

Maciej T. Małecki<sup>1</sup>, Jan Skupień<sup>2</sup>, Małgorzata Waluś<sup>2</sup>, Małgorzata Owczarek<sup>2</sup>,  
Wojciech Czogała<sup>2</sup>, Przemysław Miarka<sup>2</sup>, Tomasz Klupa<sup>1</sup>, Jacek Sieradzki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

<sup>2</sup> Koło Naukowe przy Pracowni Genetycznej Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

# Polimorfizmy genu receptora witaminy D a ryzyko choroby niedokrwiennej serca w Polsce u chorych na cukrzycę typu 2 i u osób bez cukrzycy

Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease in a Polish population with type 2 diabetes mellitus and with normal glucose metabolism

## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Witamina D odgrywa ważną rolę w zachowaniu prawidłowej gospodarki wapniowo-fosforanowej. Istnieją także dowody, że może ona modyfikować czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca (CAD, *coronary artery disease*). Geny związane ze szlakiem metabolizmu witaminy D są dobrymi kandydatami w badaniach genetycznych nad CAD. Jednym z nich jest gen receptora witaminy D (VDR, *vitamin D receptor*). Wykazano na przykład związek jednego z licznych polimorfizmów tego genu (BsmI) z CAD w populacji niemieckiej, szczególnie w grupie chorych na cukrzycę typu 2.

**CEL.** Poszukiwanie związku polimorfizmów FokI, ApaI, BsmI i TaqI genu VDR z CAD w populacji polskiej w grupie osób niespokrewnionych z chorymi na cukrzycę typu 2 oraz w grupie osób bez cukrzycy.

**MATERIAŁ I METODY.** Do badania włączono 521 osób: 292 chorych na cukrzycę typu 2 oraz 229 osób bez cukrzycy. Chorobę niedokrwinną serca rozpoznano w obu grupach na podstawie badania ankietowego

oraz dokumentacji medycznej. U osób włączonych do analizy przeprowadzono uprzednio genotypowanie w zakresie częstych polimorfizmów FokI, ApaI, BsmI i TaqI w genie VDR. Allele zdefiniowano, stosując metodę zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*). Ponieważ warianty polimorfizmów ApaI, BsmI i TaqI genu były w silnej nierównowadze sprzężeń (*linkage disequilibrium*), można było przypisać z dużym prawdopodobieństwem trypunktowe haplotypy dla wszystkich osób biorących udział w badaniu. Różnice w dystrybucji badano za pomocą testu  $\chi^2$ .

**WYNIKI.** W grupie chorych na cukrzycę typu 2 rozpoznano CAD u 35,93%, podczas gdy w grupie osób bez cukrzycy zdiagnozowano CAD u 26,32%. Nie stwierdzono znamienych różnic między częstością CAD wśród nosicieli poszczególnych genotypów 4 badanych markerów w obu grupach oraz w analizie łącznej. Zaobserwowano natomiast, że nosiciele kombinacji trypunktowych haplotypów bAT/baT rzadziej chorowali na CAD niż nosiciele wszystkich pozostałych kombinacji: w grupie chorych na cukrzycę typu 2 — 25,58% vs. 37,75%;  $p = 0,125$ , w grupie bez cukrzycy — 14,29% vs. 27,86%;  $p = 0,126$  oraz 21,13% vs. 33,33%;  $p = 0,03$  w analizie łącznej.

**WNIOSKI.** Wyniki przedstawionego badania sugerują, że polimorfizmy genu VDR mogą wpływać na ryzyko zachorowania na CAD w populacji polskiej.

**Słowa kluczowe:** receptor witaminy D, gen, choroba niedokrwienność serca, cukrzyca typu 2

Adres do korespondencji: Dr med. Maciej Małecki  
Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Kopernika 15, 31-501 Kraków  
e-mail: mmałecki@cm-uj.krakow.pl, malecki\_malecki@yahoo.com

Diabetologia Praktyczna 2003, tom 4, nr 2, 137-143

Copyright © 2003 Via Medica

Nadesłano: 26.03.03 Przyjęto do druku: 25.04.03

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Collegium Medicum UJ (Grant 501/KL/439/L) oraz NIH (Grant FIRCA 1 R03 TW01351-01).

