

Genetika periférneho artériového obliterujúceho ochorenia dolných končatín (PAOO DK)

Demková K, Kozárová M, Tkáč I

IV. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, Slovenská republika

Demková K, Kozárová M, Tkáč I. **Genetika periférneho artériového obliterujúceho ochorenia dolných končatín (PAOO DK).** Cardiology Lett. 2017;26(2):98–105

Abstrakt. Ateroskleróza a jej rizikové faktory sú jedným z najvýznamnejších zdravotných problémov západnej civilizácie. Mnohé rizikové faktory, ktoré ovplyvňujú rozvoj aterosklerózy a periférneho artériového obliterujúceho ochorenia dolných končatín (PAOO DK) (napríklad dyslipidémia, diabetes mellitus, hypertenzia), sú dedičné, pričom ide väčšinou o polygénovú dedičnosť typickú pre komplexné ochorenia. Predispozícia ku vzniku PAOO DK je tiež pravdepodobne podmienená genetickými variantmi, ktoré zvyšujú riziko jeho rozvoja a progresie aj bez ohľadu na tradičné rizikové faktory. Napriek tomu, že žijeme v dekáde mnohých genetických objavov, doposiaľ bolo objavených iba relatívne málo génových variantov, ktoré majú asociáciu k PAOO DK. Môže to byť spôsobené väčšou klinickou a genetickou heterogenitou typickou pre PAOO DK. Identifikácia genetických variantov podmieňujúcich PAOO DK by v budúcnosti mohla podporiť vývoj nových diagnostických a terapeutických prístupov v jeho manažmente. Tab. 1, Lit. 18, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: ateroskleróza – periférne artériové obliterujúce ochorenie dolných končatín – diabetes mellitus 2. typu – génové polymorfizmy

Ateroskleróza je chronické, systémové, zápalové ochorenie stredne veľkých a veľkých tepien, ako sú koronárne, karotické, periférne tepny, tepny Willisovho okruhu a aorta. Ide

Zo IV. internej kliniky UPJŠ LF a UNLP, Košice, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 7. marca 2017; prijaté dňa 22. marca 2017

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Katarína Demková, IV. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Rastislavova 43, 041 90 Košice, Slovenská republika, e-mail: katka21demkova@gmail.com

Genetics of peripheral arterial occlusive disease of the lower extremities (PAD)

Demkova K, Kozarova M, Tkac I

IV. Internal Clinic, Pavol Josef Safarik University, Faculty of medicine, Luis Pasteur University Hospital, Kosice, Slovak Republic

Demkova K, Kozarova M, Tkac I. **Genetics of peripheral arterial occlusive disease of the lower extremities (PAD).** Cardiology Lett. 2017;26(2):98–105

Abstract. Atherosclerosis and its risk factors are one of the major health problems of western civilization. A number of risk factors that affect the development of atherosclerosis and peripheral arterial occlusive disease (PAD) of the lower extremities are inherited (e.g. dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension). For PAD a polygenic pattern of inheritance is typical, as for other complex diseases. Predisposition to PAD development is also likely to be associated with genetic variants that increase the risk of its development and progression, regardless of traditional risk factors. Despite the fact that we live in a decade of many genetic discoveries, so far only a few gene variants that are associated with PAD have been discovered. This may be due to the greater clinical and genetic heterogeneity typical of PAD. Identification of genetic variants that predispose to PAD could lead to the development of new diagnostic and therapeutic approaches in its management in the future. Tab. 1, Ref. 18, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: atherosclerosis – peripheral arterial occlusive disease – type 2 diabetes mellitus – genetic polymorphisms

Atherosclerosis is a chronic, systemic, inflammatory disease of medium and large arteries, such as the coronary, carotid and peripheral arteries, circle of Willis arteries and aorta. It

From 4th Department of Internal Medicine, Pavol Josef Safarik University, Faculty of Medicine, Luis Pasteur University Hospital, Kosice, Slovak Republic
Manuscript received March 7, 2017; accepted for publication March 22, 2017
Address for correspondence: Katarína Demková, MD, IV. Internal Clinic, Pavol Josef Safarik University, Faculty of Medicine, Luis Pasteur University Hospital, Rastislavova 43, 041 90 Košice, Slovak Republic, e-mail: katka21demkova@gmail.com

o zápalový proces, ktorý vzniká ako odpoveď na poškodenie intimy (1). Obliterujúca ateroskleróza je najčastejšou príčinou (90 – 95 %) chronických foriem PAOO DK (2). Potvrdená ateroskleróza periférnych tepien je silnejším prediktorom kardiovaskulárnych (KVS) a cerebrovaskulárnych príhod, ako dyslipidémia, hypertenzia alebo fajčenie (3). PAOO DK sa spája s významnou morbiditou a mortalitou a považuje sa za marker systémovej aterosklerózy. Objav génových variantov, ktoré by boli spojené s rozvojom PAOO DK, by mohol viesť k stratifikácii pacientov a personalizácii ich liečby (4).

