



Wydział Lekarski II

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Natalia Żuk

**Ocena wpływu wybranych czynników genetycznych
na patomechanizm powstawania tętniaka aorty brzusznej**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotorzy: **prof. dr hab. n. med. Wojciech Witkiewicz**

dr n. biol. Joanna Dubis

Poznań 2014

Rozprawa doktorska jest częścią projektu „Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym, gdzie została w całości wykonana.

Panu prof. dr hab. Wojciechowi Witkiewiczowi
składam serdeczne podziękowania
za twórczą inspirację, zyczliwość i nieustające wsparcie
w trakcie realizacji tej pracy.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	8
1.1. Tętniak aorty brzusznej	8
1.2. Epidemiologia	10
1.3. Etiologia i czynniki ryzyka	11
1.4. Patofizjologia	12
1.5. Stadium przedkliniczne i kliniczne	17
1.6. Podłoże genetyczne	18
1.7. Badanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów	20
1.7.1. Gen <i>PTPN22</i> kodujący niereceptorową fosfatazę tyrozynową typu 22.....	21
1.7.2. Gen <i>CTLA-4</i> kodujący antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytom T	23
1.7.3. Gen <i>TAFI</i> kodujący aktywowany przez trombinę inhibitor fibrynolizy	24
1.7.4. Gen <i>FGB</i> kodujący łańcuch beta fibrynogenu	26
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. Charakterystyka uczestników badania	30
3.1.1. Grupa badana	30
3.1.2. Grupa kontrolna	31
3.1.3. Materiał do badań	33
3.2. Metodyka badań.....	33
3.2.1. Wywiad z uczestnikiem badania	33
3.2.2. Izolowanie całkowitego genomowego DNA z krwi obwodowej	34
3.2.3. Analiza ilości i jakości wyizolowanego DNA	35
3.2.4. Oznaczanie polimorfizmów typu SNP metodą dyskryminacji alleli	35
3.2.5. Oznaczanie polimorfizmów typu SNP metodą PCR-RFLP	37

3.2.6. Oznaczanie aktywności TAFI w osoczu	42
3.2.7. Analiza statystyczna uzyskanych wyników	42
4. WYNIKI.....	45
4.1.Charakterystyka badanej populacji	45
4.2.Wyniki oznaczeń polimorfizmów genetycznych.....	53
4.2.1. Polimorfizm 1858C/T genu <i>PTPN22</i>	53
4.2.2. Polimorfizm -1123G/C genu <i>PTPN22</i>	54
4.2.3. Polimorfizm 49A/G genu <i>CTLA-4</i>	55
4.2.4. Polimorfizm -455G/A genu <i>FGB</i>	56
4.2.5. Polimorfizm -438G/A genu <i>TAFI</i>	57
4.3. Średnica aorty	60
4.4. Skrzeplina przyścienna	64
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	68
6. WNIOSKI.....	89
7. STRESZCZENIE	90
8. ABSTRACT	93
9. LITERATURA.....	96
10. SPIS TABEL I RYCIN	111
11. ZAŁĄCZNIKI.....	117

WYKAZ SKRÓTÓW

AD	średnica aorty (ang. <i>aortic diameter</i>)
APC	komórki prezentujące antygen (ang. <i>antigen presenting cell</i>)
ASI	wskaźnik wielkości aorty (ang. <i>aortic size index</i>)
BSA	powierzchnia ciała (ang. <i>body surface area</i>)
CTLA-4	antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytom T (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
EVAR	wewnątrznaczyniowa technika zaopatrzenia tętniaka (ang. <i>endovascular aneurysm repair</i>)
FRd	domena analogiczna do fibrynogeny (ang. <i>fibrynogen related domain</i>)
FRET	fluorescencyjny rezonansowy transfer energii (ang. <i>Förster/Fluorescent Resonance Energy Transfer</i>)
GWAS	badania asocjacyjne całego genomu (ang. <i>genome-wide association study</i>)
H-W	równowaga Hardy'ego-Weinberga
ILT	skrzepina przyścienna (ang. <i>intraluminal thrombus</i>)
ITAM	motyw aktywacyjny receptora tyrozynowego (ang. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
Lyp	limfocytarna fosfataza tyrozynowa (ang. <i>lymphoid tyrosine phosphatase</i>)
MHC	układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
OR	iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTPN22	niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 22 (ang. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>)

RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TAB	tętniak aorty brzusznej
TAFI	aktywowany przez trombinę inhibitor fibrynolizy (ang. <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>)
TK	tomografia komputerowa
VSMC	komórka mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ang. <i>vascular smooth muscle cell</i>)
VW-SC/PC	rezydentne/spoczynkowe macierzyste i progenitorowe komórki ścian naczyń krwionośnych (ang. <i>vascular wall-resident stem cells/progenitor cells</i>)

NOMENKLATURA

nazwy białek – czcionka prosta, np. CTLA-4

nazwy genów – kursywa, np. *CTLA-4* oznacza gen kodujący białko CTLA-4

1. WSTĘP

Współcześnie od lekarzy wymaga się zarówno skutecznego i bezpiecznego jak również opłacalnego ekonomicznie postępowania medycznego. Dla realizowania tej strategii istotne jest połączenie umiejętności i doświadczenia klinicystów z danymi pochodzącymi z badań naukowych. Jest to szczególnie ważne w przypadku schorzeń takich jak tętniak aorty brzusznej, dla których nie opracowano skutecznego systemu wczesnej diagnostyki ani terapii farmakologicznej. Pomimo ciągłego rozwoju chirurgii, także wyniki leczenia chorych z tętniakiem objawowym czy pękniętym nie są zadowalające, co potwierdza zasadność prowadzenia badań nad tą chorobą. Analizując literaturę światową, można stwierdzić, że w ciągu ostatnich 30 lat poczyniono ogromny postęp w badaniach nad tętniakiem aorty brzusznej ale równie wiele pracy jest jeszcze do wykonania, zanim uda się przybliżyć do zidentyfikowania przyczyn powstawania tej złożonej patologii naczyniowej. Niemniej jednak każde kolejne badanie zbliża do celu, jakim jest moment, w którym medycyna oparta na dowodach naukowych będzie wspomagała lekarzy w podejmowaniu najlepszych decyzji terapeutycznych, które z kolei warunkują skuteczność leczenia i bezpieczeństwo pacjentów.

