

Joanna Wójcik-Odyniec<sup>1</sup>, Artur Odyniec<sup>2</sup>, Elżbieta Cieplucha<sup>3</sup>, Elektra Szymańska-Garbacz<sup>1</sup>, Małgorzata Saryusz-Wolska<sup>1</sup>, Anna Borkowska<sup>1</sup>, Maciej Borowiec<sup>4</sup>, Leszek Czupryniak<sup>5</sup>, Jerzy Loba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej — Centralny Szpital Weteranów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup>Klinika Neurologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. N. Barlickiego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup>Klinika Kardiologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej — Centralny Szpital Weteranów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>4</sup>Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej i Zakładu Genetyki Klinicznej, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej — Centralny Szpital Weteranów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>5</sup>Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii, Uniwersytet Warszawski

# Związek pomiędzy polimorfizmem 9p21 oraz wczesnym początkiem choroby niedokrwiennej serca u chorych na cukrzycę typu 2

Time of onset of coronary artery disease in diabetic patients depends on genetic polymorphism in region 9p21 but not in 1p25

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Wójcik-Odyniec J, Odyniec A, Cieplucha E et al. Time of onset of coronary artery disease in diabetic patients depends on genetic polymorphism in region 9p21 but not in 1p25. *Clin Diabet* 2016; 5, 1: 7–14. DOI: 10.5603/DK.2016.0002.

Należy cytować wersję pierwotną.

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Cukrzyca typu 2 (DM2) jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca (CAD) i jej powikłań. W badaniach genetycznych prowadzonych w ciągu ostatnich lat wykazano potencjalny związek między tymi chorobami na poziomie genetycznym. Celem pracy była analiza związku między polimorfizmem w *loci* 1q25 oraz 9p21 (znanym jako czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych) a wczesnym początkiem choroby niedokrwiennej serca u chorych na cukrzycę typu 2.

**Materiał i metody.** Do kliniczno-kontrolnego badania włączono 338 chorych na cukrzycę typu 2 ze współistniejącą chorobą niedokrwinną serca. Na potrzeby badania uczestników podzielono na dwie grupy w zależności od wieku w momencie rozpoznania choroby niedokrwiennej serca: grupę osób z wczesnym

początkiem choroby (< 55. rż. u mężczyzn i < 65. rż. u kobiet, n = 180) oraz grupę kontrolną (odpowiednio  $\geq 55.$  oraz  $\geq 65.$  rż., n = 158). Dane epidemiologiczne uzyskano z dokumentacji medycznej oraz retrospektywnego kwestionariusza, od każdego chorego pobrano próbkę krwi do badań genetycznych, polimorfizmy rs2383206, rs1333049 i rs10911021 oznaczono za pomocą specyficznych primerów.

**Wyniki.** W analizie statystycznej nie wykazano istotnych różnic pomiędzy średnim czasem trwania cukrzycy, parametrami metabolicznymi (masa ciała, obwód talii, otyłość, wartości ciśnienia tętniczego krwi, profil lipidowy) ani wywiadem w kierunku palenia tytoniu. Wykazano istotną statystycznie różnicę między grupami pod względem rodzinnego występowania choroby niedokrwiennej serca (70,0% chorych w grupie badanej vs. 45,6% w grupie kontrolnej;  $p < 0,005$ ), nadciśnienia tętniczego (77,1% vs. 47,8%;  $p < 0,005$ ) oraz otyłości (61,2% vs. 49,0%;  $p < 0,05$ ). W analizie genetycznej wykazano, że allel G rs2383206 istotnie częściej występował w badanej grupie (62,4% vs. 44,0%;  $p < 0,00001$ ). Homozygoty GG stanowiły 39,4% grupy badanej oraz 18,8% grupy kontrolnej ( $p = 0,0001$ ). Iloraz szans (OR) wystąpienia wczesnej choroby niedokrwiennej serca wynosił 2,81; 95-procentowy przedział ufności

Adres do korespondencji:

lek. Joanna Wójcik-Odyniec

Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii USK im. WAM

— Centralny Szpital Weteranów

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

e-mail: wojcik.joanna1@gmail.com

Tłumaczenie: lek. Małgorzata Kamińska

Nadesłano: 17.11.2015

Przyjęto do druku: 04.02.2016

(95% CI) 2,39–3,24, a po skorygowaniu względem innych tradycyjnych czynników ryzyka wartość OR zmniejszyła się do 2,58. Homozygoty GG istotnie częściej występowały u chorych z niewyrównaną glikemią [wartość hemoglobiny glikowanej ( $HbA_{1c}$ )  $\geq 7\%$  — 41,3% vs. 15,9;  $p = 0,0011$ ] oraz szczupłych [wskaźnik masy ciała (BMI)  $< 30 \text{ kg/m}^2$  — 39,7% vs. 18,2%;  $p = 0,0002$ ]. Podobny związek między wczesnym występowaniem choroby niedokrwiennej serca obserwowano w przypadku innego polimorfizmu w regionie 9p21 rs1333049. Częstość allelu C była znamienne wyższa w u chorych z wczesną chorobą niedokrwinną serca (56,3% vs. 43,4,  $p = 0,0036$ ). Homozygoty CC stanowiły w tej podgrupie 31,6%, natomiast w grupie kontrolnej — 17,4% ( $p = 0,0083$ ). Iloraz szans wynosił 2,2 (95%CI 1,83–2,56), a po skorygowaniu względem innych czynników ryzyka — 1,96. Nie obserwowano istotnej statystycznie różnicy pod względem dystrybucji genotypów rs10911021 w badanych grupach.

**Wnioski.** Uzyskane przez autorów wyniki pozwalają potwierdzić, że polimorfizmy w regionie 9p21 wpływają na wczesny wiek wystąpienia choroby niedokrwiennej serca u osób chorych na cukrzycę typu 2, szczególnie w grupie szczupłych chorych z niewyrównaną glikemią.

**Słowa kluczowe:** cukrzyca typu 2,  $HbA_{1c}$ , ChNS, genetyka, 9p21, 1q25, polimorfizm

## ABSTRACT

**Introduction.** Type 2 diabetes (T2DM) is an important risk factor for development of coronary artery disease (CAD) and its complications. Recent genetic studies revealed possible association between those two conditions on the genome level. In our study we analysed whether polymorphisms in loci 1q25 and 9p21, previously characterized as risk factors of CVD, have an influence on early-onset CAD in T2DM patients.

**Materials and methods.** Our case-control study included 338 patients suffering from T2DM and CAD. For the study purpose the cohort was divided into two groups based on the age of CAD onset: case group with early-onset CAD ( $< 55$  for males and  $< 65$  years for females,  $n = 180$ ) and control group ( $\geq 55$  and  $\geq 65$  years respectively,  $n = 158$ ). Epidemiological data was taken from medical history and retrospective questionnaire; blood samples were collected. The rs2383206, rs1333049 and rs10911021 were genotyped using method of fluorescently labelled allele specific oligonucleotides.