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION.** Vitamin D plays an important role in calcium and phosphates metabolism. There is evidence that this steroid modifies the risk factors of coronary artery disease (CAD). Thus genes that are involved in vitamin D metabolism are good candidates for CAD in genetic studies. One of those genes vitamin D receptor (VDR). For example, an association between one of many VDR polymorphisms (BsmI) and CAD was shown in a German population, particularly among patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

**AIM.** To search for the association of FokI, ApaI, BsmI, and TaqI polymorphisms of the VDR gene with CAD in two Polish cohorts of unrelated individuals: with and without T2DM.

**MATERIAL AND METHODS.** Overall, we included 521 individuals into this analysis: 292 patients with T2DM and 229 without T2DM. The diagnosis of CAD in both groups was based on a questionnaire and patient medical records. All individuals included into the analysis were previously genotyped for frequent VDR polymorphisms: FokI, ApaI, BsmI, and TaqI. Alleles were defined based on restriction fragment length polymorphism method (RFLP). Since variants of ApaI, BsmI, and TaqI polymorphisms were in very strong linkage disequilibrium, three loci haplotypes could be assigned to phase-unknown individuals with high degree of confidence. Differences in distribution were assessed by  $\chi^2$  test.

**RESULTS.** In the group of T2DM patients, the diagnosis of CAD was established in 35.93% individuals, while in the group without T2DM this number was 26.32%. There was no difference between the carriers of the different genotypes of the four examined markers with respect to the frequency of CAD diagnosis of each group both separately or when analyzed jointly. We observed, however, that the carriers of bAT/baT three point haplotype combinations were diagnosed with CAD less frequently than the carriers of all other haplotype combination: 25.58% vs. 37.75%;  $p = 0.125$  in T2DM group, 14.29% vs. 27.86% in the group without T2DM;  $p = 0.126$  and 21.13% vs. 33.33%;  $p = 0.03$  in the joint analysis of both groups, respectively.

**CONCLUSION.** The results of our study suggest that polymorphisms of the VDR gene may influence the risk of CAD in a Polish population.

**Key words:** vitamin D receptor, gene, coronary artery disease, type 2 diabetes mellitus

**Wstęp**

Choroba niedokrwienna serca (CAD, *coronary artery disease*) i cukrzyca typu 2 należą do najpoważniejszych problemów zdrowotnych w krajach uprzemysłowionych [1–3]. Oba schorzenia wiążą się ze znaczną chorobowością i umieralnością. Obraz kliniczny zarówno cukrzycy typu 2, jak i CAD powstaje w wyniku interakcji czynników genetycznych i środowiskowych [4–6]. Wśród czynników środowiskowych istnieją takie, które predysponują zarówno do cukrzycy typu 2, jak i CAD, na przykład: wysokokaloryczna, wysokotłuszczowa dieta, otyłość, siedzący tryb życia [1, 6]. Istnieją także dane wskazujące na znaczenie niektórych genów w patogenezie zarówno cukrzycy typu 2, jak i CAD [7, 8]. Wspólny mianownik podatności dla obu chorób mogą stanowić geny predysponujące do powstawania poszczególnych elementów zespołu metabolicznego, na przykład: nadciśnienie tętnicze, otyłość, insulinooporność, zaburzenia lipidowe, nieprawidłowy metabolizm glukozy [8, 9]. W tym kontekście interesującą grupą są białka związane ze szlakiem metabolizmu witaminy D. Fizjologiczna rola tej witaminy u ludzi wykracza daleko poza powszechnie znane aspekty regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej [10, 11]. Mniej znany jest fakt, że witamina D wpływa na wydzielanie insuliny [12, 13], insulinooporność [14], metabolizm tkanki tłuszczowej i lipolizę [15–17] oraz proces apoptozy [18]. Rola takich genów związanych z tą witaminą, jak: receptor witaminy D (VDR, *vitamin D receptor*) [12], białko wiążące witaminę D (DBP, *vitamin D binding protein*) [19], hydroksylaza  $1\alpha$ -witaminy D (CYP1 $\alpha$ ) [20] i kalpaina 10 [21], była w ostatnich latach przedmiotem badań w wielu populacjach jako kandydatów do cukrzycy typu 2 [22]. Część wyników potwierdza pewne znaczenie tych genów w patogenezie cukrzycy typu 2 w różnych grupach etnicznych [22]. Dwa doniesienia dotyczą roli tych białek w podgrupie chorych na cukrzycę typu 2 z otyłością [20, 23] (dodatkowym czynnikiem ryzyka CAD). Ponadto, opisano potencjalny, równoczesny wpływ polimorfizmu VDR na ryzyko cukrzycy typu 2 oraz CAD w populacji niemieckiej [7]. Mimo tego faktu oraz pozytywnych wyników badania związku VDR z cukrzycą typu 2 w populacji kaukaskiej ze Stanów Zjednoczonych [25], w projekcie dotyczącym populacji małopolskiej, autorom nie udało się wykazać roli żadnego z 4 badanych polimorfizmów VDR w patogenezie cukrzycy typu 2 [24]. Autorzy postanowili jednak wykorzystać zebrane dane [24] do analizy wpływu tego genu na CAD.