Ludský genóm je kompletná sada genetickej informácie. Tieto informácie sú kódované ako sekvencie DNA v 23 pároch chromozómov v bunkových jadrách a malej molekule DNA nachádzajúcej sa v mitochondriách. Ludský genóm obsahuje viac ako tri miliardy nukleotidov, ale len 1,5 % genómu sú gény kódujúce bielkoviny (exóny). Zvyšok predstavujú intergénové oblasti (intróny), regulačné oblasti, opakujúce sa elementy a podobne. Genetická variabilita znamená, že každý človek je jedinečný vo svojej genetickej výbave. Nie každý génový polymorfizmus je však podkladom pre zmenu vo fenotype (v tomto prípade PAOO DK). Ako génový polymorfizmus sa označuje genetická variácia, ktorej menej častá alela má frekvenciu výskytu v populácii vyššiu ako 1 %. Zriedkavejšie variácie génov s jasným fenotypovým obrazom sa označujú ako mutácie. Polymorfizmus jedného nukleotidu (SNP – single nucleotide polymorphism) znamená bialelickú variáciu, t. j. existenciu dvoch alternatívnych alel – bežná/riziková alela, ktoré môžu byť v kódujúcich aj nekódujúcich (regulačných) oblastiach.

V oblasti genomiky dnes prebieha veľmi intenzívny výskum pomocou tzv. celogenómových asociačných štúdií. Tieto štúdie mapujú výskyt SNP v ľudskom genóme a snažia sa nájsť spojenie s často sa vyskytujúcim ochorením. Pomocou najnovších metód sú sledované státisíce SNP naraz a následne je štatisticky hodnotený ich výskyt v prípadoch (skupín dobrovoľníkov postihnutých študovaným ochorením) a kontrol (osôb, ktoré nie sú choré). SNP, ktoré sa vyskytujú v skupine chorých významne častejšie ako v skupine zdravých kontrol, sa označujú ako kandidátske a študujú sa ďalej. Genetické asociačné štúdie sa stali štandardom na sledovanie vzájomných súvislostí medzi polymorfizmami kandidátskych génov a prítomnosťou daného znaku, respektíve ochorenia. Tento typ štúdií umožňuje sledovať vplyv jednotlivých génových variantov, ako aj interakciu gén – gén alebo gén – prostredie, teda slúži na zisťovanie genetickej predispozície k multifaktoriálnym ochoreniam.

Genetické pozadie PAOO DK

Podľa niektorých genetických asociačných štúdií sú genetické faktory zodpovedné za 21 – 48 % variability členkovo-

is an inflammatory process that occurs as response to injury of the intima (1). Occlusive atherosclerosis is the most common cause (90-95%) of chronic forms of PAD (2). Confirmed atherosclerosis of peripheral arteries is a stronger predictor of cardiovascular and cerebrovascular events than dyslipidemia, hypertension and smoking (3). PAD is associated with significant morbidity and mortality, and is considered a marker of systemic atherosclerosis. The discovery of gene variants that are associated with the development of PAD could lead to stratification of the patients and personalization of their treatment (4).

The human genome is a complete set of genetic information. This information is encoded as a sequence of DNA in 23 pairs of chromosomes in the cell nuclei, and in a small DNA molecule in the mitochondria. The human genome contains more than 3 billion nucleotides, but only 1.5% of the genome are genes encoding proteins (exons). The rest are intergenic regions (introns), the regulatory areas, repetitive elements etc. Genetic variability means that each person is unique in its genetics. However, not every gene polymorphism is the substrate for a change in the phenotype (i.e. PAD). Gene polymorphism is a genetic variation that is characterized by less frequent allele prevalence greater than 1% in the population. Rarer variations of genes with a clear phenotypic manifestation are referred to as mutations. Single nucleotide polymorphism (SNP) is a biallelic variation, e.g. the existence of two alternative alleles – common / risk allele, which can be in the coding and non-coding (regulatory) regions.

Nowadays very intensive research in the field of genomics is carried out by genome – wide association studies (GWAS). These studies map the occurrence of SNPs in the human genome and try to find an association with the prevalent disease. Using the latest techniques, thousands of SNPs are investigated at once and then the incidence is statistically evaluated in cases (study group of volunteers affected by disease) and controls. SNPs that occur in the group of patients significantly more frequently than in the healthy controls are referred to as candidate variants and they are further studied. GWAS have become the standard for investigation of the associations between polymorphisms of candidate genes and the presence of a sign or disease. This type of study allows the monitoring of the effects of individual gene variants and also the interaction of gene-gene and gene-environment, and may be used as a suitable tool to detect a genetic predisposition to multifactorial diseases.

Genetic background of PAD

According to some genetic association studies genetic factors are responsible for 21 – 48% of ankle – brachial index (ABI) variability in diabetics. Gene variants with relation to

-brachiálnych indexov (ABI) u diabetikov. Génové varianty so vzťahom k PAOO DK môžeme rozdeliť na proaterosklerotické a proaterotrombotické.