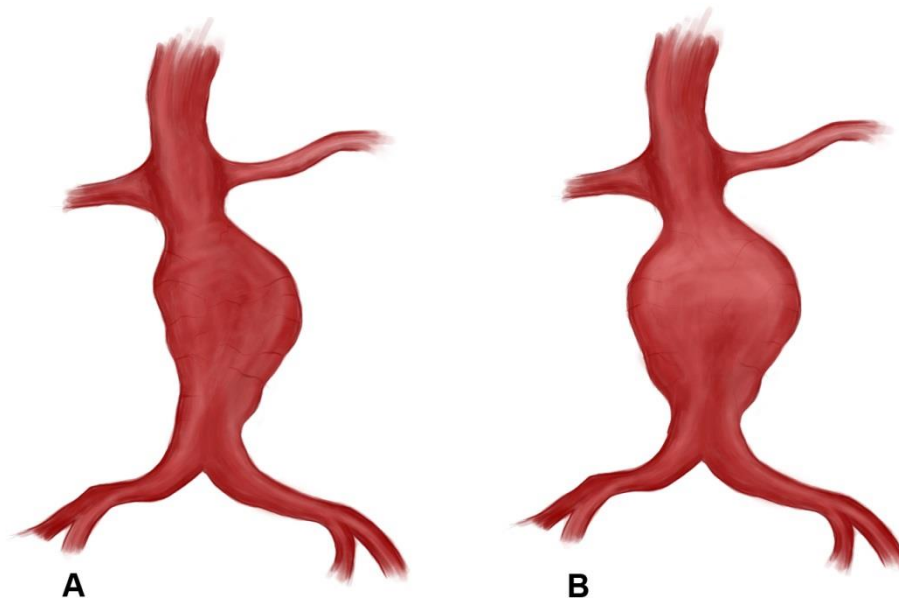
1.1. Tętniak aorty brzusznej

Brzuszny odcinek aorty rozpoczyna się w rozwarze aortowym przepony na wysokości XII kręgu piersiowego, następnie biegnie po przedniej powierzchni kręgów lędźwiowych z nieznacznym przesunięciem w lewo, a kończy się podziałem na tętnice biodrowe wspólne w pobliżu dolnej części trzonu kręgu L4. Przeciętna średnica brzuszego odcinka aorty u zdrowych mężczyzn wynosi od 2.0 do 2.4 cm, natomiast u kobiet od 1.7 do 2.2 cm. Tętniaki w tym odcinku stanowią większość, bo aż 80% wszystkich tętniaków i osiągają średnicę kilkunastu centymetrów (Johnston i wsp., 1991, Noszczyk, 2007).

Według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Chirurgii Naczyniowej tętniak aorty brzusznej (TAB) to stałe, miejscowe poszerzenie brzuszego odcinka aorty do średnicy równej 3 cm lub większej. Klasyfikacja ta stosowana jest zarówno dla kobiet jak i mężczyzn. Przytoczona definicja odnosi się bezpośrednio do wymiaru naczynia. Inna, powszechnie stosowana w piśmiennictwie definicja, proponowana przez Międzynarodowe Towarzystwo Chirurgii Naczyniowej, uwzględnia osobniczą zmienność średnicy aorty. Stosownie z nią za

TAB uznawane jest poszerzenie światła naczynia o co najmniej 50% w stosunku do prawidłowej części naczynia w odcinku proksymalnym (Johnston i wsp., 1991, Moll i wsp., 2011).

Tętniaki aorty brzusznej w około 90% wszystkich przypadków choroby lokalizują się poniżej odejścia tętnic nerkowych. Z reguły kończą się przed podziałem aorty, zdarza się jednak, że obejmują jedną lub obie tętnice biodrowe wspólne. Zazwyczaj mają asymetryczny kształt, określany jako workowaty i szerokie wrota, charakterystyczne dla tego odcinka aorty (Ryc.1A). Rzadziej występują tętniaki wrzecionowate, będące symetrycznymi uwypukleniami ściany aorty (Ryc.1B). W budowie TAB wyróżnia się worek oraz szyję czyli odcinek aorty pomiędzy odejściem tętnic nerkowych a właściwą częścią tętniaka (Noszczyk, 2007).



Ryc. 1. Schematyczny obraz workowatego (A) oraz wrzecionowatego (B) tętniaka aorty brzusznej.

Źródło: opracowanie własne

Ze względu na budowę naczynia stosuje się podział na tętniaki prawdziwe i rzekome. Tętniak prawdziwy to uwypuklenie całej ściany aorty, natomiast jeśli jego ścianę tworzy jedynie warstwa zewnętrzna, to taka zmiana nazywana jest tętniakiem rzekomym. Tętniak rzekomy jest zmianą pourazową, powstałą na skutek uszkodzenia aorty i początkowo ma postać krwiaka tętniącego, który następnie otaczany jest torebką łącznotkankową. Morfologicznie jest to więc ograniczone pęknięcie ściany aorty (Noszczyk, 2007).

1.2. Epidemiologia

Tętniaki aorty brzusznej występują od 3 do 8 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet. Wśród pacjentek natomiast obserwuje się większą śmiertelność z powodu TAB w porównaniu z mężczyznami. Zapadalność na chorobę wzrasta wraz z wiekiem. Znane są jedynie pojedyncze doniesienia dotyczące występowania tętniaków u dzieci, w połączeniu z innymi wadami wrodzonymi. Częstość występowania TAB w Europie szacuje się na od 4% do 9% u mężczyzn i od 1% do 2% u kobiet w 65 roku życia i starszych. Wyniki najważniejszych badań epidemiologicznych, dotyczących występowania TAB, przedstawiono w Tabeli I. Pęknięcie TAB jest przyczyną śmierci od 1% do 2% mężczyzn w wieku powyżej 65 roku życia (Cornuz i wsp., 2004).

Tabela I. Częstość występowania tętniaka aorty brzusznej w wybranych badaniach populacyjnych.

Populacja	Liczba mężczyzn z TAB / bez TAB	Częstość w % (95% CI)	Liczba kobiet z TAB / bez TAB	Częstość w % (95% CI)
Oxford	23 / 426	5.4 (3.5 – 8.0)	brak danych	
Gloucester	71 / 906	7.8 (6.2 – 9.8)	brak danych	
Malmö	39 / 338	11.5 (8.3 – 15.4)	brak danych	
Oslo	41 / 500	8.2 (5.9 – 11.0)	brak danych	
Freemantle	31 / 654	4.7 (3.2 – 6.7)	2 / 571	0.35 (0.04 – 1.3)
Birmingham	706 / 9771	7.2 (6.7 – 7.8)	brak danych	
Rotterdam	91 / 2217	4.1 (3.3 – 5.0)	21 / 3066	0.68 (0.42 – 1.0)
Genoa	65 / 741	8.8 (6.8 – 11.0)	5 / 860	0.58 (0.19 – 1.4)
Chichester	178 / 2342	7.6 (6.6 – 8.7)	40 / 3052	1.3 (0.9 – 1.8)
Viborg	141 / 3344	4.2 (3.6 – 4.9)	brak danych	
USA Counties	278 / 1956	14.2 (12.7 – 15.8)	173 / 2785	6.2 (5.3 – 7.2)
USA Veterans	3298 / 71373	4.6 (4.5 – 4.8)	25 / 2885	1.3 (0.8 – 1.8)
Asola	u 354 mężczyzn i 294 kobiet wykryto 20 TAB; częstość 3.1% (95% CI:1.9– 4.7)			
Edinburgh	w grupie 1156 osób wykryto 34 TAB; częstość 2.9% (95% CI: 2.0 – 4.1)			

Źródło: Zmodyfikowano na podstawie Cornuz i wsp., 2004.