Celem przeprowadzonego przez autorów niniejszej pracy badania było poszukiwanie związku polimorfizmów FokI, Apal, BsmI i TaqI genu VDR z CAD w populacji polskiej, w badaniu osób niespokrewnionych z chorymi na cukrzycę typu 2 oraz grupie osób bez tego schorzenia.

## Material i metody

### Badana populacja

Do analizy włączono 521 niespokrewnionych osób: 292 chorych na cukrzycę typu 2 oraz 229 bez tego schorzenia. Wszystkie osoby były mieszkańcami regionu Małopolski. Rekrutację przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym opisem [26, 27], stosując najnowsze kryteria i definicje Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Do badania włączano jedynie tych chorych, u których postawiono diagnozę cukrzycy typu 2 i którzy nie byli leczeni insuliną przez 2 lata bezpośrednio po rozpoznaniu choroby. Osoby bez tego schorzenia charakteryzowały się prawidłową glikemią na czczo i ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy, wśród krewnych pierwszego stopnia. Grupę tę stanowili głównie małżonkowie chorych na cukrzycę typu 2 i ochotnicy z personelu medycznego. Wszyscy włączeni do badania, w obu grupach, otrzymali standardową ankietę, która zawierała pytania dotyczące rozpoznania cukrzycy, wywiadu rodzinnego, metod leczenia oraz innych kwestii medycznych, a także rozpoznania choroby niedokrwiennej serca, zawału serca oraz stosowanych leków. Dla potrzeb niniejszego badania pacjentów klasyfikowano jako chorujących na CAD, jeżeli rozpoznano dusznicę bolesną, atak serca lub zawał serca i/lub jeżeli aktualnie otrzymywali nitraty. U osób włączonych do próby wykonano podstawowe badanie fizykalne, polegające między innymi na pomiarach wzrostu, masy ciała i ciśnienia tętniczego krwi. Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej i uzyskało ono akceptację Komisji Bioetycznej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### Genotypowanie

Dla potrzeb badania, za pomocą standardowego protokołu [28], wyizolowano DNA. U wszystkich osób włączonych do analizy na początku zdefiniowano genotypy dla 4 znanych markerów badanego genu VDR [24]: w egzonie 2, w intronie 8 (dwa) i egzonie 9. Polimorfizmy te wykrywa się za pomocą swoistych enzymów restrykcyjnych FokI, BsmI, Apal, i TaqI. W odniesieniu do FokI i BsmI zastosowano, opisane przez Pani i wsp. [29], primery i warunki PCR,