Endotelová dysfunkcia zohráva dôležitú úlohu v iniciácii a progresii aterosklerozy. Haplotype *eNOS* -786C/4a génu pre endotelovú syntézu oxidu dusnatého môže byť príčinou zníženej syntézy NO, čím sa podieľa na endotelovej dysfunkcii. Ďalším podstatným faktorom v patogenéze aterosklerozy je zápal. V jeho progresii sa uplatňujú viaceré cytokíny, chemokíny, adhezívne molekuly a proteolytické enzýmy, ktoré sú ovplyvňované proaterosklerotickými génovými variantmi, napríklad variantmi génu pre angiotenzín konvertujúci enzým (ACE), génu pre interleukín-6 (*IL-6*), *E-selektín*, génov pre matrixové metaloproteinázy 1, 3, 9 (*MMP-1,3,9*), génu pre *connexin-37 C/T 1019*.

Proaterotrombotické gény zohrávajú v patogenéze aterosklerozy taktiež dôležitú úlohu cestou aktivácie hemokoagulácie. *H2* alela génu pre ADP receptor na povrchu trombocytov *P2Y12* a polymorfizmus 677 C>T génu pre metyltetrahydrofolát reduktázu (*MTHFR*) sa spájajú so zvýšeným rizikom rozvoja PAOO DK.

Stále ešte zostáva veľká skupina tzv. nových génových polymorfizmov, pri ktorých nie je presne známa ich funkcia.

Prehľad kandidátskych génov asociovaných k PAOO DK

Gén pre osteoprotegerín (*OPG*), označovaný tiež *TNFRSF11B* (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B), je lokalizovaný na chromozóme 8q23 – 24 (5). Osteoprotegerín je sekrečný glykoproteín, ktorý chráni kostné tkanivo pred resorpciou. Je syntetizovaný osteoblastmi, ale aj bunkami, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe a rozvoji aterosklerotických plakov, ako sú hladké svalové bunky artériovej stenzy a endotelové bunky (6, 7). V endotelových bunkách plní funkciu antiapoptotického faktora (5). Sérová hladina *OPG* koreluje so závažnosťou aterosklerozy, zvýšené koncentrácie sú spojené s asymptomatickou ischemickou chorobou srdca (ICHS), závažnosťou nestabilnej angíny pectoris, akútnym infarktomyokardu (IM), závažnosťou PAOO DK, srdcového zlyhania, vulnerabilnými karotickými plakmi, symptomatickou karotickou stenózou (6). *OPG* sa považuje za včasný prediktor KVS ochorení (8), má potenciálne využitie ako biomarker osteoporózy, artritídy, vaskulárnej kalcifikácie, nádorových ochorení kostí, rizika rozvoja diabetických komplikácií, aterosklerozy aj mortality (5). Hladina *OPG* je vyššia u diabetikov 1. typu, u diabetikov 2. typu s mikrovaskulárnymi komplikáciami, mikroalbuminúriou aj makroalbuminúriou, u obéznych jedincov, pacientov s metabolickým syndrómom aj hypertonikov. Liečba inzulínom, statínmi, glitazónmi a tiež redukcia hmotnosti vedie k poklesu hladiny *OPG* (5).

PAD can be divided into proatherosclerotic and proatherothrombotic.

Endothelial dysfunction plays an important role in the initiation and progression of atherogenesis. Haplotype *eNOS* -786C/4a of the gene for endothelial nitric oxide may cause a reduced nitric oxide (NO) synthesis and may influence the endothelial dysfunction. Inflammation is another essential factor in the pathogenesis of atherosclerosis. A lot of cytokines, chemokines, adhesion molecules and proteolytic enzymes are involved in the progression of inflammation. This process is affected by proatherosclerotic gene variants, e.g. variants of the gene for angiotensin converting enzyme (*ACE*), the gene for interleukin-6 (*IL-6*), *E-selectin*, the gene for the matrix metalloproteinases 1, 3, 9 (*MMP-1,3,9*), and the gene for *connexin-37 C/T 1019*.

Proatherothrombotic genes also play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis by their influence on the coagulation pathway. The *H2* allele of the gene for ADP receptor on the platelet surface (*P2Y12*), and the polymorphism 677C>T of the gene for methyltetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) are associated with an increased risk of PAD development and progression.

The large group of so-called, “new” gene polymorphisms related to PAD, in which the pathophysiologic function is not exactly known, is still not elucidated.

Overview of candidate genes associated with PAD

The osteoprotegerin gene (*OPG*), also termed *TNFRSF11B* (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B), is a single copy gene cluster on chromosome 8q23 – 24 (5). Osteoprotegerin (*OPG*) is a basic secretory glycoprotein and presents as a soluble bone protector. *OPG* is highly expressed in many different cell types such as osteoblasts, cells involved in atheroma plaques development and progression such as arterial smooth muscle cells and endothelial cells (6, 7). In endothelial cells, *OPG* acts as a survival and antiapoptotic factor (5). Serum *OPG* level has been demonstrated to be correlated with the severity of atherosclerosis. Elevated *OPG* concentrations have been documented to be related with the severity of unstable angina, PAD and heart failure, vulnerable carotid plaques, symptomatic carotid stenosis, asymptomatic coronary artery disease (CAD), and acute myocardial infarction (MI) (6). *OPG* is an early predictor of cardiovascular disease (8), with potential use as a biomarker in a wide range of pathologic conditions (osteoporosis, arthritis, vascular calcification, cancer bone-related disease, diabetic complications, atherosclerosis and mortality) (5). *OPG* levels are elevated in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus (DM) with microvascular complications, microalbuminuria and macroalbuminuria, in obese individuals, patients with metabolic syndrome and hypertension. Insulin, statin, glitazone treatment and weight reduction therapy result in the decrease of *OPG* serum concentrations (5).