W trakcie rekrutowania grupy kontrolnej do badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy, przeprowadzona została ultrasonograficzna ocena średnicy aorty brzusznej w grupie 272 mężczyzn powyżej 60 roku życia. Wstępne rozpoznanie TAB postawiono u 11 spośród przebadanych osób, co stanowi 4% przebadanej populacji. Wyniki badań epidemiologicznych dowodzą, że już dziś TAB jest istotnym problemem medycznym, a biorąc pod uwagę postępujące starzenie się społeczeństw, można spodziewać się coraz większej zapadalności na tę chorobę.

1.3. Etiologia i czynniki ryzyka

TAB jest chorobą wieloczynnikową, w przebiegu której nierozpoznane jak dotąd czynniki endo- i egzogenne zapoczątkowują i modulują proces patologicznego poszerzania się ściany aorty. Główne czynniki ryzyka, o udowodnionym i opisanym wpływie na powstawanie i rozwój TAB, to: płeć męska, zaawansowany wiek, rasa kaukazyjska, palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, miażdżyca, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku występowania tętniaków aorty (Cornuz i wsp., 2004).

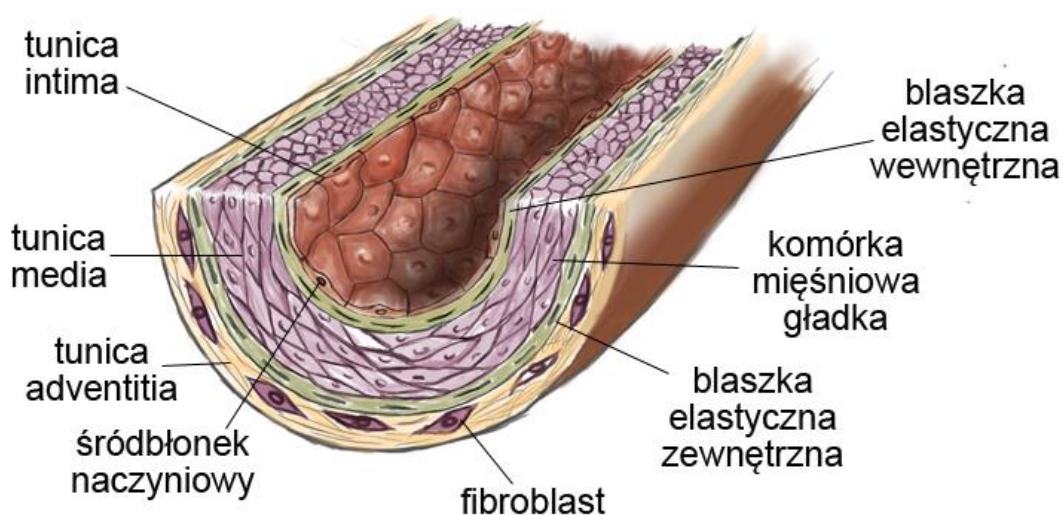
Tętniak aorty może rozwinąć się w przebiegu różnych chorób, do których należą: choroby degeneracyjne (martwica torbielowata błony środkowej, tętniak rozwarstwiający aorty), zaburzenia rozwojowe (zespół Marfana, Loeysa-Dietza, Ehlersa – Danlosa typu IV), wrodzone wady budowy naczyń i choroby zakaźne takie jak salmonelloza. Publikowane są również doniesienia dokumentujące związek TAB z zakażeniami wywoływanymi przez drobnoustroje z gatunków *Chlamydia pneumoniae*, *Treponema pallidum* czy z rodzaju *Staphylococcus*. Występowanie TAB zaobserwowano również w przebiegu szeregu chorób autoimmunizacyjnych takich jak: toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów, sarkoidoza, olbrzymiokomórkowe zapalenie tętnic, reaktywne zapalenie stawów, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, nawracające zapalenie chrząstek, zespół Takayasu, choroba Behçeta czy zespół Cogana (Jagadesham i wsp., 2008, Witkiewicz i wsp., 2005). Stosunkowo mało wiadomo o kaskadzie czynników i procesów zapoczątkowujących rozwój chorób autoimmunizacyjnych. Grupa ta obejmuje około 80 jednostek chorobowych, przeważnie przewlekłych, niepomyślnie rokujących. Uwarunkowana genetycznie, nieprawidłowa prezentacja autoantygenów i błędna identyfikacja komórek własnych, skutkująca zmniejszeniem tolerancji immunologicznej, predysponuje do rozwoju tych

schorzeń (Miller i wsp., 2012). Możliwy wpływ niewłaściwej odpowiedzi układu immunologicznego na rozwój TAB opisywany jest odkład w ścianach tętniaków zaobserwowano obecność nacieków zapalnych. Kolejne sygnały, przemawiające za hipotezą autoimmunologicznego pochodzenia TAB, to wykryte w ścianach chorobowo zmienionego naczynia ciałka Russela, podwyższone stężenie cytokin i znacznie podwyższone stężenia autoantyprzeciwciał i szeregu innych immunoglobulin w porównaniu ze zdrowymi tętnicami. Od tego czasu liczni badacze podejmują temat nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej towarzyszącej tętniakom i jej znaczenia w etiologii choroby (Brophy i wsp., 1991, Lindholt i Shi, 2006).

Pomimo wielu badań, prowadzonych zarówno w materiale ludzkim jak i na modelu zwierzęcym, etiologia TAB jest wciąż słabo zdefiniowana. Niemniej jednak autorzy aktualnych publikacji poświęconych temu zagadnieniu zgadzają się co do połączonego wpływu czynników środowiskowych i genetycznych na powstawanie i rozwój tej choroby.

1.4. Patofizjologia

Aorta jest tętnicą typu sprężystego. Poza transportem krwi wyrzucanej z lewej komory, jej głównym zadaniem jest amortyzacja i zamiana pulsacyjnego przepływu krwi, wynikającego z pracy mięśnia sercowego, w przepływ ciągły, występujący w częściach obwodowych układu tętniczego. Pełniona funkcja jest przyczyną różnic występujących w strukturze ściany tętnic wraz z oddalaniem się od serca. W budowie ściany aorty wyróżnia się trzy główne warstwy: wewnętrzną (łac. *tunica intima s. communis*), środkową (łac. *t. media s. propria*) i zewnętrzną (łac. *t. cellulosa s. adventitia*). Schemat budowy prawidłowej aorty przedstawiono na Rycinie 2 (Young, 2011).



Ryc. 2. Schemat budowy prawidłowej ściany brzusznego odcinka aorty. *Tunica intima* – warstwa wewnętrzna, *tunica media* – warstwa środkowa, *tunica adventitia* – warstwa zewnętrzna.