podobnie dla Apal i TaqI szczegóły protokołu były zgodne z wcześniej opublikowanym opisem [30]. Fragment DNA o długości 265 par zasad (bp, *base pairs*), który zawiera polimorfizm FokI poddano działaniu tego enzymu, w wyniku czego w swoistym miejscu restrykcyjnym powstawały dwa fragmenty o długości 196 bp i 69 bp. Natomiast fragment DNA o długości 825 bp, zawierający proksymalną część intronu 8, trawiono enzymem BsmI, co w swoistym miejscu restrykcyjnym powodowało powstanie dwóch fragmentów DNA o długości 175 bp i 650 bp. Polimorfizmy TaqI i Apal namnożono przy zastosowaniu tej samej pary primerów, która powodowała powstanie produktu PCR o długości 280 bp. W miejscach restrykcyjnych dla Apal i TaqI wyjściowy fragment DNA ulegał podziałowi na fragment o długości odpowiednio 250 bp i 30 bp (dla Apal) oraz 200 i 80 bp (dla TaqI). Produkty trawienia rozdzielono na 3,5-procentowym żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny. Wyniki udokumentowano za pomocą kamery cyfrowej, przy użyciu programu komputerowego Biocapt (Vilbert-Lourmant).

U każdej osoby włączonej do analizy, zgodnie z wcześniej opublikowanymi zasadami, ustalono za pomocą metody leczenia genów (*gene counting*) trzypunktowe haplotypy, tworzone przez polimorfizmy BsmI, Apal i TaqI [31–33]. W skrócie, metoda ta opiera się na założeniu, że pewne haplotypy, tworzone przez 2 markery znajdujących się w stanie silnej nierównowagi sprzężeń (*linkage disequilibrium*), są dużo bardziej prawdopodobne niż ich alternatywne wersje. Biorąc to pod uwagę, wszystkim osobom z daną kombinacją genotypów, u których haplotypów nie da się ustalić w sposób jednoznaczny (*phase unknown individuals*), przypisuje się bardziej prawdopodobną parę haplotypów. Dla markerów w stanie silnej nierównowagi sprzężeń różnica między prawdopodobieństwem wystąpienia poszczególnych haplotypów może być tak duża, jak w wypadku badanych polimorfizmów BsmI, Apal i TaqI genu VDR, stąd można przypisać właściwe haplotypy z bardzo dużym prawdopodobieństwem. W sumie w analizowanej grupie było 58 osób, które były heterozygotami dla 2 z 3 wspomnianych markerów (32 chorych na cukrzycę typu 2 i 26 osób z grupy kontrolnej). Prawdopodobieństwo pary haplotypów 'BA/ba' dla markerów BsmI i Apal, pary haplotypów 'At/aT' dla Apal i TaqI oraz pary haplotypów 'bT/Bt' dla BsmI i TaqI było wielokrotnie większe niż prawdopodobieństwo alternatywnego ułożenia. Dlatego wszystkie osoby będące podwójnymi heterozygotami przydzielono jako posiadające te pary haplotypów. Analogicznie 183 osoby będące heterozygo-

tami dla 3 markerów (98 chorych na cukrzycę typu 2 i 85 osób z grupy kontrolnej) przypisano do trypunktowego haplotypu BaT/baT. W wypadku osób będących homozygotami w 3 *loci* (105 chorych na cukrzycę typu 2 i 83 osoby z grupy kontrolnej) lub heterozygotami jedynie dla 1 *locus* (57 chorych na cukrzycę typu 2 i 35 osób z grupy kontrolnej) haplotypy można było przypisać jednoznacznie. Do oceny nierównowagi sprzężeń między 4 badanymi markerami użyto programu EH (<ftp://linkage.rockefeller.edu/software/eh>). Odchylenie od równowagi Hardy-Weinberga oceniano testem  $\chi^2$ .