Recentné štúdie preukázali, že polymorfizmy génu *OPG* rs2073617 (C950T, t. j. záměna tymínu za cytozín na pozícii 950), rs2073618 (C1181G), rs3134069 (T245G) sú asociované s vulnerabilitou karotických plakov a rizikom cievnych mozgových príhod (CMP) aj KVS ochorení (8). Pri polymorfizme rs2073618 sa zistilo, že C alela predstavuje rizikový faktor (RF) pre rozvoj diabetickej nohy u mužov, CC vs. CG + GG (OR 1,72; $p = 0,035$) (7). Pacienti s C alelou rs2073617 aj rs2073618 majú vyššiu hladinu cirkulujúceho *OPG* a častejší výskyt KVS ochorení (6). Pacienti s artériovou hypertenziou a polymorfizmom rs2073617 v géne *OPG* mali signifikantne väčšiu hrúbku intimo-mediálneho komplexu (IMT) v porovnaní s nosičmi genotypu TC alebo TT (5). Pri polymorfizme rs2073617 predstavuje A alela ochranu pred rozvojom diabetickej nohy u žien, AA vs. AG (OR 0,45; $p = 0,045$) (7).

Haptoglobín (Hp) je plazmatický proteín, ktorý viaže extrakorpuskulárny hemoglobín (Hb), a tak stabilizuje hémové železo v jeho vnútri a chráni tkanivá pred oxidačným poškodením. Hp ovplyvňuje aj zápalový proces a funkciu buniek imunitného systému. Gén *Hp* je lokalizovaný na chromozóme 16 (16q22.2) a má dve alely *Hp1* a *Hp2*. Alela *Hp2* je mutovaná verzia alely *Hp1* a je unikátna pre ľudí. Polymorfizmus rs72294371 vedie ku vzniku troch štrukturálne a funkčne rozdielnych proteínov s genotypovou frekvenciou v západnej Európe *Hp 1-1* 16 %, *Hp 2-1* 48 %, *Hp 2-2* 36 %. *Hp 2-2* má nižšiu antioxidačnú aktivitu, lebo je menej efektívny v naviazaní voľného hemoglobínu. *Hp 2-2* je najviac angiogénny fenotyp, čo je spojené s dlhšou klaudikačnou vzdialenosťou u pacientov s PAOO DK a týmto genotypom (9). Epidemiologické štúdie dosiahli rozporuplné výsledky. V niektorých štúdiách sa genotyp *Hp 2-2* spájal so závažnosťou IM a s častejším výskytom PAOO DK. Na druhej strane sa v iných štúdiách zistil častejší výskyt CMP, ICHS a tiež dvojnásobne vyššie riziko úmrtí v súvislosti s ICHS u pacientov s genotypom *Hp 1-1* (Framinghamská Offspring štúdia; Brunecká štúdia). Ako potenciálne vysvetlenie heterogenity výsledkov medzi rôznymi štúdiami v asociácii génu *Hp* s KVS ochorením sa predpokladá vplyv metabolickej kompenzácie diabetu vyjadrenej hladinou HbA1c (9).

Gén *ATXN2* je lokalizovaný na chromozóme 12q24-12q24.1. C alela intrónového SNP rs653178 sa vyskytuje častejšie u pacientov s PAOO DK (52 %) v porovnaní s kontrolami (47 %). Polymorfizmus rs653178 je v takmer kompletnej väzbovej nerovnováhe ($r^2 = 0,99$) s missense polymorfizmom (rs3184504) v géne pre SH2B adaptorový proteín 3, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v imunitnej a zápalovej odpovedi a vaskulárnej homeostáze. Tento SNP má pleiotropný efekt, spája sa s IM, KVS ochoreniami, ovplyvňuje množstvo trombocytov a eozinofilov. Vyskytuje

Previous studies have shown that the polymorphisms of the rs2073617 (C950T, i.e. substitution of thymine for cytosine at position 950), rs2073618 (C1181G), rs3134069 (T245G) are significantly associated with the vulnerability of carotid plaques, increased risk of ischemic stroke and cardiovascular disease (CVD) (8). In the rs2073618 polymorphism, the C allele was a risk factor for diabetic foot in men with diabetes in the allelic variants CC vs. CG + GG (OR 1.72; $p=0.035$) (7). Patients with C allele rs2073617 and rs2073618 have higher circulating levels of *OPG* and increased risk of cardiovascular disease (6). Hypertensive subjects with the CC genotype and polymorphism rs2073617 showed significantly increased intima-media thickness (IMT) compared to those hypertensives with the TC and TT genotypes (5). The A allele of the rs2073617 polymorphism protects women in variant AA vs. AG against diabetic foot (OR 0.45; $p=0.045$) (7).