**Results.** Statistical analysis did not reveal any significant differences between two groups in the mean duration of diabetes, metabolic parameters (weight,

waist circumference, frequency of obesity according to BMI, mean blood pressure or lipids levels) and smoking history. There were statistical differences between groups in family incidence of CAD (70.0% patients in cases vs. 45.6% in controls;  $p < 0.005$ ), hypertension (77.1% vs. 47.8%;  $p < 0.005$ ) and obesity (61.2% vs. 49.0%;  $p < 0.05$ ). Genetic analysis revealed that frequency of the G allele of rs2383206 in 9p21 region was significantly higher in cases than in controls (62.4% vs. 44.0%  $p < 0.00001$ ). Homozygotes GG were 39.4% of cases and 18.8% in controls ( $p = 0.0001$ ). The OR for increased risk of early CAD in GG homozygotes was 2.81, 95% CI: 2.39–3.24, after adjustment for conventional risk factors it was reduced to 2.58. There was statistically significantly higher frequency of GG homozygotes among patients with poor glycaemic control ( $HbA_{1c} \geq 7\%$ ; 41.3% vs. 15.9;  $p = 0.0011$ ) and non-obese subjects (BMI  $< 30 \text{ kg/m}^2$ ; 39.7% vs. 18.2%,  $p = 0.0002$ ). Similar association between genotype and risk of early CAD was found for another polymorphism rs1333049 in 9p21 region. Frequency of allele C was significantly higher in cases than in controls (56.3% vs. 43.4,  $p = 0.0036$ ) and homozygotes CC were 31.6% in cases and 17.4% in controls ( $p = 0.0083$ ). OR for this association was 2.2 (95% CI: 1.83–2.56); after adjustments 1.96. We didn't find any association between genotypes distribution of rs10911021 and early onset of CAD.

**Conclusions.** Our findings clearly suggest that polymorphisms in 9p21 region have an influence on development of early-onset CAD in T2DM, especially in non-obese patients and subjects with poor glycaemic control.

**Key words:** T2DM,  $HbA_{1c}$ , CAD, genetics, 9p21, 1q25, polymorphism

## Wstęp

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD, *cardiovascular diseases*) to ważny problem medyczny i ekonomiczny w krajach wysoko uprzemysłowionych. Według danych statystycznych choroba niedokrwienność serca (CAD, *coronary artery disease*), udar mózgu i inne zakrzepowe zdarzenia tętnicze stanowią główną przyczynę niepełnosprawności i zgonów u osób w średnim i podeszłym wieku [1, 2]. Z uwagi na to, że medyczne następstwa udaru mózgu i zawału serca są często nieodwracalne i prowadzą do długotrwałego obciążenia systemu opieki zdrowotnej podstawową rolę w leczeniu chorych z CVD odgrywają profilaktyka i wczesne wdrożenie terapii. Warunkiem skutecznego zapobiegania CVD jest wykrycie czynników ryzyka i optymalny wybór opcji terapeutycznych. Niektóre czynniki ryzyka CVD, to jest hipertriglicerydemia, otyłość, palenie tytoniu, nadużywanie alko-

holu, zależą w głównej mierze od chorego i najlepszym sposobem ich wyeliminowania jest zmiana stylu życia. Inne czynniki, na przykład wiek, płeć i cechy genetyczne, nie podlegają modyfikacji, ale należy je uwzględnić w całkowitej ocenie ryzyka CVD u danej osoby.

W ciągu ostatnich 20 lat w badaniach genetycznych zidentyfikowano wiele polimorfizmów i mutacji przyczyniających się do zwiększonego ryzyka i gorszego przebiegu zdarzeń sercowo-naczyniowych. Udało się dobrze scharakteryzować rolę niektórych genów w patogenezie udaru mózgu i zawału serca. Nadal jednak istnieje wiele *loci* genomu, o których wiadomo, że są ważne w rozwoju CVD, ale nie poznano struktury ani funkcji tych genów. Te „gorące miejsca” (*hot places*) zidentyfikowano głównie za pomocą wielokrotnej analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) w badaniach całego genomu mających na celu znalezienie asocjacji między wariantami genetycznymi a podatnością na powszechnie występujące choroby. Stosując metodę badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS, *genome-wide association studies*), tylko w odniesieniu do CAD wykryto ponad 50 ważnych *loci* [4–7]. Dotychczas biologiczną rolę i możliwy mechanizm działania określono jednak tylko w przypadku niespełna 50% wykrytych polimorfizmów. Większość genów istotnych w rozwoju CVD wiąże się głównie z metabolizmem lipidów (*LPA, SORT1, LDLR, APOE*) lub stabilizowaniem ciśnienia tętniczego (*ACE, AT1R, SH2B3*) [13–15]. Inne geny kandydaci, zidentyfikowane w wielu regionach genomu, takich jak: 1q41, 2q36, 6p24, 9p21, 10q11.21 lub 15q25, prawdopodobnie uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego, wzroście tkanek, homeostazie, fibrynolizie i odpowiedzi zapalnej. Nie wyjaśniono ich bezpośredniego mechanizmu działania w rozwoju miażdżycy. Dalsze badania nad szlakami molekularnymi związanymi z predyspozycją genetyczną do CVD mogą pomóc w opracowaniu nowych skutecznych terapii przydatnych w zapobieganiu i leczeniu chorób naczyniowych [8–12].

Cukrzyca typu 2 (DM2, *type 2 diabetes mellitus*) jest niezależnym czynnikiem ryzyka CVD. Żle wyrównana cukrzyca prowadzi do rozwoju angiopatii. Szkodliwy wpływ DM2 na układ naczyniowy zwiększają dodatkowo współistniejące zaburzenia, na przykład dyslipidemia lub nadciśnienie tętnicze. U chorych na cukrzycę CVD rozwija się wcześniej niż u osób bez cukrzycy. Ponadto CVD u chorych na cukrzycę może przebiegać bezobjawowo, przyczyniając się tym samym do zwiększonego ryzyka zgonu obserwowanego w tej grupie chorych. Dlatego właściwa ocena ryzyka CVD nabiera tutaj szczególnego znaczenia [1–3].