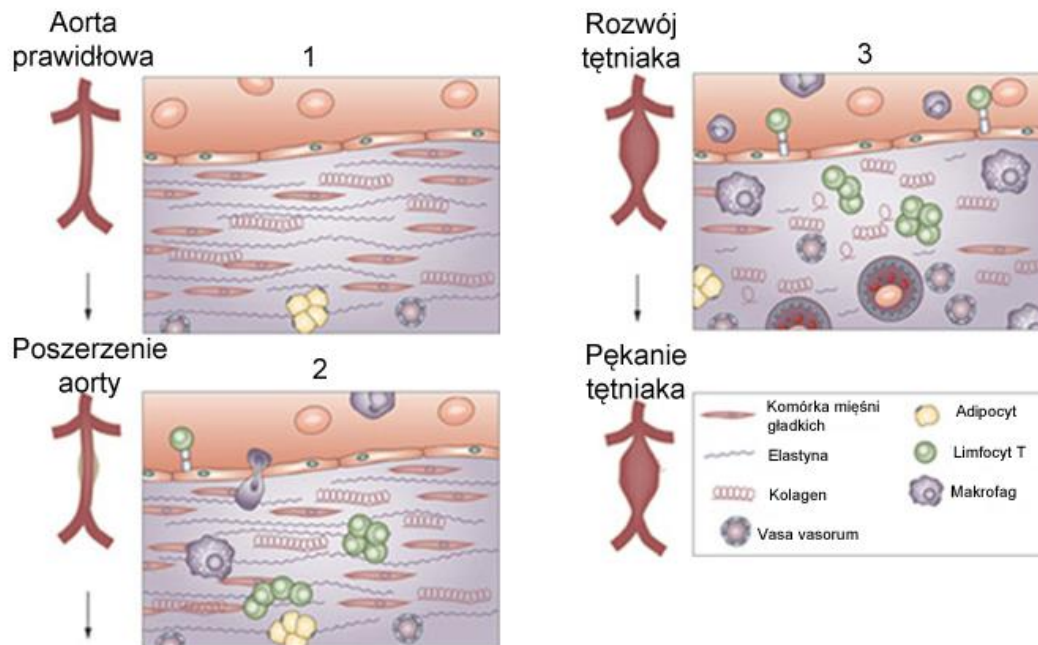
Źródło: opracowanie własne

Warstwę wewnętrzną prawidłowej aorty tworzą komórki śródbłonek naczyniowego przytwierdzone do błony podstawnej, zbudowanej głównie z kolagenu typu IV i podparte macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *extracellular matrix*). *Tunica media* jest najgrubszą warstwą, składającą się z naprzemiennie ułożonych blaszek sprężystych i warstw komórek mięśniowych gładkich naczyń (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cell*) osadzonych w mukopolisacharydowym żelu. To właśnie przede wszystkim włókna sprężyste, w 90% zbudowane z elastyny, decydują o odporności naczynia na działanie sił naprężających. W brzusznej aorty jest ich około 28 warstw, podczas gdy w odcinku piersiowym nawet 50. Jest to jeden z powodów, dla których akurat w tym odcinku aorty najczęściej tworzą się poszerzenia. Ponadto badania histopatologiczne wycinków ścian tętniaków wykazały nieprawidłową strukturę włókien elastycznych oraz zmniejszenie się ich zawartości podczas powiększania się TAB do czasu jego pęknięcia. Ostatnią, włóknistą warstwę zewnętrzną, tworzy tkanka łączna. Jest to warstwa zawierająca kolagen, fibroblasty, odżywcze naczynia krwionośne (*vasa vasorum*) oraz system okołonaczyniowych włókien nerwowych (Baxter i wsp., 1992, Lin i Chaikof, 2000, Sakalihasan i wsp., 1993).

Oprócz złożoności struktury jakościowej, aorta podlega dynamicznym procesom przebudowy. Jest złożoną biostrukturą, bogatą w nisze zasiedlane przez komórki, które mogą się ze sobą komunikować, różnicować, proliferować, uczestniczyć w adhezji i dezadhezji czy podlegać aktywacji i dezaktywacji. Co więcej, te same komórki mogą brać udział zarówno w procesach naprawczych jak i patologicznych. Przykładem mogą być rezydentne/spoczynkowe macierzyste i progenitorowe komórki ścian naczyń krwionośnych (VW-SC/PC, *ang. vascular wall-resident stem cells/progenitor cells*), które najprawdopodobniej odgrywają rolę pierwszego ogniwa w rekonstrukcji uszkodzonego naczynia, a zarazem mogą być zaangażowane w rozwój chorób naczyniowych. Cała ta skomplikowana biostruktura kontrolowana jest przez szereg szlaków regulowanych genetycznie, będących przedmiotem wielu badań i wciąż wymagających poznania (Korta i wsp., 2013).

Ponieważ TAB występuje zwykle u chorych w zaawansowanym wieku, istotnym elementem jego patofizjologii są mechanizmy zachodzące w czasie procesu starzenia się organizmu. Wpływają one znacząco na anatomię, strukturę i hemodynamikę naczyń krwionośnych. Wraz z wiekiem ściany tętnic stają się cieńsze i sztywniejsze, a naczynie poszerza się i wydłuża, przez co uzyskuje bardziej kręty przebieg (Mitchell i wsp., 2004). W porównaniu z młodymi, zdrowymi aortami starsze cechuje ścięczenie błony wewnętrznej i dysfunkcja śródbłonna naczyniowego. Dysfunkcja śródbłonna zwykle rozpoczyna się wcześniej u mężczyzn niż u kobiet, wzrastając wyraźnie po 4 dekadzie życia, co pokrywa się z wiekiem występowania TAB (Botvinick i wsp., 2007, Celermajer i wsp., 1994). W warstwie środkowej postępuje degradacja elastyny, której okres biologicznego półtrwania szacuje się na od 40 do 70 lat. Próba kompensacji tych ubytków skutkuje akumulacją kolagenu i wzrostem liczby jego wiązań krzyżowych. Jednocześnie produkty degradacji elastyny wykazują działanie prozapalne. W ścianie naczynia odkładaniu ulegają także proteoglikany (Hallenthal i wsp., 2009, Lee i Oh, 2010). Każdy z tych procesów wpływa na osłabienie ściany aorty. Wraz z wiekiem wzrasta również liczba leukocytów i makrofagów, udział cytokin, metaloproteinaz oraz innych czynników, charakterystycznych dla stanu zapalnego i arteriosklerozy naczyń (Lee i Park, 2013). Metodami immunohistochemicznymi, w wycinkach histopatologicznych uzyskanych z pobieranych śródoperacyjnie ścian TAB, wykazano obecność nacieków zapalnych z limfocytów T i B w błonie środkowej i zewnętrznej, co potwierdza udział odpowiedzi immunologicznej w przebiegu choroby. Schemat najważniejszych zmian w ścianie aorty, towarzyszących rozwojowi tętniaka,

przedstawiono na Ryc. 3. Reakcja zapalna towarzyszy prawie wszystkim tętniakom, a jej nasilenie może być tak duże, że obejmuje również struktury leżące w bezpośrednim sąsiedztwie naczynia. Taki tętniak jest wówczas określany jako zapalny (Drożdż i wsp., 2014, Rubio-Ruiz, 2014).



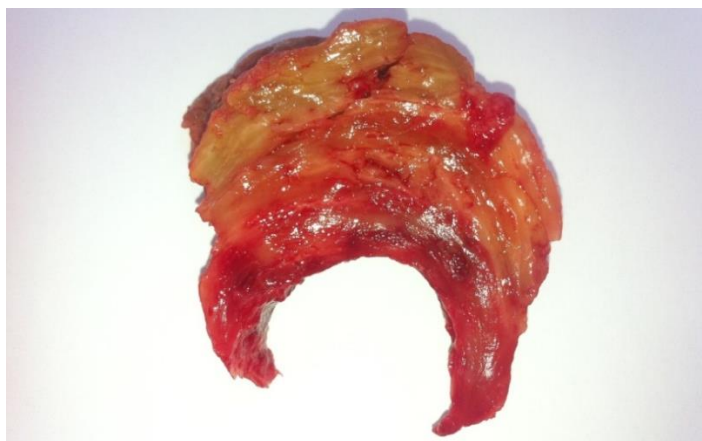
Ryc. 3. Schemat rozwoju tętniaka aorty brzusznej i towarzyszących mu zmian w ścianie aorty.