## Wyniki

Charakterystykę kliniczną obu grup przedstawiono w tabeli 1. W grupie chorych na cukrzycę typu 2 CAD rozpoznano na podstawie badania ankietowego u 35,93% osób, podczas gdy w grupie bez tego schorzenia, CAD zdiagnozowano u 26,32%. Zgodnie z poprzednio podanymi danymi genotypy wszystkich markerów były w stanie równowagi Hardy-Weinberga w każdej z grup oddzielnie oraz przy ana-

Tabela 1. Charakterystyka badanych grup

Cecha	Chorzy na cukrzycę typu 2	Osoby bez cukrzycy
Kobiety/Mężczyźni	157/135	140/89
Wiek w momencie badania (lata) <sup>a</sup>	59,8 ± 9,2	54,0 ± 15,1
Wiek w momencie diagnozy (lata) <sup>a</sup>	49,9 ± 9,2	N/A <sup>b</sup>
Czas trwania choroby (lata) <sup>a</sup>	10,1 ± 7,9	N/A
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] <sup>a</sup>	30,6 ± 5,4	27,8 ± 6,1
Stężenie glukozy na czczo [mmol/l] <sup>a</sup>	8,2 ± 3,4	5,1 ± 1,6
HbA <sub>1c</sub> (%) <sup>a</sup>	7,3 ± 1,5	N/A <sup>b</sup>
Leczeni insuliną (%)	55,0	N/A <sup>b</sup>
CAD (%)	36,0	26,32

Znaczny odsetek osób leczonych insuliną wśród chorych na cukrzycę typu 2 wiąże się ze stosunkowo długim czasem trwania choroby. Stężenie glukozy na czczo mierzono u chorych na cukrzycę typu 2 przed porannym podaniem leków przeciwcukrzycowych. Rozpoznanie CAD przeprowadzono na podstawie danych ankietowych; <sup>a</sup> średnia ± SD; <sup>b</sup> N/A — nie dotyczy

Tabela 2. Częstość choroby wieńcowej w zależności od genotypów 4 markerów receptora witaminy D

	Marker			
	Fokl Genotyp			
	FF	Ff	ff	
Chorzy na cukrzycę typu 2	28 (33,33%)	57 (38,26%)	21 (35,59%)	$\chi^2 = 0,57$ p = 0,74
Populacja kontrolna	17 (22,97%)	28 (26,92%)	14 (28,00%)	$\chi^2 = 0,50$ p = 0,77
Obie grupy łącznie	45 (28,48%)	85 (33,60%)	35 (32,11%)	$\chi^2 = 1,18$ p = 0,55
	BsmI Genotyp			
	BB	Bb	bb	
Chorzy na cukrzycę typu 2	13 (39,39%)	52 (38,52%)	40 (32,26%)	$\chi^2 = 1,29$ p = 0,52
Populacja kontrolna	10 (32,26%)	25 (22,52%)	25 (28,74%)	$\chi^2 = 1,65$ p = 0,43
Obie grupy łącznie	23 (35,94%)	77 (31,30%)	65 (30,81%)	$\chi^2 = 0,63$ p = 0,73
	ApaI Genotyp			
	AA	Aa	aa	
Chorzy na cukrzycę typu 2	22 (33,33%)	53 (36,05%)	30 (37,97%)	$\chi^2 = 0,33$ p = 0,84
Populacja kontrolna	19 (32,76%)	23 (19,33%)	18 (34,62%)	$\chi^2 = 6,10$ p = 0,05
Obie grupy łącznie	41 (33,06%)	76 (28,57%)	48 (36,64%)	$\chi^2 = 2,80$ p = 0,24
	TaqI Genotyp			
	TT	Tt	tt	
Chorzy na cukrzycę typu 2	44 (33,59%)	49 (36,84%)	12 (42,86%)	$\chi^2 = 0,94$ p = 0,62
Populacja kontrolna	25 (28,74%)	26 (23,21%)	9 (30,00%)	$\chi^2 = 1,02$ p = 0,59
Obie grupy łącznie	69 (31,65%)	75 (30,61%)	21 (36,21%)	$\chi^2 = 0,68$ p = 0,68

W sumie w obu grupach było 165 osób z CAD, w tym w grupie chorych na cukrzycę typu 2 — 105 osób, natomiast w grupie osób bez cukrzycy — 60; wartość p podano dla dwóch stopni swobody (2.d.f.)

lizie łącznej. Trzy pary polimorfizmów były w stanie nierównowagi sprzężeń (BsmI/ApaI, BsmI/TaqI i ApaI/TaqI) ( $p < 10^{-4}$  dla wszystkich 3 par). Zjawiska tego nie obserwowano w odniesieniu do markera FokI oraz każdego z pozostałych polimorfizmów.