U chorych na cukrzycę występują te same genetyczne czynniki ryzyka co w populacji ogólnej, jednak

całkowity wpływ mechanizmów metabolicznych i genetycznych może być odmienny niż w u osób bez cukrzycy. W pierwszym badaniu GWA wykazano możliwe patofizjologiczne powiązania między CVD a cukrzycą, ponieważ różne polimorfizmy w regionie 9p21 wiązały się z ryzykiem zarówno CAD, jak i cukrzycy [4, 5]. Wyniki kolejnych badań analizujących zależności między genomem a cechami klinicznymi CAD w przebiegu cukrzycy były sprzeczne, czego można było oczekiwać z uwagi na zróżnicowanie grup, mieszane podłoże genetyczne, ograniczenia metodologiczne i stosowanie różnych wielozmiennowych modeli statystycznych [17, 18]. W ostatnim czasie zidentyfikowano nowe, wysoce swoiste dla cukrzycy genetyczne czynniki ryzyka CVD Polimorfizm w regionie 1q25 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem CAD u chorych na cukrzycę, natomiast nie powoduje wzrostu ryzyka u osób bez cukrzycy. Warianty genetyczne 1q25 wpływają na szlak glutaminianu przez regulację ekspresji ligazy glutaminianu amonowego, kodowanej przez gen *GLUL* zlokalizowany w regionie 1q25 [19, 20].

Badanie przeprowadzono w celu oceny wpływu dwóch regionów genomu 9p21 i 1q25, o ustalonym już związku z CVD, na wczesną zapadalność na CAD i jej przebieg kliniczny u chorych na cukrzycę. Wybrano te regiony, ponieważ wykazano wcześniej, że są one ważnymi czynnikami ryzyka rozwoju przedwczesnej CAD w populacji ogólnej oraz u chorych na cukrzycę. Ponadto wyniki niektórych wcześniejszych badań sugerowały istnienie silnej korelacji między uwarunkowanymi genetycznie czynnikami ryzyka CAD a niedostateczną kontrolą metaboliczną cukrzycy oraz innymi zaburzeniami metabolicznymi. Dlatego w analizie danych autorzy skupili się zwłaszcza na potencjalnym efekcie kumulacyjnym złej kontroli glikemii i/lub obecności innych metabolicznych czynników ryzyka na ostateczny wpływ polimorfizmu genów.

## Materiał i metody

### Kryteria włączenia do badania i dobór pacjentów

Niniejsze badanie kliniczno-kontrolne zostało zaprojektowane jako analiza retrospektywna i objęło 338 chorych na DM2 ze współistniejącą CAD. Chorobę niedokrwienną serca zdefiniowano jako przebyte ostrego zawału serca, implantację stentu do tętnicy wieńcowej lub zwężenie jednej z głównych tętnic wieńcowych o więcej niż 50% potwierdzone w koronarografii (240 chorych) lub rozpoznanie CAD w dokumentacji medycznej z odpowiednimi zmianami w zapisie elektrokardiograficznym (EKG) — 98 chorych. Chorych rekrutowano z bazy danych ośrodków diabetologicznych i kardiologicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

**Tabela 1. Epidemiologiczna i kliniczna charakterystyka badanych grup. Grupę badaną tworzą osoby z „wczesnym początkiem” CAD, tzn. przed 65 rokiem życia u kobiet i przed 55 rokiem życia u mężczyzn. Grupa kontrolna obejmowała osoby z „późnym początkiem” CAD (CAD rozpoznana w wieku  $\geq 65$  lat u kobiet i  $\geq 55$  lat u mężczyzn)**

Parametr	Grupa badana (n = 180)	Grupa kontrolna (n = 158)	p
Współczynnik kobiety/mężczyźni (%)	51,1	31,0	< 0,005
Średni wiek w latach ( $\pm$ SD)	68,3 $\pm$ 9,3	74 $\pm$ 8,9	
Średni wiek w momencie rozpoznania CAD ( $\pm$ SD)	51,2 $\pm$ 8,1	65,2 $\pm$ 6,96	< 0,00001
Zapadalność na MI (%)	74,7	68,4	0,2314
Średni wiek w czasie pierwszego MI ( $\pm$ SD)	55,8 $\pm$ 11,3	65,7 $\pm$ 8,8	< 0,00001
Zapadalność na AH (%)	93,3	92,9	0,8876
Średni wiek w momencie rozpoznania AH ( $\pm$ SD)	49,5 $\pm$ 8,5	56,2 $\pm$ 9,6	< 0,00001
Średni wiek w momencie rozpoznania DM2 ( $\pm$ SD)	53,9 $\pm$ 9,5	60,6 $\pm$ 9,9	< 0,00001
Średni czas trwania DM ( $\pm$ SD)	13,9 $\pm$ 9,8	13,2 $\pm$ 8,9	0,597
Zapadalność na udar mózgu (%)	19,2	15,2	0,3686
Palenie tytoniu (obecnie lub w przeszłości) (%)	69,9	70,8	0,8831

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe; CAD (coronary artery disease) — choroba niedokrwienna serca; MI (myocardial infarction) — zawał serca; AH (arterial hypertension) — nadciśnienie tętnicze; DM2 (type 2 diabetes mellitus) — cukrzyca typu 2

**Tabela 2. Parametry metaboliczne i biochemiczne w grupach badanej i kontrolnej**

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	p
Średnia masa ciała [kg $\pm$ SD]	86,8 $\pm$ 15,1	85,1 $\pm$ 15,8	0,401
Średni wzrost [cm $\pm$ SD]	166,6 $\pm$ 8,7	168,4 $\pm$ 8,4	0,07
Średnie BMI [kg/m <sup>2</sup> $\pm$ SD]	31,2 $\pm$ 4,5	29,9 $\pm$ 4,7	0,006
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup> (%)	44,8	55,0	0,0682
BMI $\geq 30$ < 35 kg/m <sup>2</sup> (%)	32,2	30,5	0,7389
BMI $\geq 35$ kg/m <sup>2</sup> (%)	23,0	14,6	0,054
Talia [cm $\pm$ SD]	108,5 $\pm$ 10,1	106,5 $\pm$ 13,5	0,201
Talia $\geq 80$ cm K, $\geq 94$ cm M (%)	95,1	88,9	0,08
Cholesterol całkowity [mmol/l $\pm$ SD]	4,4 $\pm$ 1,33	4,5 $\pm$ 1,2	0,395
Cholesterol frakcji LDL [mmol/l $\pm$ SD]	2,4 $\pm$ 1,05	2,4 $\pm$ 1,07	0,942
Cholesterol frakcji HDL [mmol/l $\pm$ SD]	1,3 $\pm$ 0,56	1,4 $\pm$ 0,55	0,1311
Triglicerydy [mmol/l $\pm$ SD]	2,3 $\pm$ 1,74	2,0 $\pm$ 1,25	0,116
HbA <sub>1c</sub> (% $\pm$ SD)	7,9 $\pm$ 0,17 (n = 113)	7,8 $\pm$ 0,19 (n = 98)	0,595

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe; BMI (body mass index) — wskaźnik masy ciała; HbA<sub>1c</sub> — hemoglobina glikowana

Wszystkie osoby włączone do badania były polskimi obywatelami rasy kaukaskiej, mieszkającymi w Polsce centralnej. Z badania wykluczono chorych z cukrzycą typu 1, typu 3, kobiety z cukrzycą ciążową, chorych w stanie przedcukrzycowym, a także pacjentów ze zgłoszoną, lecz niepotwierdzoną CAD.