Źródło: zmodyfikowano za Hallenthal i wsp., 2009.

Obrazowi klinicznemu TAB najczęściej towarzyszy obecność blaszek miażdżycowych. Do niedawna miażdżycy była rozpatrywana jako czynnik ryzyka wystąpienia i rozwoju choroby, a tętniaki nazywane bywały „miażdżycowymi”. Pomimo, iż jeszcze w 2011 roku opublikowano artykuł w którym TAB nazywany jest „szczególną formą miażdżycy”, to dotychczas nie znaleziono przekonujących dowodów na to, że zmiany miażdżycowe są przyczyną jego powstawania (Michel i wsp., 2011). Dowiedziono natomiast różnic w patogenezie tych chorób. Od ponad dekady przeważa opinia, że są to dwie odrębne jednostki chorobowe, posiadające szereg wspólnych czynników ryzyka i często współistniejące (Carrell i wsp., 2002, Tilson, 1992, Xu i wsp., 2001).

Ponieważ tętnice nerkowe przejmują znaczną ilość krwi (do 19%), jej objętościowy przepływ ulega zdecydowanemu zmniejszeniu w odcinku podnerkowym, co może tłumaczyć zmniejszenie średnicy i grubości ścian aorty występujące w tym miejscu. Powoduje to

osłabienie struktury, przez co odcinek brzuszny może być bardziej narażony na powstawanie tętniaków aorty. Z kolei rozwidlenie na tętnice biodrowe wspólne charakteryzuje się zmniejszeniem sumarycznych powierzchni przekrojów poprzecznych naczyń. W połączeniu z podwyższonym ciśnieniem, wywoływanym falami krwi odbitymi od rozwidlenia, tworzy to niekorzystne warunki hemodynamiczne w tym odcinku. Jednocześnie, większości TAB towarzyszy skrzeplina przyścienna, która powoduje zmianę rozkładu naprężeń biomechanicznych wywieranych na ścianę naczynia ale także zmianę charakteru przepływu krwi, co wpływa na całokształt miejscowych warunków hemodynamicznych. Fotografia zamieszczona na Rycinie 4 przedstawia skrzeplinę przyścienną usuniętą ze środkowej części TAB o maksymalnej średnicy wynoszącej 6 cm (Humphrey i Holzapfel, 2012).



Ryc. 4. Przekrój poprzeczny skrzepliny przyściennej tętniaka aorty brzusznej.

Źródło: fotografia własna

TAB powstaje na skutek połączonego w nieznaną sposób działania czynników ryzyka oraz zmian w fizjologii, zarówno związanych z naturalnym procesem starzenia jak i patologicznych, u osoby predysponowanej genetycznie. W zależności od konfiguracji tych składowych inaczej będzie przebiegała naturalna historia choroby. Tempo wzrostu i ryzyko pęknięcia TAB bywa bardzo zróżnicowane. Zdarzają się bowiem zarówno pęknięte tętniaki niewielkich rozmiarów jak i duże tętniaki bezobjawowe, nie wykazujące cech pęknięcia pomimo znacznej średnicy lub wykrywane po zgonie pacjenta z innych przyczyn.

1.5. Stadium przedkliniczne i kliniczne

TAB najczęściej rozwija się bezobjawowo i wykrywany jest przypadkowo w trakcie badania fizycznego lub diagnostyki obrazowej przeprowadzanej z powodu innych wskazań. Symptomami, jakie mogą się pojawić w przypadku tętniaków objawowych, są: ból w nadbrzuszu lub w okolicy lędźwiowo-krzyżowej określany najczęściej jako „gniotący”, uczucie „tętnienia” w jamie brzusznej, uczucie pełności w okolicach nadbrzusza i rzadziej wymioty spowodowane uciskiem tętniaka na dwunastnicę (Noszczyk, 2007).

Leczenie zachowawcze TAB obejmuje modyfikowalne czynniki ryzyka i dotyczy głównie zaprzestania palenia papierosów, normalizacji i/lub kontroli ciśnienia tętniczego, profilu lipidowego i masy ciała oraz unikania nadmiernego wysiłku fizycznego. Ponieważ ryzyko pęknięcia tętniaka rośnie wraz ze wzrostem jego średnicy, niewielki tętniak wymaga monitorowania rozmiarów i tempa powiększania się czyli okresowego wykonywania badań obrazowych. Za graniczne rozmiary przyjęto średnicę 5.0 cm u mężczyzn i 4.5 cm u kobiet. Po ich przekroczeniu pacjent, po oszacowaniu indywidualnego ryzyka zabiegu w porównaniu z ryzykiem pęknięcia tętniaka, kwalifikowany jest do leczenia operacyjnego. Operacyjne leczenie jest także rozważane w przypadku tempa powiększania > 10 mm/rok (Moll i wsp., 2011). Otwarty zabieg naprawczy polega na wyłączeniu tętniakowato poszerzonego odcinka naczynia z krwioobiegu za pomocą protezy naczyniowej. Drugą możliwością jest endowaskularna technika zaopatrzenia tętniaka z użyciem stentgraftów (EVAR, *ang. endovascular aneurysm repair*). W tym celu stosowane są stentgrafty wykonane z dakronu lub politetrafluoroetyleny, w celu uszczelnienia powlekanie kolagenem, charakteryzujące się układem włókien maksymalizującym trwałość zespolenia i powierzchnią ułatwiającą porostanie protezy tkanką. Wybór metody leczenia jest dobierany indywidualnie dla każdego pacjenta. Obecnie metodą z wyboru w zakresie leczenia operacyjnego TAB jest EVAR, a w przypadku kiedy pacjent nie spełnia kryteriów implantacyjnych i nie może być zakwalifikowany do leczenia wewnątrznaczyniowego, przeprowadzana jest otwarta operacja naprawcza (Szostek i wsp., 1993, Noszczyk, 2007, Filardo i wsp., 2012). Nieleczony TAB zagraża pęknięciem, które może skutkować krwotokiem prowadzącym do zgonu. Pęknięty tętniak manifestuje się silnym bólem, może wystąpić również wstrząs i utrata przytomności. Pęknięcie tętniaka związane jest ze śmiertelnością okołoperacyjną wynoszącą od 50 do 80%, podczas gdy profilaktyczna operacja naprawcza jest obarczona stosunkowo niewielkim ryzykiem okołoperacyjnych powikłań śmiertelnych (Verhoeven i wsp., 2008).

Na całym świecie prowadzone są liczne badania, mające na celu stworzenie terapii zapobiegającej bądź ograniczającej rozwój tętniaka. Żeby tak się stało, konieczne jest dokładne poznanie zarówno przyczyn jak i patologii towarzyszących powstawaniu i rozwojowi tej choroby.