W tabeli 2 przedstawiono częstość CAD wśród nosicieli genotypów poszczególnych markerów, w populacji chorych na cukrzycę typu 2 i w grupie bez cukrzycy oraz w analizie łącznej. Nie zaobserwowano znamiennych różnic wśród nosicieli poszczególnych genotypów. Jedynie w grupie kontrolnej, w odniesieniu do polimorfizmu ApaI, obserwowano tendencję do rzadszego występowania CAD u heterozygot dla tego markera. Podobnego trendu nie zauważono w grupie chorych na cukrzycę typu 2, a wynik analizy łącznej był negatywny. Porównywano także częstość CAD u nosicieli trypunktowych kombinacji haplotypów tworzonych przez allele markerów ApaI, BsmI i TaqI. Nie uwzględniono kombinacji, które w badanej grupie występowały rzadko ( $< 5\%$  badanej grupy). Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 3. Zwraca uwagę fakt, że nosiciele kombinacji trypunktowych haplotypów baT/baT rzadziej chorowali na CAD niż nosiciele wszystkich pozostałych kombinacji: w grupie chorych na cukrzycę typu 2 — 25,58% vs. 37,75%;  $p = 0,125$ ; w grupie bez cukrzycy — 14,29% vs. 27,86%;  $p = 0,126$ . Przy połączeniu obu grup różnica ta była znamienna statystycznie (21,13% vs. 33,33%;  $p = 0,03$ ).

## Dyskusja

W przedstawionym projekcie dokonano analizy możliwego związku między 4 markerami genu VDR a CAD. Poniżej przeprowadzono dyskusję dotyczącą niektórych aspektów metodologicznych projektu.

Punktem wyjścia przedstawionej analizy było doniesienie o możliwym wpływie genotypu markera BsmI na występowanie CAD w populacji niemieckiej [7]. Ortlepp i wsp. [7] opisali fakt, że u nosicieli genotypu BB znamiennie częściej stwierdzano CAD niż u heterozygot Bb, zaś w tej grupie ryzyko wystąpienia CAD było większe niż u nosicieli genotypu bb. W badanej grupie znaczący odsetek stanowili chorzy na cukrzycę typu 2. Ostatnio ci sami autorzy opublikowali doniesienie dotyczące poszerzonej grupy, przy czym uprzednio opisywane różnice nie były znamienne statystycznie [34]. Biorąc jednak pod uwagę przesłanki patofizjologiczne, problem jest na tyle interesujący, że autorzy postanowili dokonać analizy także w populacji polskiej. Wykorzystano wyniki genotypowania przeprowadzonego w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych w Krakowie w celu analizy

Tabela 3. Częstość choroby wieńcowej w zależności od kombinacji haplotypów tworzonych przez markery BsmI, ApaI oraz TaqI receptora witaminy D

Kombinacja haplotypów	Chorzy na cukrzycę typu 2 oraz CAD	Osoby z CAD		Osoby z CAD w obu grupach łącznie	
		Chorzy na cukrzycę i bez cukrzycy	Osoby z CAD w obu grupach łącznie	Osoby z CAD w obu grupach łącznie	Osoby z CAD w obu grupach łącznie
BAI/bAT	11 (42,31%)	$\chi^2 = 0,50$ $p = 0,48$	9 (34,62%)	20 (38,46%)	$\chi^2 = 1,23$ $p = 0,27$
BAI/bAT	8 (29,63%)	$\chi^2 = 0,51$ $p = 0,47$	6 (30,00%)	14 (29,79%)	$\chi^2 = 0,08$ $p = 0,77$
baT/baT	28 (37,84%)	$\chi^2 = 0,15$ $p = 0,70$	17 (35,42%)	45 (36,89%)	$\chi^2 = 2,00$ $p = 0,15$
bAT/baT	11 (25,58%)	$\chi^2 = 2,36$ $p = 0,12$	4 (14,29%)	15 (21,13%)	$\chi^2 = 4,54$ $p = 0,03$
BAI/baT	40 (40,82%)	$\chi^2 = 1,51$ $p = 0,21$	17 (20,00%)	57 (31,15%)	$\chi^2 = 0,03$ $p = 0,85$