#### Procedury wykonywane w ramach badania

Protokół badania został zaaprobowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszyscy chorzy wyrazili pisemnie zgodę na udział

w badaniu przed jego rozpoczęciem. U wszystkich uczestników przeprowadzono badania przedmiotowe oraz pobrano próbki krwi na czczo do badań laboratoryjnych. Dane dotyczące przebytych chorób i wywiadu rodzinnego, nawyków zdrowotnych i nałogów (palenie tytoniu, spożywanie alkoholu), stosowanych leków, stężeń lipidów w surowicy i wartości hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) (mierzonych do 6 miesięcy przed badaniem) uzyskano retrospektywnie z dokumentacji medycznej. Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabelach 1–3.

**Tabela 3. Ryzyko względne wczesnego wystąpienia choroby niedokrwiennej serca w zależności od występowania konwencjonalnych czynników ryzyka w badanych grupach**

Czynnik ryzyka	OR
Palenie tytoniu w przeszłości	1,045
Palenie tytoniu obecnie	0,93
BMI < 30 kg/m <sup>2</sup>	0,7
BMI 30–35 kg/m <sup>2</sup>	1,08
BMI > 35 kg/m <sup>2</sup>	1,75
Insulinoterapia	1,24
Nadciśnienie tętnicze	1,06
HbA <sub>1c</sub> ≥ 7%	1,11
Cholesterol frakcji LDL > 1,9 mmol/l	1,03
Płeć (M/K)	2,3

OR (odds ratio) — iloraz szans

### Analiza genetyczna

DNA genomowe wyekstrahowano z granulocytów i limfocytów z próbek pełnej krwi, stosując zestaw Kit AxyPrepMiniprep (AXYGEN) zgodnie ze standardowym protokołem.

Polimorfizmy genów 9p21 (rs2383206 i rs1333049) oraz 1q25 (rs10911021) genotypowano przy użyciu testu do analizy SNP TaqMan (Applied Biosystems). Zgodnie z wymogami kontroli jakości każda 96-dołkowa płytką zawierała 6 wybranych losowo duplikatów.

### Analiza statystyczna

Wyniki odnoszące się do zmiennych ciągłych przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD, *standard deviation*) lub odsetki. Ocena normalności rozkładu ciągłych zmiennych oceniono, stosując test Shapiro-Wilka. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-Studenta (w przypadku rozkładu normalnego) lub test U-Manna-Whitneya (w przypadku rozkładu niemającego cech rozkładu normalnego). Dane kategoryczne oceniono za pomocą testu  $\chi^2$ . Do oceny równowagi Hardy'ego-Wienberga i dystrybucji genotypów w obu podgrupach wykorzystano test  $\chi^2$ . Powiązania między każdym z genotypów a wczesnym początkiem CAD zbadano, stosując analizę logistyczną, i oszacowano jako ilorazy szans (OR, *odds ratio*) z 95-procentowym przedziałem ufności (CI, *confidence interval*). Utworzono modele recesywny i dominujący w celu oszacowania skorygowanego i nieskorygowanego OR dla wszystkich SNP. Analizę statystyczną przeprowadzono, korzystając z programu Microsoft Excel dla systemu Windows v. XP. Jako próg istotności statystycznej przyjęto wartości  $p < 0,05$ .

## Wyniki

### Osoby badane

Do badania włączono 338 chorych na DM2 z CAD. Podzielono ich na dwie grupy: pierwszą (badaną), którą stanowiły osoby z wczesnie rozpoznaną CAD [kobiety w wieku < 65 lat i mężczyźni w wieku < 55 lat ( $n = 180$ )], i drugą — kontrolną (CAD rozpoznana u kobiet i mężczyzn odpowiednio w wieku  $\geq 65$  lat i  $\geq 55$  lat,  $n = 158$ ). Jak oczekiwano, średni wiek w momencie rozpoznania CAD był niższy w pierwszej grupie ( $51,2 \pm 8,1$  roku) niż w grupie kontrolnej ( $65,2 \pm 6,95$  roku;  $p < 0,05$ ). W grupie pierwszej odsetek kobiet był istotnie większy niż w grupie kontrolnej (51% vs. 31%;  $p < 0,05$ ). Zapadalność na zawał serca (MI, *myocardial infarction*) była podobna w obu grupach (74,7% vs. 68,4%;  $p = 0,1862$ ), lecz średni wiek wystąpienia pierwszego MI był niższy w grupie z wczesnym początkiem CAD ( $55,8 \pm 11,3$  vs.  $65,7 \pm 8,8$ ;  $p = 0,00001$ ). Stwierdzono jednak, że w grupie kontrolnej MI był częściej pierwszym objawem klinicznym choroby serca. Nadciśnienie tętnicze występowało powszechnie w obu grupach (93,3% vs. 92,9%), jednak wiek chorych w momencie zdiagnozowania nadciśnienia był niższy w pierwszej grupie ( $49,6 \pm 8,5$  vs.  $56,0 \pm 9,8$ ,  $p < 0,00001$ ). U osób z wczesnie rozpoznaną CAD również istotnie wcześniej rozpoznawano cukrzycę ( $53,9 \pm 9,5$  vs.  $60,6 \pm 9,93$  roku;  $p < 0,00001$ ) w porównaniu z grupą kontrolną, ale średni czas trwania cukrzycy, stosowane leczenie i liczba wstrzyknięć insuliny były podobne w obu grupach. Nie stwierdzono różnic między grupami pod względem palenia tytoniu (69,9% vs. 70,8%) ani zapadalności na udar mózgu (19,2% vs. 15,5%;  $p = 0,36$ ). Średnia masa ciała i obwód talii były niemal takie same w obu grupach. Wykazano niewielką, lecz statystycznie istotną różnicę w zakresie wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*) ( $31,2 \pm 4,5$  cm w grupie z wczesnie rozpoznaną CAD vs.  $29,9 \pm 4,7$  cm w grupie kontrolnej;  $p = 0,006$ ), jednak nie stwierdzono istotnej różnicy między grupami pod względem występowania otyłości (BMI > 30) (32,2% vs. 30,5%,  $p \leq 0,7389$ ). Grupy nie różniły się również istotnie pod względem stężeń lipidów we krwi ani wartości HbA<sub>1c</sub>. Ilorazy szans wczesnego rozwoju CAD oszacowany dla pojedynczych czynników ryzyka przedstawiono w tabeli 3. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice między grupami pod względem występowania dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku CAD (70,0% w grupie z wczesnie rozpoznaną CAD vs. 45,6% w grupie kontrolnej;  $p < 0,00001$ ), otyłości (61,2% vs. 49,0%;  $p < 0,0297$ ), cukrzycy (51,5% vs. 28,4%,  $p < 0,0023$ ) i nadciśnienia tętniczego (77,1% vs. 47,8%;  $p < 0,00001$ ), co przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4. Znaczenie dziedzicznej predyspozycji do choroby niedokrwiennej serca (CAD, coronary artery disease) i chorób związanych z CAD we wczesnym rozwoju CAD u chorych na cukrzycę. Wywiad rodzinny uważa się za dodatni w przypadku występowania choroby u krewnych pierwszego stopnia**