1.6. Podłoże genetyczne

Pierwsze rozważania na temat możliwego tła genetycznego TAB pojawiły się w piśmiennictwie w 1977 roku, kiedy opublikowany został opis przypadku trzech braci, operowanych z powodu pękniętego, uprzednio bezobjawowego tętniaka (Clifton, 1977). Z kolei w 1984 roku Norrgård i wsp. dokonali retrospektywnej analizy historii chorób 87 pacjentów operowanych z powodu TAB w latach 1965-1981 w szpitalu uniwersyteckim w Umei, podkreślając znaczenie dodatkowej historii rodzinnej u 18% spośród nich (Norrgård i wsp., 1984). Tymczasem w 1998 roku powstał pierwszy opis obserwacji TAB wśród identycznych bliźniąt (Borkett-Jones i wsp., 1988). Od tego czasu wyniki dziesiątek badań z zakresu epidemiologii genetycznej dostarczyły dowodów na to, że czynniki genetyczne biorą udział w etiologii TAB. W badaniu przeprowadzonym wśród 233 rodzin z co najmniej dwoma przypadkami TAB, częstość jego wystąpienia u krewnych I stopnia wynosiła 15-19%, podczas gdy dla osób niespokrewnionych jedynie 1-3% (Kuivaniemi i wsp., 2003). W kolejnych opublikowanych analizach rodzinnego występowania TAB częstość ta waha się w zakresie od kilku aż do 29% wśród krewnych I stopnia (Svensjö i wsp., 2011, Wanhainen i wsp., 2005).

Jedną z głównych strategii identyfikacji genetycznych czynników ryzyka chorób wielogenowych są badania asocjacyjne genów kandydujących (ang. *candidate gene association studies*). Wybór genów odbywa się najczęściej na podstawie ich biologicznej funkcji i powiązań z obserwowaną w badanej chorobie patologią. W ten właśnie sposób zostały wytypowane geny, których warianty polimorficzne badano w niniejszej rozprawie. Najważniejsze asocjacje z TAB, zidentyfikowane tą metodą, związane są m.in. z mediatorami reakcji zapalnej i procesami autoimmunologicznymi, enzymami biorącymi udział w proteolitycznej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, metabolizmem lipidów czy też strukturą włókien sprężystych. Wyniki wybranych badań genów kandydujących przedstawiono w Tabeli II (Hinterseher i wsp., 2011, Kuivaniemi i wsp., 2012, Thompson i wsp., 2008.).

Tabela II. Najważniejsze asocjacje polimorfizmów genetycznych z TAB zidentyfikowane w badaniach genów kandydujących.

Gen	Funkcja	Polimorfizm	TAB (N) / kontrola (N)	p	Autor, rok publikacji
<i>SORT1</i>	Metabolizm lipidów	rs599839	7048 / 75976	7.2×10^{-14}	Jones i wsp., 2013
<i>IL6R</i>	Reakcja zapalna	rs7529229	4524 / 15710	2.7×10^{-11}	Harrison i wsp., 2012
<i>LPA</i>	Metabolizm lipidów	rs10455872 rs3798220	4572 / 33520	6.0×10^{-5}	Helgadottir i wsp., 2012
<i>AGTR1</i>	Układ renina- angiotensyna	rs5186	1226 / 1723	1.1×10^{-6}	Jones i wsp., 2008
<i>TGFBR2</i>	Szlak sygnalizacyjny TGFB	rs1036095	1904 / 2616	4.8×10^{-4}	Biros i wsp., 2011
<i>TGFBR2</i>	Szlak sygnalizacyjny TGFB	rs764522	1904 / 2616	2.7×10^{-4}	Biros i wsp., 2011
<i>ACE</i>	Układ renina- angiotensyna	rs4646994	1415 / 1677	<0.0001	McColgan i wsp., 2009
<i>MMP3</i>	Degradacja ECM	rs3025058	1258 / 1406	3.95×10^{-5}	Morris i wsp., 2014
<i>MMP13</i>	Degradacja ECM	rs2252070	800 / 843	brak danych	Saracini i wsp., 2012
<i>MTHFD1</i>	Metabolizm metioniny	rs8003379	423 / 423	<0.0001	Giusti i wsp., 2008
<i>MTRR</i>	Metabolizm metioniny	rs326118	423 / 423	0.003	Giusti i wsp., 2008
<i>LRP5</i>	Metabolizm lipidów	rs3781590 rs4988300	423 / 423	<0.0001	Galora i wsp., 2013

TGFB: transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*); ECM: macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)

Źródło: Zmodyfikowano na podstawie Kuivaniemi i wsp., 2014.

Inną metodą poszukiwania podłoża genetycznego chorób jest przeprowadzenie badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS, ang. *genome-wide association study*). W takim badaniu analizuje się pełne genomy osób z grupy badanej i kontrolnej pod kątem występowania już zidentyfikowanych wariantów polimorficznych genów. Następnie metodami bioinformatycznymi analizuje się różnice w występowaniu polimorfizmów pomiędzy grupami i poszukuje się ich związków z chorobą. W 2007 roku opublikowano wyniki pierwszych 3 badań GWAS, dotyczących poszukiwania czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (Golledge i Kuivaniemi, 2013, Harrison i wsp. 2012). Natomiast rezultaty pierwszego GWAS, przeprowadzonego w celu zlokalizowania regionów genomu mogących zwiększać ryzyko wystąpienia TAB, ukazały się w 2009 roku i wykazały związek SNP zlokalizowanego na chromosomie 3p12.3 z wystąpieniem tętniaka (Elmore

i wsp., 2009). Wynik ten nie miał jednak mocy statystycznej i nie udało się go odtworzyć w niezależnej próbie (Jones i wsp., 2009). Zaledwie rok później, w odpowiednio dużym GWAS, wykazano zależność pomiędzy wariantem genu *DAB2IP* a ryzykiem wystąpienia TAB. Gen ten znajduje się na chromosomie 3p12.3 i koduje inhibitor cyklu komórkowego. Udowodniono, że obecność wariantu rs7025486[A] w genie *DAB2IP* wiąże się z 20% zwiększeniem ryzyka wystąpienia TAB (OR=1.21; $p=4.6 \times 10^{-10}$) (Gretarsdottir i wsp., 2010). Stwierdzono również częstsze występowanie wariantu allelicznego D, powstałego przez delecję w intronie 16 genu *ACE* kodującego konwertazę angiotensyny. W grupie pacjentów normotensyjnych z tętniakiem odsetek homozygot DD wynosił 70% w porównaniu z 32% wśród osób z nadciśnieniem tętniczym i TAB (Pola i wsp., 2001). Z kolei wariant rs1075727[G], zlokalizowany na chromosomie 9p21, jest związany ze zwiększeniem szansy na wystąpienie TAB o OR=1.31 ($p=1.2 \times 10^{-12}$) (Helgadottir i wsp., 2008).