Haptoglobin (Hp) is a plasma protein that binds extracorporeal hemoglobin, stabilizes heme iron within hemoglobin and prevents the infliction of iron-mediated oxidative tissue damage. In addition, Hp has numerous functions apart from hemoglobin clearance, taking part in inflammatory pathways and interfering with the immune cells functions. The *Hp* gene is located on chromosome 16q22.2 and has 2 major alleles, *Hp1* and *Hp2*. Of these, *Hp2* is a mutated version of the *Hp1* and is unique to humans. This common polymorphism rs72294371 leads to the synthesis of 3 structurally and functionally distinct proteins *Hp 1-1*, *Hp 2-1*, and *Hp 2-2*, with reported genotype frequencies in subjects of Western European descent of 16%, 48% and 36%. *Hp 2-2* was reported to be less efficient than *Hp 1-1* in the hemoglobin binding and prevents oxidation by stabilizing heme iron within the hemoglobin molecule, thereby displaying lower antioxidant activity. *Hp 2-2* is the most angiogenic phenotype, which was discussed as an explanation for the longer walking distance in *Hp 2-2* peripheral vascular disease patients (9). Epidemiological studies conducted in general populations, however, have shown contradictory results. On one hand, *Hp 2-2* was linked to the severity of myocardial infarction (MI) and to more frequent (but less severe) PAD. On the other hand, other studies have found that the *Hp 1* allele was more frequent in patients with coronary artery disease (CAD), lacunar stroke, and that these patients had a two-fold risk for CAD (Framingham Offspring study, Bruneck study). As a potential explanation for the substantial heterogeneity in the association *Hp* gene polymorphism–CVD between the various studies, the effect of modification by levels of glycated hemoglobin (HbA1c) has been proposed (9).

The *ATXN2* gene is located on chromosome 12q24-12q24.1. The C allele of the intronic SNP rs653178 at the *ATXN2-SH2B3* locus on chromosome 12 was present more frequently in PAD cases (52%) than in controls (47%) The SNP rs653178 is in strong linkage disequilibrium with a missense SNP rs3184504

sa v populácii relatívne často a je spájaný s protektívnym efektom proti bakteriálnej infekcii, predstavuje pravdepodobne selekčnú výhodu (4).

Gén *OSBPL10* je lokalizovaný na chromozóme 3p22.3 a kóduje oxysterol binding protein like 10. Reguluje lipidový metabolizmus, spája sa s vysokou hladinou triacylglycerolov (TAG), s metabolizmom a transportom cholesterolu. Dyslipidémia je jedným z RF PAOO DK, a preto sa predpokladá, že polymorfizmy génu *OSBPL10* sú asociované s PAOO DK, ICHS, CMP cestou dysregulácie sérovej homeostázy lipidov (10). Celogenómová štúdia asociácie lokusu *OSBPL10* a PAOO DK v japonskej populácii identifikovala polymorfizmy ovplyvňujúce rozvoj PAOO DK vnútri intrónu 5 (rs1902341, rs6779621, rs2168422, rs2045298), avšak táto asociácia nedosiahla celogenómovo významnú úroveň (5×10^{-7} až 5×10^{-8}) (10).

Gén *DAB2IP* je lokalizovaný na chromozóme 9q33 a kóduje disabled homolog 2-interacting protein, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri vzniku metastáz pri karcinóme prostaty. Pokles množstva proteínu vedie ku vystupňovaniu bunkovej proliferácie a redukcii apoptózy (11). Sekvenčný variant v géne *DAB2IP* rs7025486(A) je silno asociovaný s prítomnosťou aneurizmu abdominálnej aorty (OR na alelu 1,21; $p = 4,6 \times 10^{-10}$). Zistená bola aj súvislosť s včasným prejavom IM (OR 1,18; $p = 3,1 \times 10^{-5}$), IM v ktoromkoľvek veku (OR = 1,08; $p = 0,0012$), PAOO DK (OR 1,14; $p = 3,9 \times 10^{-5}$), venóznym tromboembolizmom (OR 1,12; $p = 0,0079$), pľúcnou embóliou (OR 1,20; $p = 0,00030$) (12).

Polymorfizmy génu *9p21* (rs1333040, rs2383207, rs10757278 a rs1333049) sú asociované s rizikom aterosklerózy, ICHS, IM, ischemickej CMP aj artériových aneurizmiem (12). V prípade SNP rs1333049 sa v troch štúdiách na starších populáciách zistilo, že každá kópia C alely navyše zvyšuje riziko PAOO DK (OR 1,34; $p = 0,002$). Po vylúčení pacientov s anamnézou IM, polymorfizmus rs1333049 bol aj naďalej signifikantne asociovaný s nižším členkov-ramenným indexom (ABI) ($p = 1,3 \times 10^{-4}$) a PAOO DK (OR 1,29; $p = 0,012$). Asociácia pretrvávala aj po úprave vzhľadom na DM, hypertenziu, hypercholesterolémiu a fajčiarsky status (13). Metaanalýza 21 celogenómových asociačných štúdií skúmajúca asociáciu variantov génu *9p21* s ABI preukázala, že v objavnej (discovery) analýze mal SNP rs10757269 na chromozóme 9 v blízkosti *CDKN2B* najsilnejšiu asociáciu s ABI ($p = 2,46 \times 10^{-8}$). V replikačnej analýze bol výsledok podobný ($p = 0,0176$). Táto spojitosť bola ešte silnejšia, keď sa skombinovala objavná a replikačná analýza ($p = 2,65 \times 10^{-9}$). Keď sa vylúčili pacienti s anamnézou ICHS a zistovala sa asociácia tohto SNP s ABI, výsledok síce dosiahol štatistickú významnosť, ale už nie na celogenómovej úrovni (14).

in *SH2B3*, an adapter protein that plays a key role in immune and inflammatory response pathways and vascular homeostasis. This SNP exhibits significant pleiotropic effects and has been previously associated with multiple phenotypes including myocardial infarction, cardiovascular disease, and has been implicated in the hematological parameters such as platelet count, mean-platelet volume and eosinophil count. The relatively high frequency of this SNP in the general population is speculated to be due to a protective effect against bacterial infection (principle of natural selection) (4).

