez F., Coca A., Pare J.C., de La S.A., Bosch X., Urbano M.A. Left ventricular hypertrophy in asymptomatic essential hypertension: its relationship with aldosterone and the increase in sodium-proton exchanger activity. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl: 38-41
  59. Ohshiro Y., Ueda K., Wakasaki H., Takasu N., Nanjo K. Analysis of 825C/T polymorphism of G protein beta3 subunit in obese/diabetic Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286: 678-80.
  60. Olivetti G., Melissari M., Balbi T., Quaini F., Cigola E., Sonnenblick E.H., Anversa P. Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in humans. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 140-149
  61. Parati G., Pomidossi G., Albini F., Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hr blood pressure mean and variability to severity of target organ damage in hypertension. *J Hypertens* 1987; 5: 93-98
  62. Petrie J.C., O'Brien E.T., Littler W.A., de Swiet M. Recommendations on blood pressure measurement by a working party of the British Hypertension Society. *Brit Med J* 1989; 293: 611-5.
  63. Pickering T.G.: *High blood pressure*. London. Churchill, 1968.
  64. Pietruck F., Moritz A., Montemurro M., Sell A., Busch S., Roskopf D., Virchow S., Esche H., Brockmeyer N., Jakobs K.H., Siffert W. Selectively enhanced cellular signalling by G<sub>i</sub> proteins in essential hypertension. G<sub>ai2</sub>, G<sub>ai3</sub>, G<sub>β2</sub> are not mutated. *Circ Res* 1996; 79: 974-983.
  65. 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; 74: 1399-1406
  66. Platt R.: Heredity in hypertension. *Lancet* 1963; 7287: 899-904
  67. Poch E, Gonzalez D, Gomez-Anelats S, Enjuto M, Pare JC, Rivera F, de la Sierra A. G-protein β3 subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35 [part 2]: 214-215

68. Poch E., Giner V., Gonzalez-Nunez D., Coll E., Oriola J., de la Sierra A. Association of the G protein beta3 subunit T allele with insulin resistance in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2002; 24: 345-53.
69. Rajzer M., Kawecka-Jaszcz K. Podatność tętnic w nadciśnieniu tętniczym. Od patofizjologii do znaczenia klinicznego. *Nadciśnienie Tętnicze* 2002; 6: 61-73
70. Rankinen T., Rice T., Leon A.S., Skinner J.S., Wilmore J.H., Rao D.C., Bouchard C. G protein beta 3 polymorphism and hemodynamic and body composition phenotypes in the HERITAGE Family Study. *Physiol Genomics*. 2002; 28: 151-7.
71. Rebbeck T.R., Turner S.T., Sing C.F. Probability of having hypertension: effects of sex, history of hypertension in parents, and other risk factors. *J Clin Epidemiol* 1996; 49: 727-734.
72. Reichek N., Devereux R.B. Reliable estimation of peak left ventricular systolic pressure by M-mode echocardiographic determined end-diastolic relative wall thickness: identification of severe valvular aortic stenosis in adult patients. *Am Heart J* 1982; 103: 202-210
73. Roszkopf D., Manthey I., Siffert W. Identification and ethnic distribution of major haplotypes of the gene GNB3 encoding the G-protein beta3 subunit. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 209-220
74. Roszkopf D., Frömter E., Siffert W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients—a cell culture model for human hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 2553–2559
75. Ryden M., Faulds G., Hoffstedt J., Wenmlund A., Arner P. Effect of the (C825T) G beta3 polymorphism in adrenoceptor-mediated lipolysis in human fat cells. *Diabetes* 2002; 51: 1601-1608
76. Sahn D.J., DeMaria A., Kisslo J., Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58: 1072-83.
77. Schiller N.B., Shah P.M., Crawford M., DeMaria A., Devereux R., Feigenbaum H., Gutgesell H., Reichek N., Sahn D., Schnittger I. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on standards, subcommittee on quantitation of two-dimensional echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2: 358-67.



78. Schorr U., Blaschke K., Beige J., Distler A., Sharma A.M. G-protein beta3 subunit 825T allele and response to dietary salt in normotensive men. *J Hypertens.* 2000;18: 855-9.
79. Schunkert H., Hense H.W., Doring A., Riegger G.A.J., Stiffert W. Association between a polymorphism in the G protein  $\beta$  3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 1998; 32: 510-513
80. Sedlacek K., Fischer M., Erdmann J., Hengstenberg C., Holmer S., Kurzinger S., Muscholl M., Luchner A., Riegger G.A., Hense H.W., Schunkert H. Relation of the G protein beta3-subunit polymorphism with left ventricle structure and function. *Hypertension* 2002; 40: 162-167
81. Semplicini A., Siffert W., Sartori M., Monari A., Naber C., Frigo G., Santonastaso M., Cozzutti E., Winnicki M., Palatini P. G protein beta3 subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14: 1191-1195
82. Semplicini A., Lusiani L., Marzola M., Ceolotto G., Mozzato M.G., Zanette G., Donadon V., Stefanini M.G., Zanuttini D., Pessina A.C. Erythrocyte  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange, cardiac anatomy and function in insulin-dependent diabetics. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 254-259
83. Shlyakhto E.V., Shwartz E.I., Nefedova Y.B., Zukova A.V., Vinnic T.A., Konrady AO. Lack of association of G-protein subunit gene C825T polymorphism with left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR 337-340
84. Siffert W. G proteins, hypertension and coronary heart disease - novel findings and hypotheses. *Kidney Blood Press Res* 1996; 19: 71-80.
85. Siffert W., Forster P., Jockel K.H., Mvere D.A., Brinkmann B., Naber C., Crookes R., Du P., Heyns A., Epplen J.T., Fridey J., Freedman B.I., Muller N., Stolke D., Sharma A.M., Al Moutaery K., Grosse-Wilde H., Buerbaum B., Ehrlich T., Ahmad HR., Horsthemke B., Du Toit ED., Tiilikainen A., Ge J., Wang Y., Roskopf D. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 1921-30
86. Siffert W., Roskopf D., Moritz A., Wieland T., Kaldenberg-Stasch S., Kettler N., Hartung K., Beckmann S., Jakobs K.H. Enhanced G protein activation in

- immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1995; 96: 759-766.
87. Siffert W., Roskopf D., Siffert S., Busch S., Moritz A., Erbel R., Sharma AM., Ritz E., Wichmann H.E., Jakobs K.H., Horstemke B. Association of a human G-protein  $\beta$  3 variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998; 18: 45-48.
88. Siffert W. G protein  $\beta$ 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1298-1306
89. Snapir A., Heinonen P., Tuomainen T.P., Lakka T.A., Kauhanen J., Salonen J.T., Scheinin M. G-protein beta3 subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity. *J Hypertens* 2001; 19:2149-55.
90. Spirito P., Maron B.J., Balotti P., Chiarella F., Vecchio C. Noninvasive assessment of left ventricular diastolic function: comparative analysis of pulsed Doppler ultrasound and digitized M-mode echocardiography. *Am J Cardiol* 1986; 58: 837-843
91. Staessen J.A., Bulpitt C.J., O'Brien E., Cox J., Fagard R., Stanton A., Thijs L., Van Hulle S., Vyncke G., Amery A. The diurnal blood pressure profile. A population study. *Am J Hypertens* 1992; 5: 386-392.
92. Svetkey L.P., Timmons P.Z., Emovon O. Association of hypertension with  $\beta$ 2- and  $\alpha$ 2c10- adrenergic receptor genotype. *Hypertension* 1996; 27: 1210-1215.
93. Tabara Y., Kohara K., Miki T. Polymorphism of genes encoding components of the sympathetic nervous system but not the renin-angiotensin system as a risk factors for orthostatic hypotension. *J Hypertens.* 2002; 20: 651-656
94. The SAS Institute. The GENMOD procedure. SAS Online Doc Version 7.1 : SAS/STAT. Cary, North Carolina, USA: The SAS Institute Inc., 2000: 1311-1411.
95. Tozawa Y. G protein beta3 subunit variant: tendency of increasing susceptibility to hypertension in Japanese. *Blood Press* 2001; 3: 131-134
96. Turner S.T., Schwartz G.L., Chapman A.B., Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein  $\beta$ 3-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001; 37(part 2): 739-43.
97. Verdecchia P., Borgioni C., Ciucci A. Gattobigio R., Schillaci G., Sacchi N., Santucci A., Santucci C., Reboldi G., Porcellati C. Prognostic significance of blood pressure variability in essential hypertension. *Blood Press Monit.* 1996; 1: 3-11
98. Verdecchia P., Schillaci C., Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Guerrieri M, Comparato E, Benemio G, Porcellati C. Altered circadian blood pressure profile and prognosis. *Blood Press Monit.* 1997; 2: 347-352

99. Virchov S., Ansorge N., Rosskopf D., Ruben H., Siffert W. The G-protein  $\beta$  3 subunit splice variant G  $\beta$ 3-s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 27-32
100. Wang H.Y., Malbon C.C. The  $G_{\alpha_{i2}}$  /  $G_{\alpha_{i3}}$  axis controls adipogenesis independently of adenylyl cyclase. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20 (supp3): S26-S31
101. Weitz W.: Zur Aetiologie der genuinen oder vascularen Hypertension. *Z Klin Med* 1923, 96: 151-161.
102. Wenzel R.R., Siffert W., Bruck H., Philipp T., Schafers R.F. Enhanced vasoconstriction to endothelin-1, angiotensin II and noradrenaline in carriers of the GNB3 825T allele in the skin microcirculation. *Pharmacogenetics*. 2002 Aug;12(6):489-95.
103. Xiao R.P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE*. 2001; 2001(104): RE15.
104. Xiao R.P., Chng H., Zhou Y.Y., Kuschel M., Lakatta E.G. Recent Advances in Cardiac beta2-adrenergic Signal transduction. *Circulation Res* 1999; 85: 1092-1100
105. Zeltner R., Delles C., Schneider M., Siffert W., Schmieder RE. G-protein  $\beta$ 3-subunit gene (GNB3) 825T allele is associated with enhanced renal perfusion in early hypertension. *Hypertension* 2001; 37: 882-6.
106. Zychma M.J., Żuchowska-Szczęchowska E., Ossowska-Szymkiewicz I., Trautsolt W., Grzeszczak W. G-Protein beta(3) subunit C825T variant, nephropathy and hypertension in patients with type 2 (Non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Am J Nephrol*. 2000; 20: 305-10.