	Grupa badana	Grupa kontrolna	p
Dodatni wywiad rodzinny dotyczący CAD (%)	70,0	45,6	< 0,00001
Dodatni wywiad rodzinny dotyczący otyłości (%)	61,2	49,0	0,0297
Dodatni wywiad rodzinny dotyczący cukrzycy (%)	51,5	28,4	0,0023
Dodatni wywiad rodzinny dotyczący nadciśnienia tętniczego (%)	77,1	47,8	< 0,00001

#### Analiza polimorfizmu w regionach 9p21 i 1q24

Częstość występowania alleli związanych z CAD SNP w regionie 9p21 (rs2383206 i rs1333049) oraz w regionie 1q25 (rs10911021) były w obu badanych grupach zgodne z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga.

W przypadku obu SNP w regionie 9p21 występowały istotne różnice pod względem częstości alleli i genotypów między grupą z wczesnią rozpoznaną CAD a grupą kontrolną. Określony wcześniej allel ryzyka G był obecny w *locus* rs2383206 (tab. 5) u 62,4% chorych z wczesnym początkiem CAD w porównaniu z 44% w grupie kontrolnej ( $p < 0,00001$ ). Genotyp G/G związany z ryzykiem CAD był obecny u 39,4% osób w grupie z wczesnią rozpoznaną CAD i 18,8% w grupie kontrolnej ( $p = 0,0001$ ). Na potrzeby badania, na podstawie wcześniejszych publikacji, zastosowano recesywny model analizy SNP (GG vs. AA + AG); różnica w częstości występowania genotypu między grupami była równoważna ze zwiększonym ryzykiem wczesnej CAD

u homozygot GG (OR 2,81, 95% CI 2,39–3,24). W analizie wielozmiennowej uzyskanych danych skorygowanie względem wszystkich konwencjonalnych czynników ryzyka CVD (płeć, otyłość, palenie tytoniu i nadciśnienie tętnicze w wywiadzie, stężenia lipidów, kontrola glikemii) spowodowało tylko nieznacznie zmniejszenie OR dla SNP w *locus* rs2383206 (z 2,81 do 2,58).

W przypadku oceny kolejnych SNP w regionie 9p21, rs1333049 stwierdzono podobne różnice w częstości alleli (tabela 6), chociaż analizę przeprowadzono w mniejszej grupie chorych ( $n = 276$ ). Allel C, którego związek z ryzykiem CAD został potwierdzony, występował częściej w grupie z wczesnią rozpoznaną CAD niż w grupie kontrolnej (56,3% vs. 43,4%,  $p = 0,0036$ ). Częstość homozygot CC w modelu recesywnym wynosiła 31,6% u chorych z wczesnią CAD i 17,4% w grupie kontrolnej ( $p = 0,0083$ ). W analizie regresji logistycznej ryzyko wczesnego rozwoju CAD u osób z genotypem CC było istotnie wyższe (OR 2,2, 95% CI 1,83–2,91, skorygowany OR 1,96).

W analizie genetycznej polimorfizmu w *locus* 1q25: rs10911021 (związanego ze szlakiem glutaminianu) nie wykazano istotnej różnicy w częstości alleli i genotypów między obiema grupami (dane niepublikowane).

#### Zależność między genotypem 9p21 a fenotypem klinicznym

Niewłaściwa kontrola glikemii u chorych na cukrzycę znacząco wpływa na ryzyko wczesnego początku CAD związane z 9p21 (ryc. 1). Odsetek chorych, u których wartości HbA<sub>1c</sub> przekraczały 7% i występował genotyp ryzyka G/G, wynosił 41,3% w grupie pacjentów z wczesnią rozpoznaną CAD i tylko 15,9% w grupie kontrolnej ( $p = 0,0011$ ). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnej różnicy między częstością genotypu GG w obu grupach a niskimi wartościami HbA<sub>1c</sub> wynoszącymi poniżej 7% (31,6% vs. 22,9;  $p = 0,4039$ ). Wartość OR określająca ryzyko wczesnej CAD u homozygot GG z HbA<sub>1c</sub> powyżej 7% wynosiła 3,73, natomiast całkowity OR (oceniany niezależnie od wartości HbA<sub>1c</sub>) wynosił

**Tabela 5. Rozkład genotypów i częstość występowania alleli genu rs2383206 z oceną ilorazu szans (OR, odds ratio) wczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca (CAD, coronary artery disease) u nosicieli allelu ryzyka [OR w modelu recesywnym (GG vs. AA+AG)]**

rs2383206	Grupa badana (n = 170) (%)	Grupa kontrolna (n = 149) (%)	p	OR	95% CI	Skorygowany OR*
A/A	14,7	30,9	0,0005	0,4		
A/G	45,9	50,3	0,4270	0,8		
G/G	39,4	18,8	0,0001	2,8	2,39–3,24	2,57

\*Skorygowane względem: płci (K/M); nadciśnienia tętniczego (T/N); stężenia cholesterolu całkowitego < 4,5; stężenia cholesterolu frakcji LDL > 1,9; stężenia cholesterolu frakcji HDL < 1,0; stężenia triglicerydów  $\geq 1,7$ ; wskaźnika masy ciała  $\geq 35$ / $< 35$  kg/m<sup>2</sup>; palenia tytoniu obecnie (T/N); wartości HbA<sub>1c</sub> ( $\geq 7\%$ )

**Tabela 6. Rozkład genotypów i częstość występowania alleli genu rs1333049 oraz ocena ilorazu szans (OR, *odds ratio*) wczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca (CAD, *coronary artery disease*) u nosicieli allelu ryzyka [OR w modelu recesywnym (CC vs. GG+CG)]**

rs1333049	Grupa badana (n = 136) (%)	Grupa kontrolna (n = 121) (%)	p	OR	95% CI	Skorygowany OR*
G/G	19,1	30,6		0,54		
C/G	49,3	52,1		0,89		
C/C	31,6	17,4	0,0083	2,2	1,83–2,58	1,97