Porównania każdej kombinacji dokonano w zestawieniu do wszystkich pozostałych kombinacji jako całości; wartość  $p$  podano dla jednego stopnia swobody (1. d.f.); nie uwzględniono bardzo rzadkich kombinacji

wpływu genu VDR na ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2, w którym nie wykazano różnic między grupą chorych na cukrzycę typu 2 a grupą kontrolną [24]. Należy podkreślić, że ujemną cechą prezentowanego badania jest fakt przeprowadzania diagnozy CAD na podstawie ankiety. W tym względzie dane zebrane przez autorów ustępują znacznie danym zgromadzonym przez Ortleva i wsp. w populacji niemieckiej, gdzie rozpoznanie przeprowadzono na podstawie badania koronarograficznego [7]. Z drugiej strony należy zaznaczyć, że w cytowanym badaniu genotypowanie przeprowadzono tylko w zakresie jednego markera genu VDR — BsmI [7]. Analiza genetyczna przeprowadzona przez autorów niniejszej pracy jest znacznie bardziej rozbudowana. Po pierwsze, genotypowanie przeprowadzono dla 4 markerów. Po drugie, dokonano także analizy kombinacji haplotypów. W zakresie pojedynczych markerów nie zaobserwowano znamienych różnic dotyczących częstości CAD. W odniesieniu do kombinacji haplotypów bAT/baT zaobserwowano jednak tendencję do rzadszego występowania CAD niż wśród nosicieli wszystkich pozostałych kombinacji haplotypów. W analizie łącznej różnica ta była statystycznie znamienna. Tak więc wspomniana kombinacja haplotypów może mieć charakter protekcyjny z punktu widzenia choroby CAD. Dyskusji wymaga także łączna analiza chorych na cukrzycę typu 2 oraz osób bez tego schorzenia. Tego rodzaju podejście wydaje się usprawiedliwiać fakt, że wśród osób z CAD znaczący odsetek stanowią chorzy na cukrzycę typu 2, a ponadto, w polskiej populacji nie stwierdzono różnic w dystrybucji alleli, genotypów i haplotypów między grupą chorych na cukrzycę typu 2 a grupą kontrolną. Należy zauważyć, że także analiza przeprowadzona przez Ortleva i współpracowników dotyczyła obu grup pacjentów [7].

Inną istotną kwestią jest problem wielokrotnych porównań i ewentualnego wprowadzenia stosownych poprawek (np. Bonferroniego [35]). Warto jednak zauważyć, że badane genotypy poszczególnych markerów i kombinacje haplotypów nie są od siebie niezależne. Ich biologiczna natura (tzn. nierównowaga sprzężeń między markerami) powoduje, że przeprowadzone porównania są ściśle powiązane. Należy oczywiście brać pod uwagę fakt, że zaobserwowany związek ma charakter przypadkowy, co czasami występuje w badaniach genetycznych. Dlatego dopiero duże badania, obejmujące różne grupy etniczne, uwzględniające w pełni obiektywne kryteria rozpoznania CAD, mogą potwierdzić dane zebrane przez autorów.

Podsumowując, wyniki omawianego badania sugerują, że polimorfizmy genu VDR mogą wpływać na ryzyko zachorowania na CAD w populacji polskiej.