Podjęmowano również próby znalezienia genetycznych uwarunkowań TAB poprzez analizę sprzężeń, polegającą na śledzeniu sposobu dziedziczenia markera w rodzinach z rozpoznanymi przypadkami tętniaka. Pierwsze takie badanie obejmowało 48 rodzin, u których oznaczano markery dla 3 genów kandydujących (*BHMT*, *COL1A2* i *CTSH*), jednak nie odnotowano zależności z zapadalnością na TAB (van Vlijmen – van Keulen i wsp., 2003).

1.7. Badanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w TAB

Jedną z dróg prowadzących do odkrycia złożonych mechanizmów predysponujących do wystąpienia choroby bądź przyczyniających się do jej rozwoju są badania molekularne. Identyfikacja genów i mutacji biorących udział w patofizjologii człowieka jest jednym z kluczowych celów współczesnej genetyki. Metody biologii molekularnej pozwalają pośrednio lub bezpośrednio badać zmienność genetyczną człowieka, za którą w głównej mierze odpowiadają polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs, ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*). SNP to zmiana nukleotydu (mutacja) w określonej lokalizacji w genomie, występująca w populacji z częstością ponad 1%. Większość tych zmian występuje w sekwencjach niekodujących. Jeśli jednak dotyczą regionów kodujących lub regulatorowych, mogą powodować zmiany strukturalne i funkcjonalne w produkcji białkowego genu, zmiany ekspresji informacji genetycznej czy zaburzenia mechanizmów sterujących podziałem i rozwojem komórkowym (Børsting i Morling, 2013).

Dotychczasowe wyniki poszukiwań genów, których mutacje przyczyniają się do podwyższenia ryzyka rozwoju TAB dowodzą, że jest to choroba uwarunkowana wielogenowo. Wpływ czynników środowiskowych jest także bardzo niejednorodny tak samo jak obraz kliniczny choroby. Zróżnicowanie to skłania do poszukiwań molekularnych markerów podatności osobniczej, pozwalających na określenie indywidualnego ryzyka zachorowania. Badania SNPs mogą także przynieść inne korzyści. Ze względu na heterogenność TAB, niewykluczona jest obecność podtypów choroby, których określenie ułatwiłoby badania nad jej etiologią, a być może także wyłonienie grup ryzyka dla których zasadne byłoby stosowanie odmiennych kryteriów leczenia i kwalifikacji do profilaktycznej operacji. Przegląd wyników badań i metaanaliz opublikowanych w ostatniej dekadzie pozwala sądzić, że wyniki genotypowania będą stanowiły naturalne uzupełnienie klasycznej oceny kryteriów klinicznych.

Geny *PTPN22*, *CTLA-4*, *FGB* oraz *TAFI* i ich SNPs wytypowano do badania ze względu na biologiczne funkcje, które omówiono poniżej, potencjalnie łączące je z występowaniem TAB. W świetle aktualnie dostępnego, światowego piśmiennictwa, występowanie wybranych wariantów polimorficznych genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *TAFI* nie było dotąd badane w TAB.

1.7.1. Gen *PTPN22* kodujący niereceptorową fosfatazę tyrozynową typu 22

Gen *PTPN22* (ang. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*, niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 22) jest położony na krótkim ramieniu chromosomu 1 w regionie p13.2. Składa się z 22 egzonów i jest ekspresjonowany na powierzchni komórek krwiotwórczych (Hendriks i Pulido, 2013). Najwyższy poziom ekspresji wykazują komórki NK, limfoblasty CD105+ i neutrofile, natomiast najniższy limfocyty T CD4+ i monocyty (Burn i wsp., 2011, Cloutier i Veillette, 1999). Koduje trzy warianty wpływające na składanie genu limfocytarnej fosfatazy tyrozynowej (ang. *lymphoid tyrosine phosphatase*, *Lyp*), spośród których najczęściej występuje izoforma *Lyp1* o długości 807 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 110 kDa. *Lyp1* znajduje się w cytoplazmie limfocytów T i jest zaangażowana w stosunkowo słabo poznane szlaki sygnałowe komórki. Na jej N-końcu znajduje się domena katalityczna, natomiast w regionie C-końcowym usytuowane są cztery motywy bogate w prolinę (P1-P4). Pierwszy spośród nich wykazuje wysokie powinowactwo do domeny SH3 kinazy Csk, z którą wspólnie hamują aktywację

komórek T. Izoforma Lyp2 zawiera tylko jedną domenę bogatą w prolinę P1, natomiast Lyp3 nie posiada 28 aminokwasów pomiędzy P1 i P2. Rola form Lyp2 i Lyp3 nie została dotąd poznana (Begovich i wsp., 2004, Burn i wsp., 2011).

Szczególnie dużo miejsca w literaturze poświęcone jest wariantowi polimorficznemu 1858C/T genu *PTPN22*, którego częstość występowania opisywana jest w zakresie od 15% do 19% w odmianie kaukaskiej. Zmiana cytozyny na tyminę w pozycji 1858 skutkuje zmianą argininy na tryptofan w pozycji 620 produktu białkowego. Substytucja ta uniemożliwia wiązanie się enzymu z domeną SH3 kinazy Csk, co z kolei hamuje inaktywację wewnątrzkomórkowej kinazy fosforylowej Lck, fosforylującej reszty tyrozynowe specyficznych motywów ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, motyw aktywacyjny receptora tyrozynowego) cząsteczek CD3. Efektem końcowym jest zaburzenie przekazywania sygnału do wnętrza limfocytów T, co może skutkować zwiększeniem ryzyka rozwoju odpowiedzi immunologicznej (Burn i wsp., 2011, Gregersen i wsp., 2006). Obecność allelu 1858T *PTPN22* może także powodować nadmierną reakcję limfocytów B i ich kumulację. Wykazano związek tego SNP z występowaniem szeregu chorób o podłożu autoimmunologicznym takich jak cukrzyca typu 1 (Bottini i wsp., 2004, Tang i wsp., 2012), reumatoidalne zapalenie stawów (Begovich i wsp., 2004), toczeń rumieniowaty układowy (Kyogoku i wsp., 2004), choroba Gravesa-Basedowa (Velaga i wsp., 2004), miastenia (Vandiedonck i wsp., 2006), choroba Addisona (Roycroft i wsp., 2009), zapalenie tarczycy Hashimoto (Criswel i wsp., 2005), pierwotny niedobór przeciwciał, bielactwo nabyte czy twardzina układowa (Fousteri i wsp., 2013, Menard i wsp., 2011, Vang i wsp., 2007).

Z kolei SNP -1123G/C zlokalizowany jest w regionie promotorowym genu *PTPN22*. Wykazano jego związek z występowaniem cukrzycy typu 1 (Liu i wsp., 2012), reumatoidalnego zapalenia stawów (Huang i wsp., 2012), choroby Gravesa-Basedowa (Yu i wsp., 2008), zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa (Huang i wsp., 2014) oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (Chen i wsp., 2013). Gen *PTPN22* jest, obok genów układu zgodności tkankowej *MHC* (ang. *major histocompatibility complex*), jednym z najsilniejszych genów-kandydatów, rozpatrywanych w badaniu etiologii chorób, w których rozwój zaangażowana jest nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna. Czyni go to również potencjalnym kandydatem do udziału w rozwoju TAB.