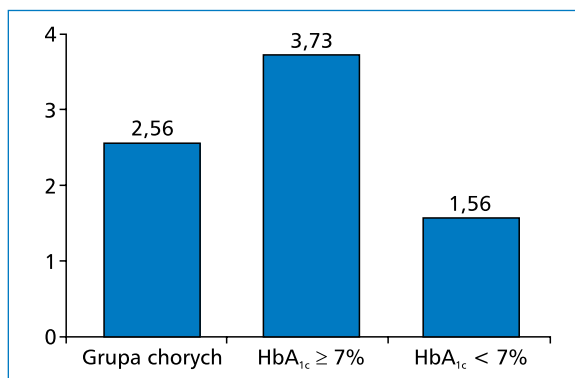
\*Skorygowane względem: płci (K/M); nadciśnienia tętniczego (T/N); stężenia cholesterolu całkowitego < 4,5; stężenia cholesterolu frakcji LDL > 1,9; stężenia cholesterolu frakcji HDL < 1,0; stężenia triglicerydów  $\geq 1,7$ ; wskaźnika masy ciała  $\geq 35$ / $< 35$  kg/m<sup>2</sup>; palenia tytoniu obecnie (T/N); wartości HbA<sub>1c</sub> ( $\geq 7\%$ )

2,81 (tab. 6). Niższe wartości HbA<sub>1c</sub> (< 7%) wiązały się ze zmniejszeniem OR wczesnego rozwoju CAD zależnego od genotypu do 1,56. Genotyp G/G występował częściej u chorych z wczesną CAD i złym wyrównaniem glikemii (31,6%) niż u osób z późnym początkiem CAD i dobrą kontrolą glikemii (HbA<sub>1c</sub> < 7%) (22,9%), jednak różnica ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (p = 0,403). Co ciekawe, u chorych z BMI  $\geq 30$  i genotypem G/G w *locus* rs2383206 ryzyko względne wczesnego rozwoju CAD (OR 1,57) w analizie regresji logistycznej było niższe niż u osób nieotyłych (OR 2,96) (ryc. 2).

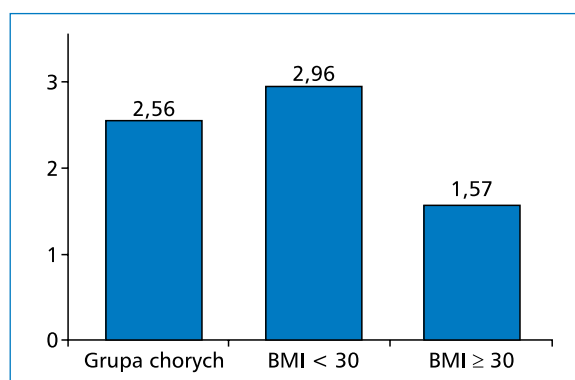
## Dyskusja

Na znaczenie polimorfizmu genów w patogenezie CVD zwracano uwagę od czasu opublikowania pierwszych wyników GWAS [4, 5]. W niniejszym badaniu skupiono się na 3 polimorfizmach w opisanych wcześniej regionach ludzkiego genomu związanych ze zwiększonym ryzykiem CAD w populacji ogólnej i u chorych na cukrzycę: 9p21 i 1q25 [16, 19, 21, 22], poszukując korelacji tych polimorfizmów z wczesnym początkiem CAD.

Znaczenie regionu 9p21 w patogenezie CVD określono w 2007 roku [4, 5], a następnie potwierdzono w wielu badaniach genetycznych zarówno w populacji ogólnej, jak i wyselekcjonowanych grupach chorych (np. osoby z cukrzycą lub reumatoidalnym zapaleniem stawów) [6, 7, 23]. W przedstawionym badaniu autorzy wykazali, że dwa znane wcześniej polimorfizmy w regionie 9p21 (rs2383206 i rs1333049) odgrywają ważną rolę we wczesnym rozwoju CAD u młodszych chorych na cukrzycę. U nosicieli allelu ryzyka wykazano w analizie regresji logistycznej wyższe ryzyko wczesnej CAD w przypadku obu SNP. Wartości OR powyżej 2,5 związane z *locus* rs2383206 *locus* i powyżej 2,0 dla *locus* rs1333049, po skorygowaniu względem znanych klasycznych czynników ryzyka w modelu regresji logistycznej, wskazywały na silną korelację *loci* w regionie 9p21 z wczesnym początkiem CAD. Obserwacje auto-



**Rycina 1.** Ryzyko wczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca u nosicieli genu GG rs23803206 ze złą kontrolą glikemii (HbA<sub>1c</sub>  $\geq 7\%$ )



**Rycina 2.** Ryzyko wczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca u nosicieli genu GG rs23803206 w zależności od wartości wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*) < 30 kg/m<sup>2</sup> i  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>

rów potwierdzają dane opublikowane wcześniej przez Doria i wsp. na temat wpływu SNP w regionie 9p21 na rozwój CAD u chorych na cukrzycę [24]. Są one również zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat roli regionu 9p21 w progresji zmian w naczyniach wieńcowych, ponieważ u pacjentów, u których występują

allele ryzyka, objawy CAD obserwuje się wcześniej niż u osób niebędących ich nosicielami [25, 26]. Dane dotyczące zwiększonego ryzyka MI u nosicieli tych alleli w regionie 9p21 są sprzeczne — niektórzy autorzy, np. Zhang [27], Saleheen [28] i Abdullah [25], wykazali powiązania z przedwczesnym MI. W niniejszym badaniu nie zaobserwowano istotnie wyższej zapadalności na MI u chorych z wczesnym początkiem CAD. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [29, 30, 32, 33], którzy nie znaleźli związku między wczesnym MI a polimorfizmami w regionie 9p21. Różnice w wynikach poszczególnych badań w odniesieniu do korelacji między genotypem ryzyka a zapadalnością na MI mogą sugerować, że w regionie 9p21 występują dwa odrębne haplobloki: „pro-aterogenny” (zawierający rs2383206 i rs1333049), związany z podatnością na CAD, oraz „prozakrzepowy” związany z ryzykiem MI [37]. Potencjalne korelacje między genotypem a zapadalnością na MI mogły mieć wpływ na wyniki retrospektywnej analizy autorów poprzez „efekt przetrwania”, ponieważ MI jest najważniejszym następstwem CAD związanym z wysoką śmiertelnością. W niniejszym badaniu średni wiek w chwili wystąpienia pierwszego MI był niższy w grupie z wczesnie rozpoznaną CAD, a różnica ta była istotna statystycznie ( $55,8 \pm 11,3$  vs.  $65,7 \pm 8,8$ ;  $p < 0,0001$ ), jednak zapadalność na MI była podobna w obu grupach. Śmiertelność chorych z MI wiąże się z wieloma dodatkowymi czynnikami, na przykład stanem ogólnym i wiekiem chorego, ale również z rozległością zawału. Zdaniem autorów u młodszych pacjentów, u których progresja zmian miażdżycowych przebiega szybciej (z uwagi na predyspozycję genetyczną) i u których szanse na wytworzenie skutecznego krążenia obocznego są mniejsze, ryzyko nagłego zgonu w trakcie pierwszego MI może być większe. Dlatego raczej nie należy oczekiwać „efektu przetrwania” w grupie nosicieli allelu ryzyka, konieczne są jednak dalsze prospektywne badania w celu potwierdzenia tej hipotezy.