The *OSBPL10* gene is located on chromosome 3p22.3 and encodes oxysterol binding protein like 10. *OSBPL10* polymorphism is associated with a high triglyceride concentration and regulates cellular lipid metabolism. Because dyslipidemia is one of the risk factors of PAD, it can be speculated that *OSBPL10* associates with PAD through the dysregulation of serum lipid homeostasis. *OSBPL10* may be associated with cholesterol metabolism or transport, suggesting that it may be associated with CAD and/or ischemic stroke (10). Genome-wide association studies of *OSBPL10* and PAD in the Japanese population identified several candidate SNPs located within introne 5 (rs1902341, rs6779621, rs2168422, rs2045298), but the association has not reached a genome-wide significant statistical level ($p=5 \times 10^{-7}$ - 5×10^{-8}) (10).

The *DAB2IP* gene, located on chromosome 9q33, encodes disabled homolog 2-interacting protein, which plays an important role in prostate cancer metastasis. A SNP in this gene has been associated with aggressive prostate cancer, whereas in vitro functional studies have demonstrated that loss of the protein leads to enhanced cell proliferation and reduced apoptosis (11). A recent GWAS found a sequence variant in *DAB2IP* rs7025486(A) to be strongly associated with the presence of abdominal aortic aneurysm (AAA) with a per allele OR of 1.21; $p = 4.6 \times 10^{-10}$. The authors also found an association with early onset MI (OR 1.18; $p = 3.1 \times 10^{-5}$), MI at all ages (OR = 1.08; $p = 0.0012$), PAD (OR 1.14; $p = 3.9 \times 10^{-5}$), venous thromboembolism (OR 1.12; $p = 0.0079$) and pulmonary embolism (OR 1.20; $p = 0.00030$) (11).

A recent discovery has noted that variation of SNPs on **chromosome 9p21** (rs1333040, rs2383207, rs10757278 a rs1333049) is highly associated with the risk of atherosclerosis, CAD, MI, atherosclerotic stroke subtype and arterial aneurysms (12). The C allele at rs1333049 is associated with an increased prevalence of PAD (OR 1.34; $p = 0.002$) and lower ABI. This association was independent of the presence of diagnosed MI and atherosclerotic risk factors in three previous Caucasian population studies. This association remained significant after adjustment for baseline and incident MI cases over a 6-year follow up for both ankle-brachial indices ($p = 1.3 \times 10^{-4}$) and PAD (OR 1.29; $p = 0.012$). The association also remained

Gén PAX2 (paired box gene 2) ovplyvňuje formáciu tkanív a orgánov v priebehu embryonálneho vývinu. V metaanalýze 21 celogenómových asociačných štúdií žiadna z asociácií SNP a PAOO DK nedosiahla významnosť na celogenómovej úrovni. Najsilnejšia asociácia bola u SNP rs6584389 na chromozóme 10 pri géne PAX2 (OR 1,17; 95 % CI 1,10; 1,25; $p = 2,34 \times 10^{-6}$) (14).

Gén NOS3 je lokalizovaný na chromozóme 7q35-7q36. Variácie v géne pre endoteliálnu syntázu oxidu dusnatého (NOS3) môžu ovplyvniť dostupnosť oxidu dusnatého (NO) a redukujú vaskulárnu reaktivitu, a tak môžu predisponovať k rozvoju aterosklerotického cievneho postihnutia ako je PAOO DK (15). SNP rs891512 a rs1808593 vo väzbovej nerovnováhe sa významne spájajú s ABI. Nosičstvo alely jedného z týchto polymorfizmov môže byť teda spojené so zvýšeným rizikom PAOO DK. Haplotype GG z SNP páru rs1808593 – rs7830 je spojený s nižším ABI (15).

Gén CHRNA3 je lokalizovaný na chromozóme 15q25. Celogenómové a observačné štúdie dokázali, že varianty v géne nikotínového acetylcholinového receptora (CHRNA5, CHRNA3, CHRNA4) sa spájajú s vyššou kvantitou fajčenia aj KVS rizikovými faktormi. U súčasných fajčiarov sa T alela polymorfizmu rs1051730 v géne CHRNA3 spája s vyšším počtom vyfajčených cigariet za deň, nižším indexom telesnej hmotnosti (BMI), obvodom pása a bokov, vyššou pulzovou frekvenciou v pokoji, nižšou koncentráciou TAG aj s vyššou glomerulovou filtráciou. Každá T alela sa navyše spája s nižším systolickým TK a nižším pulzovým tlakom, vyššou koncentráciou HDL cholesterolu, vyšším non-HDL cholesterolom. Podobne aj v celogenómovej štúdii nikotínovej závislosti a PAOO DK na Islande sa zistilo, že T alela SNP rs1051730 je signifikantne asociovaná s PAOO DK (OR 1,18; $p = 5,3 \times 10^{-5}$) (16).