## PIŚMIENNICTWO

- Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782–787.
- Krolewski A.S., Kosinski E.J., Warram J.H. i wsp.: Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 1987; 59: 750–755.
- Warram J.H., Kopczynski J., Janka H.U., Krolewski A.S.: Epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and its macrovascular complications. A basis for the development of cost-effective programs. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1997; 26: 165–188.
- Małecki M.T.: Podłoże genetyczne cukrzycy typu 2. *Nowa Klinika* 2001; 8: 74–80.
- Gruchała M., Rynkiewicz A.: Aspekty genetyczne choroby niedokrwiennej serca. W: A. Ciechanowicz, A. Januszewicz, W. Januszewicz, W. Rużyłło (red.). *Genetyka chorób układu krążenia*. 2000; 81–94.
- Genest J. Jr., Cohn J.S.: Clustering of cardiovascular risk factors: targeting high-risk individuals. *Am. J. Cardiol.* 1995; 76: 8A–20A.
- Ortlepp J.R., Lauscher J., Hoffmann R. i wsp.: The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet. Med.* 2001; 18: 842–845.
- Wang X.L., McCredie R.M., Wilcken D.E.: Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene. Association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation* 1996; 93: 1339–1345.
- Groop L., Orho-Melander M.: The dysmetabolic syndrome. *J. Intern. Med.* 2001; 250: 105–120.
- Reichel H., Koeffler H.P., Norman A.W.: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 980–991.
- Feldman D.: Vitamin D, parathyroid hormone, and calcium: a complex regulatory network. *Am. J. Med.* 1999; 107: 637–639.
- Norman A.W.: The vitamin D endocrine system: identification of another piece of the puzzle. *Endocrinology* 1994; 134: 1601A–1601C.
- Sergeev I.N., Rhoten W.B.: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic  $\beta$ -cell line. *Endocrinology* 1995; 136: 2852–2861.
- Rudnicki P.M., Molsted-Pedersen L.: Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40: 40–44.
- Zemel M.B., Hang S., Greer B. i wsp.: Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 2000; 14: 1132–1138.
- Lenoir C., Dace A., Martin C. i wsp.: Calcitriol down-modulates the 3,5,3' triiodothyronine (T<sub>3</sub>) receptors and affects, in a biphasic manner, the T<sub>3</sub>-dependent adipose differentiation of Ob 17 preadipocytes. *Endocrinology* 1996; 137: 4268–4276.
- Dace A., Martin-el Yazidi C., Bonne J. i wsp.: Calcitriol is a positive effector of adipose differentiation in the OB 17 cell line: relationship with the adipogenic action of triiodothyronine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 232: 771–776.
- Omdahl J.L., Morris H.A., May B.K.: Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22: 139–166.
- Pratley R.E., Thompson D.B., Prochazka M. i wsp.: An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1757–1764.

20. Malecki M.T., Klupa T., Wolkow P. i wsp.: Association study of the Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) gene and type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes & Metabolism* (w druku).
21. Horikawa Y., Oda N., Cox N.J. i wsp.: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 2000; 26: 163–175
22. Malecki M.T., Sieradzki J.: Rola polimorfizmów w genach związanych z metabolizmem witaminy D w patogenezie cukrzycy typu 2. *Diabetologia Praktyczna* 2000; 1: 1–6.
23. Ye W.Z., Reis A.F., Dubois-Laforgue D. i wsp.: Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145: 181–186.
24. Malecki M.T., Frey J., Moczulski D. i wsp.: Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (w druku).
25. Oh J.Y., Barrett-Connor E.: Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51: 356–359.
26. Malecki M.T., Moczulski D.K., Klupa T. i wsp.: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 695–699.
27. Malecki M.T., Klupa T., Wanik K. i wsp.: Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 57: 99–104.
28. Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W.: DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* 1997; 22: 550–553.
29. Pani M.A., Knapp M., Donner H. i wsp.: Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000; 49: 504–507.
30. Chang T.J., Lei H.H., Yeh J.I. i wsp.: Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin. Endocrinol.* 2000; 52: 575–580.
31. Doria A., Warram J.H., Krolewski A.S.: Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Diabetes* 1994; 43: 690–695.
32. Malecki M.T., Moczulski D.K., Klupa T. i wsp.: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 695–699.
33. Malecki M.T., Klupa T., Wanik K. i wsp.: Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 57: 99–104.
34. Ortlepp J.R., Von Korff A., Hanrath P. i wsp.: Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 106–109.
35. Brown B.W., Russell K.: Methods of correcting for multiple testing: operating characteristics. *Stat. Med.* 1997; 16: 2511–2528.