Dokładny mechanizm działania SNP w regionie 9p21 w rozwoju CAD nie został w pełni wyjaśniony, ponieważ najistotniejszy allel ryzyka w tym regionie jest zlokalizowany w nonsensownym niekodującym RNA *locus* INK4 (zwanym ANRIL) [34]. Ten obszar genomu może pełnić funkcję regulatorową ekspresji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin kodowanych przez geny *CDKN2A* i *CDKN2B* oraz kontroli cyklu komórkowego i proliferacji komórek [35]. Hamujący wpływ regionu 9p21 na inhibitory kinaz kodowane w chromosomie 9 może być również pośrednio związany ze szlakiem interferonu gamma/STAT1 (ponieważ allel ryzyka w regionie 9p21 jest w nierównowadze sprzężeń z dwoma SNP występującymi w miejscu

wiązania czynnika transkrypcyjnego STAT1). Niemniej związana z regionem 9p21 podatność na CVD zależy od innych czynników ryzyka, na przykład nadciśnienia tętniczego czy stężenia cholesterolu. Z tego względu region 9p21 wydaje się dobrym celem dla nowych terapii w CAD lub udarze mózgu, zwłaszcza biorąc pod uwagę częste występowanie alleli ryzyka w populacji osób rasy kaukaskiej (~75%) i wśród Azjatów [36]. Spośród wszystkich analizowanych czynników ryzyka występowanie homozygot GG (rs2383206) wiąże się z najwyższym OR (tab. 3). Również skorygowanie względem znanych czynników ryzyka w modelu regresji logistycznej nie powoduje zmiany OR oszacowanego dla poszczególnych SNP w regionie 9p21, co sugeruje niezależny, szczególnie mechanizm działania *loci* 9p21 w rozwoju przedwczesnej CAD.

Autorzy niniejszej pracy zidentyfikowali również zaburzenia metaboliczne mogące wpływać na ryzyko wczesnej CAD związane z regionem 9p21. Niekorzystne oddziaływanie biologiczne rs2383206 na rozwój CAD może być znacznie nasilone u chorych ze złą kontrolą glikemii (ryc. 1). Te obserwacje pokrywają się z doniesieniami Doria i wsp. dotyczącymi znaczenia czynników genetycznych i metabolicznych w patogenezie CAD w przebiegu cukrzycy [24]. Ponadto autorzy zaobserwowali, że negatywny wpływ polimorfizmu w regionie 9p21 na wczesny początek CAD u chorych na cukrzycę jest szczególnie wyraźny u osób nieotyłych (BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>). Biorąc pod uwagę, że otyłość jest czynnikiem ryzyka zarówno cukrzycy, jak i CAD (również w analizowanych grupach OR wynosił 1,57), wydaje się zaskakujące, że osoby z optymalną lub suboptymalną masą ciała mogą być bardziej podatne na wczesny rozwój CAD (ryc. 2). To pokazuje, że otyłość i predyspozycja do CAD związana z regionem 9p21 są niezależnymi czynnikami ryzyka miażdżycy tętnic wieńcowych, a także sugeruje, że niekorzystny wpływ nosicielstwa obu alleli ryzyka w regionie 9p21 jest bardziej widoczny u osób nieotyłych. Ponadto obserwacja ta może świadczyć o tym, że genetyczne czynniki ryzyka są ważniejsze niż czynniki metaboliczne i że należy je uwzględnić w skalach oceny ryzyka.

Oprócz regionu 9p21 w badaniu analizowano również inny polimorfizm w chromosomie 1 związany z ryzykiem CAD: rs10911021 [19, 37]. Nie stwierdzono związku między polimorfizmem w *locus* rs10911021 w regionie 1q25 a ryzykiem przedwczesnej CAD. Aktywność genu *GLUL* (regulator ekspresji ligazy glutamianu amonowego) zlokalizowanego w regionie 1q25 jest swoiście i wybiórczo związana z ryzykiem CAD w cukrzycy [19, 20]. Dlatego rs10911021 wydawał się dobrym kandydatem do badania. Nie udało się jednak



wykazać różnic w częstości występowania alleli ani genotypów między grupą badaną a grupą kontrolną. Być może brak różnic jest spowodowany po prostu tym, że wszyscy włączeni do badania pacjenci są chorzy na DM2, a związana z regionem 1q25 predyspozycja do CAD może zależeć od binarnej kombinacji alleli. Dlatego fenotyp związany z SNP rs10911021 może determinować zapadalność na CAD, ale nie wpływać na czas jej wystąpienia.

Mocną stroną badania były ściśle kryteria doboru badanej próby — polska populacja chorych na DM2 ze współistniejącą CAD — oraz wartość  $p$  dla powiązań. Metoda genotypowania TaqMan z zastosowaniem zaprojektowanych wcześniej primerów charakteryzuje się wiarygodnością, a duplikaty umożliwiają potwierdzenie dokładności wyników. Jednak niniejsze badanie ma również pewne ograniczenia, na przykład stosunkowo małą liczebność próby (umożliwiającą identyfikację bardziej swoistych podgrup i wykonanie dalszych analiz genetycznych w określonych kohortach) oraz różnice w proporcji mężczyzn i kobiet (co zdaniem autorów można zignorować, ponieważ kryteria włączenia były odmienne w zależności od płci). Oceniając jego rezultaty, należy również pamiętać o tym, że analizy miały charakter retrospektywny. Jak wspomniano wcześniej, raczej nie należy oczekiwać „efektu przetrwania” w kontekście uzyskanych wyników. Pewien wpływ na nie mogły mieć inne ograniczenia swoiste dla badań retrospektywnych, na przykład ciągłe zmiany standardów medycznych rozpoznawania i leczenia obu chorób, a także poprawa stanu zdrowia pacjentów w następstwie wczesnego wdrożenia leczenia DM2 i CAD obserwowana w ostatnim dziesięcioleciu. Należy to również brać pod uwagę, interpretując przedstawione przez autorów dane.