Gén pre LDL receptor (LDLR) je lokalizovaný na chromozóme 19p13.2. Celogenómové štúdie identifikovali, že polymorfizmy lokusu LDLR ovplyvňujú hladinu faktora VIII a sú asociované s rizikom ICHS nezávisle od hladiny plazmatických lipidov. T alely polymorfizmov rs688 a rs2228671 sa spájali s vyššími hladinami faktora VIII, vyšším výskytom ICHS aj s nižšou hladinou celkového a LDL cholesterolu. Vysoká hladina koagulačného faktora VIII je nezávislý RF ICHS a je asociovaná s výskytom KVS ochorení (17).

Záver

Doposiaľ bol výskum genetických variantov asociovaných s PAOO DK menej úspešný ako v prípade genetiky koronárnej choroby srdca. Je pravdepodobné, že pri vzniku a progresii PAOO DK je veľmi významný vplyv environ-

significant after adjustment for known atherosclerosis risk factors including DM, smoking, hypercholesterolemia and hypertension (13). A metaanalysis of GWAS data from 21 population based cohorts that studied the association of 9p21 variants and ABI, identified the strongest association of SNP rs10757269 on chromosome 9p21 near CDKN2B with ABI ($p=2.46 \times 10^{-8}$) in the discovery set. The magnitude and direction of the association in the replication studies was similar to the discovery set ($p = 0.0176$). In the combined study discovery plus replication metaanalysis, the association between the ABI values and SNP rs10757269 became stronger ($p=2.65 \times 10^{-9}$). After excluding individuals with CAD, the association was present but it was no longer genome-wide significant (14).

The PAX2 gene (paired box gene 2) influences the formation of tissues and organs during embryonal development. In metaanalysis of 21 GWAS none of the SNP associations for the PAD phenotype achieved genome-wide statistical significance. The strongest association was found for rs6584389 on chromosome 10 near the PAX2 gene (OR 1.17; 95% CI 1.10; 1.25; $p=2.34 \times 10^{-6}$) (14).

NOS3 gene is located on chromosome 7q35-7q36. Variations in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) may influence bioavailability of NO and reduce vascular reactivity, thereby predisposing to the development of atherosclerotic vascular diseases including PAD (15). Two SNPs rs891512 and rs1808593 in linkage disequilibrium were significantly associated with ABI. The minor allele for one of these polymorphisms could be associated with an increased risk for PAD. The GG haplotype from the SNP rs1808593 and rs7830 may be associated with lower ABI values (15).

The CHRNA3 gene is located on chromosome 15q25. GWAS have provided strong evidence that common genetic variants in the nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5, CHRNA3, CHRNA4) are associated with higher smoked cigarette quantity and cardiovascular risk factors. Among smokers, each T allele of the SNP rs1051730 in the CHRNA3 gene is associated with increased intensity of smoking, lower body mass index (BMI) and waist and hip circumferences, higher resting heart rate and estimated glomerular filtration rate, and lower triglyceride concentration. Each additional T allele is associated with lower systolic blood pressure and pulse pressure and higher HDL and non-HDL cholesterol concentrations. Similarly, in the GWAS of nicotine addiction and PAD in Iceland it was confirmed that the T allele of SNP rs1051730 was significantly associated with PAD (OR 1.18; $p=5.3 \times 10^{-5}$) (16).

The LDL receptor gene (LDLR) is located on chromosome 19p13.2. The GWAS identified that polymorphisms at LDLR locus modulate coagulation factor VIII levels and may be associated with CAD risk independently from plasma

Tabuľka 1 Polymorfizmy (SNP) asociované s PAOO DK v celogenómových štúdiách (modifikované podľa 18)**Table 1** SNPs associated with PAD in genome – wide association studies (modified according to 18)

SNP	Lokus (Locus)	Prípady (n) (Cases) (n)	Kontroly (n) (Controls) (n)	OR (95 % CI)	p (p value)	RAF	Najbližší gén (Nearest gene)
rs10757278-G	9p21	2599	15012	1,14 (1,07, 1,22)	6,1x10 ⁻⁵	0,42-0,51	CDKN2A/ CDKN2B
rs1051730-C	15q24	2738	29964	1,19 (1,12, 1,27)	1,4x10 ⁻⁷	0,27-0,37	CHRNA
rs7025486-A	9q33	3690	12271	1,14 (1,07, 1,21)	3,9x10 ⁻⁵	0,23	DAB12
rs1902341-G	3p23	195 699	1358 1540	1,31 (1,18, 1,46)	5x10 ⁻⁷	0,397	OSBPL
rs6584389-C	10	3409	68002	1,17 (1,10, 1,25)	2,3x10 ⁻⁶	0,50	PAX2
rs653178-C	12q24	1641 740	1604 1051	1,22 (1,13, 1,32)	6,46x10 ⁻⁷	0,49	SH2B3- ATXN