Podsumowując, autorzy potwierdzili znaczenie regionu 9p21 jako ważnego czynnika ryzyka CAD u chorych na DM2. Stwierdzono silny związek między częstością SNP (GG w przypadku rs2383206 i CC w przypadku rs1333049) a ryzykiem wczesnego początku CAD. Predyspozycja genetyczna związana z regionem 9p21 jest niezależna od innych znanych czynników ryzyka ocenianych u uczestników badania. Ponadto wpływ polimorfizmów w regionie 9p21 ulega nasileniu w przypadku złej kontroli glikemii ( $HbA_{1c} > 7\%$ ) i wydaje się szczególnie wyraźny u chorych z prawidłowym lub nieznacznie podwyższonym BMI ( $< 30 \text{ kg/m}^2$ ). Ponieważ występowanie polimorfizmów to czynnik stabilny/stały, niezmienny się w ciągu całego życia, genotypowanie pozwoliłoby zidentyfikować grupę chorych, u których szczególnie zalecane byłoby leczenie profilaktyczne i modyfikacja stylu życia. W związku z tym, że dane na temat genetycznej podatności na

CVD są znane już od pewnego czasu, dodanie nawet jednego, dobrze scharakteryzowanego polimorfizmu do skali oceny ryzyka CAD może istotnie zwiększyć ich wartość prognostyczną i dokładność.

*Praca uzyskała grant Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego dla młodych naukowców przekazany Joannie Wójcik-Odyniec w maju 2011 roku.*

*Autorzy składają podziękowanie Danielowi Wójcikowi za pomoc przy analizie statystycznej danych.*

## Piśmiennictwo

1. Sieradzki J. Cukrzyca. Tom 1. Via Medica, Gdańsk 2015.
2. Joslin's Diabetes Mellitus. Khan R. (red). Lippincott Williams & Wilkins, Boston 2005.
3. Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. Medycyna Praktyczna, Kraków 2014.
4. McPherson R., Pertsemlidis A., Kavaslar N. i wsp. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; 316: 1488–1491.
5. Helgadottir A., Thorleifsson G., Manolescu A. i wsp. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; 316: 1491–1493.
6. Samani N.J., Erdmann J., Hall A.S. i wsp. WTCCC and the Cardiogenics Consortium, Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 443–453.
7. Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661–678.
8. Samani N.J., Braund P.S., Erdmann J. i wsp. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. *J. Mol. Med. (Berl)* 2008; 86: 1233–1241.
9. Qi L., Ma J., Qi Q., Hartiala J., Allayee H., Campos H. Genetic risk score and risk of myocardial infarction in Hispanics. *Circulation* 2011; 123: 374–380.
10. Roberts R., Stewart A.F. Genes and coronary artery disease: where are we? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 60: 1715–1721.
11. Doria A., Abumrad N.A. Genome-wide associations and metabolic disease: the big revolution. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2008; 11: 363–365.
12. Dandona S., Roberts R. The role of genetic risk factors in coronary artery disease. *Curr. Cardiol. Rep.* 2014; 16: 479.
13. Dauriz M., Meigs J.B. Current insights into the joint basis of type 2 diabetes and coronary heart disease. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* 2014; 8: 368–388.
14. Munir M.S., Wang Z., Alahdab F. i wsp. The association of 9p21-3 locus with coronary atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2014; 15: 66.
15. Yamada Y., Ichihara S., Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med.* 2008; 2: 7–22.
16. Silander K., Tang H., Myles S. i wsp. Worldwide patterns of haplotype diversity at 9p21.3, a locus associated with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Genome Med.* 2009; 1: 51.
17. Koch W., Türk S., Erl A. i wsp. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. *Atherosclerosis* 2011; 217: 220–226.
18. Bhanushali A.A., Parmar N., Contractor A., Shah V.T., Das B.R. Variant on 9p21 is strongly associated with coronary artery disease but lacks association with myocardial infarction and disease severity in a population in Western India. *Arch. Med. Res.* 2011; 42: 469–474.
19. Qi L., Qi Q., Prudente S. i wsp. Association between a genetic variant related to glutamic acid metabolism and coronary heart disease in individuals with type 2 diabetes. *JAMA* 2013; 310: 821–828.

20. van der Vos K.E., Coffey P.J. Glutamine metabolism links growth factor signaling to the regulation of autophagy. *Autophagy* 2012; 8: 1862–1864.
21. Willer C.J., Sanna S., Jackson A.U. i wsp. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* 2008; 40: 161–169.
22. Ye S., Willeit J., Kronenberg F. i wsp. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52: 378–384.
23. Helgadottir A., Thorleifsson G., Magnusson K.P. i wsp. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat. Genet.* 2008; 40: 217–224.
24. Doria A., Wojcik J., Xu R. i wsp. Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA* 2008; 300: 2389–2397.
25. Abdullah K.G., Li L., Shen G.Q. i wsp. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). *Ann. Hum. Genet.* 2008; 72: 654–657.
26. Samani N.J., Raitakari O.T., Sipilä K. i wsp. Coronary artery disease-associated locus on chromosome 9p21 and early markers of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 1679–1683.
27. Zhang Q., Wang X.F., Cheng S.S. i wsp. Three SNPs on chromosome 9p21 confer increased risk of myocardial infarction in Chinese subjects. *Atherosclerosis* 2009; 207: 26–28.
28. Saleheen D., Alexander M., Rasheed A. i wsp. Association of the 9p21.3 locus with risk of first-ever myocardial infarction in Pakistanis: Case-control study in South Asia and updated meta-analysis of Europeans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 1467–1473.
29. Bhanushali A.A., Parmar N., Contractor A., Shah V.T., Das B.R. Variant on 9p21 is strongly associated with coronary artery disease but lacks association with myocardial infarction and disease severity in a population in Western India. *Arch. Med. Res.* 2011; 42: 469–474.
30. Maksimov V.N., Kulikov I.V., Orlov P.S. i wsp. Evaluation of association between 9 genetic polymorphism and myocardial infarction in the Siberian population. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2012; 5: 24–29.
31. Shen G.Q., Rao S., Martinelli N. i wsp. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J. Hum. Genet.* 2008; 53: 144–150.
32. Dehghan A., van Hoek M., Sijbrands E.J. i wsp. Lack of association of two common polymorphisms on 9p21 with risk of coronary heart disease and myocardial infarction; Results from a prospective cohort study. *BMC Med.* 2008; 6: 30.
33. Holdt L.M., Beutner F., Scholz M. i wsp. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 620–627.
34. Holdt L.M., Sass K., Gäbel G., Bergert H., Thiery J., Teupser D. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15(INK4b)), CDKN2A (p16(INK4a), p14(ARF)) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2011; 214: 264–270.
35. Roberts R., Stewart A.F. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. *Clin. Chem.* 2012; 58: 104–112.
36. Hauser E.R., Crossman D.C., Granger C.B. i wsp. A genomewide scan for early-onset coronary artery disease in 438 families: the GENECARD Study. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75: 436–447.
37. Fan M., Dandona S., McPherson R. i wsp. Two chromosome 9p21 haplotype blocks distinguish between coronary artery disease and myocardial infarction risk. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2013; 6: 372–380.