SNP – single nucleotide polymorphism, OR – odds ratio; RAF – frekvencia rizikovej alely (risk allele frequency in controls)

mentálnych faktorov (najmä DM, fajčenia). Fenotypová heterogenita PAOO DK bude pravdepodobne hlavnou výzvou pri ozrejmovaní genetickej podstaty PAOO DK. Na základe výsledkov z doterajších celogenómových štúdií vieme, že je potrebný veľký počet prípadov a kontrol na identifikáciu potenciálnych génových variantov asociovaných s PAOO DK. Metaanalýzy z celogenómových štúdií prinášajú ďalšie aditívne údaje v multidisciplinárnom manažmente pacientov s PAOO DK a perspektívne umožnia personalizáciu terapie (18) (tabuľka 1).

Táto publikácia bola vytvorená s 50 % realizáciou projektu „Centrum excelentnosti pre výskum aterosklerózy (CEVA)” na základe podpory Operačného programu výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (číslo zmluvy 034/2009/2.1/OPVaV) a 50 % riešením projektu VEGA 1/0389/14.

lipids. T alleles of polymorphisms rs688 a rs2228671 were associated with higher coagulation factor VIII levels, higher CAD incidence and reduced total and LDL cholesterol levels. A high level of coagulation factor VIII is an independent risk factor for CAD and is associated with CVD (17).

Conclusion

To date, the search for genetic susceptibility variants of PAD has been less successful in comparison to genetics of CAD. Possible reasons include a potentially stronger environmental contribution to PAD (smoking and diabetes mellitus). Phenotypic heterogeneity of the PAD appears to be a major challenge in the investigation of the genetic basis for PAD. Given the results of GWAS so far, it is clear that large number of PAD cases and controls are needed to identify gene susceptibility variants. Metaanalyses of GWAS give additive data in the multidisciplinary management of patients with PAD with a perspective for therapy personalization (18) (Table 1).

This study was supported by the Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic for the Structural Funds of the European Union, Operational Programme Research and Development (Contract No. 034/2009/2.1/OPR&D).

Literatúra/References

- Nicolaides A, et al. Ultrasound and carotid bifurcation atherosclerosis. London: Springer; 2012:649.
- Karetova D, Stanek F, et al. Angiologie pro praxi. Praha: Maxdorf; 2007:400.
- Mandovec A. Kardiovaskulární choroby u žen. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2008:128.
- Kullo IJ, et al. The ATXN2-SH2B3 locus is associated with peripheral arterial disease: an electronic medical record – based genome – wide association study. Front Genet 2014;5(1):1-6.
- Perez de Ciriza C, Lawrie A, Varo N. Osteoprotegerin in cardiometabolic disorders. International Journal of Endocrinology 2015;2015(1):1-15.

6. Song DH, et al. Relationships of *OPG* Genetic polymorphisms with susceptibility to cardiovascular disease: a meta – analysis. *Med Sci Monit* 2016;22(1):1223-1231.
7. Nehring P, et al. Osteoprotegerin gene rs2073617 and rs3134069 polymorphisms in type 2 diabetes patients and sex – specific rs2073618 polymorphism as a risk factor for diabetic foot. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(4):176-182.
8. Guo C, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genetics and Molecular Biology* 2013;36(2):177-182.
9. Pechlaner R, et al. Haptoglobin 2-2 Genotype is Not Associated With Cardiovascular Risk in Subjects With Elevated Glycohemoglobin – Results From the Bruneck Study. *J Am Heart Assoc* 2014;3(3):1-8.
10. Koriyama H, et al. Identification of evidence suggestive of an association with peripheral arterial disease at the *OSBPL10* locus by genome – wide investigation in the Japanese population. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(10):1054-1062.
11. Harrison SC, et al. Association of a sequence variant in *DAB2IP* with coronary heart disease. *Eur Heart J* 2012;33(7):881-888.
12. Lin HF, et al. Sex differential genetic effect of chromosome 9p21 on subclinical atherosclerosis. *Plos One* 2010;5(11):1-6.
13. Cluett C, et al. The 9p21 myocardial infarction risk allele increases risk of peripheral artery disease in older people. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(4):347-353.
14. Murabito JM, et al. Association Between Chromosome 9p21 Variants and the Ankle – Brachial Index Identified by a Meta – Analysis of 21 Genome – Wide Association Studies. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5(1):100-112.
15. Kullo IJ, et al. Association of polymorphisms in *NOS3* with the ankle – brachial index in hypertensive adults. *Atherosclerosis* 2008;196(2):905-912.
16. Asvold BO, et al. Causal associations of tobacco smoking with cardiovascular risk factors: a Mendelian randomization analysis of the HUNT Study in Norway. *International Journal of Epidemiology* 2014; 43(5):1458-1470.
17. Martinelli N, et al. Polymorphisms at *LDLR* locus may be associated with coronary artery disease through modulation of coagulation factor VIII activity and independently from lipid profile. *Blood* 2010;116(25):5688-5697.
18. Kullo IJ, Leeper NJ. The genetic basis of peripheral arterial disease: current knowledge, challenges and future directions. *Circ Res* 2015;116(9):1551-1560.