1.7.2. Gen *CTLA-4* kodujący antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytom T

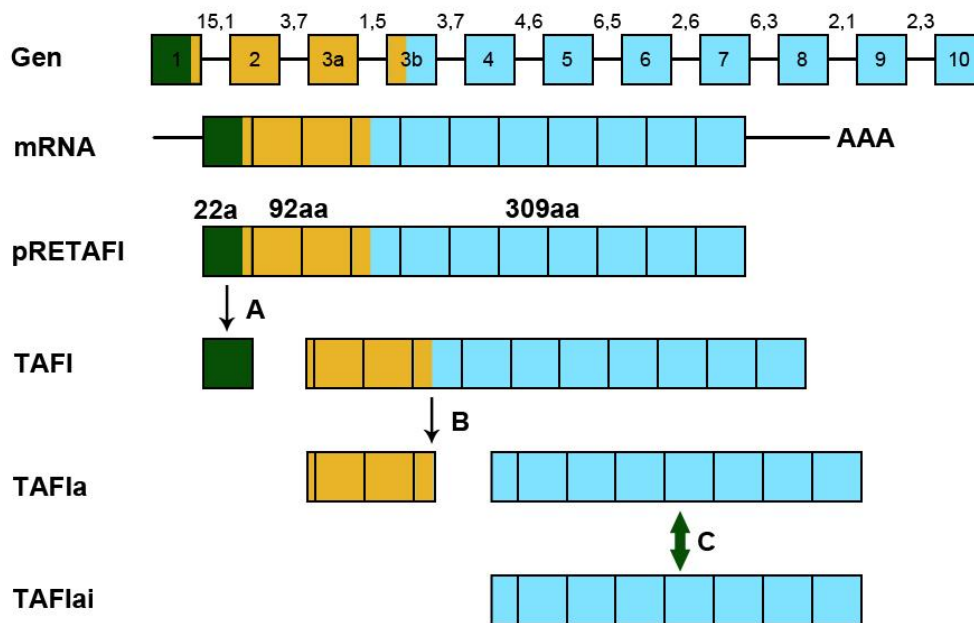
Kolejnym genem, którego warianty polimorficzne mogą wpływać na funkcję limfocytów T, jest gen *CTLA-4*. Gen ten znajduje się na chromosomie 2 w lokalizacji q33 i składa się z 4 egzonów (Ueda i wsp., 2003). Produktem jego ekspresji są 3 izoformy cząsteczki CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytom T). Najczęściej występująca izoforma, znana także jako CD152, jest homodimerem, którego podjednostki połączone są mostkiem siarczkowym. Jest ona transportowana z cytoplazmy na powierzchnię aktywowanych limfocytów T w obecności cząsteczki kostymulującej CD28. Izofoma nie zawierająca egzonu 2 nie ma zdolności wiązania ligandów i ekspresjonowana jest na powierzchni aktywowanych limfocytów B. Natomiast trzecia izoforma, pozbawiona egzonu 3, jest formą rozpuszczalną, produkowaną przez limfocyty T i B. CTLA-4 może być również ekspresjonowany na powierzchni komórek dendrytycznych. Typowa izoforma CTLA-4 jest sygnałem negatywnego sprzężenia zwrotnego odpowiedzi immunologicznej i ma za zadanie hamować aktywację limfocytów T (Kaariten i wsp., 2007). Do aktywacji dziewiczych limfocytów T dochodzi po wytworzeniu synapsy immunologicznej i przekazaniu dwóch sygnałów: pierwszego, przekazywanego przez receptor TCR rozpoznający swoisty antygen i drugiego, przekazywanego przez cząsteczki kostymulujące. Cząsteczkami kostymulującymi na powierzchni limfocytów T są m.in. receptory CD28, CTLA-4, ICOS1, CD2 a na powierzchni komórek prezentujących antygen (ang. *antigen presenting cell*, APC) ligandy CD80, CD86, ICOS-L, LFA3 (Stuart i Racke, 2002). Głównym przejawem hamowania aktywacji limfocytów T przez CTLA-4 jest jego współzawodniczenie z CD28 o ligandy B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86), znajdujące się na powierzchni APC. Ponieważ CTLA-4 wykazuje do nich od 20 do 100-krotnie silniejsze powinowactwo, szybciej tworzy z nimi kompleksy, wykluczając CD28 i tym samym prowadząc do zmniejszenia sygnału aktywującego limfocyty T (Schwartz i wsp., 2001, Stamper i wsp., 2001). Zablokowanie ligandów B7 powoduje także zmianę ekspresji białek kontrolujących cykl komórkowy, skutkującą wolniejszym przejściem z fazy G1 do S (Greenwald i wsp., 2002). Tymczasem obecność CTLA-4 na powierzchni limfocytów B powoduje hamowanie przełączania klas i produkcji przeciwciał IgG i IgE poprzez zablokowanie szlaków NF- κ B i STAT (Pioli i wsp., 2000).

Polimorfizm 49A/G genu *CTLA-4* powoduje zamianę treoniny na alaninę w cząsteczce CTLA-4. Zmiana ta zaburza apoptozę aktywowanych limfocytów i prowadzi do utraty kontroli nad nimi, co z kolei może powodować rozwój chorób o podłożu zapalnym. Wyniki badań asocjacji wykazały związek polimorfizmu 49A/G genu *CTLA-4* z ryzykiem zachorowania na choroby autoimmunizacyjne takie jak: cukrzyca typu 1 (Donner i wsp., 1997), choroba Gravesa-Basedowa (Han i wsp., 2006), toczeń rumieniowaty układowy Chang i wsp., 2012) czy stwardnienie rozsiane (Bilińska i wsp., 2004).

Biorąc pod uwagę przedstawiony w piśmiennictwie związek SNP 49A/G genu *CTLA-4* z chorobami autoimmunizacyjnymi oraz główną funkcję kodowanej przez ten gen cząsteczki CTLA-4, którą jest hamowanie odpowiedzi odpornościowej organizmu, można sądzić, że jego obecność ma związek z występowaniem chorób z tłem zapalnym takich jak TAB.

1.7.3. Gen *TAFI* kodujący aktywowany przez trombinę inhibitor fibrylizy

W celu zapewnienia hemostazy proces krzepnięcia pozostaje w dynamicznej równowadze z procesem fibrylizy. Głównymi elementami układu fibrylizy są: plazminogen, jego aktywatory (typu tkankowego oraz urokinazowego) i inhibitory, α 2-antyplazmina i aktywowany przez trombinę inhibitor fibrylizy (ang. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI) (Chapin i Hajjar, 2014). TAFI kodowany jest przez gen *TAFI*, składający się z 11 egzonów, zlokalizowany na chromosomie 13 w pozycji q14.11. Pierwotna forma tej cząsteczki to proenzym (preTAFI) o masie cząsteczkowej około 58 kDa, produkowany w wątrobie i uwalniany do osocza w formie nieaktywnej. Opisano również formę TAFI występującą w płytkach krwi i uwalnianą w procesie ich aktywacji, charakteryzującą się zbliżonymi właściwościami enzymatycznymi do formy wątrobowej (Mosnier i wsp., 2003). Aktywacja preTAFI do formy aktywnej (TAFIa) następuje dwuetapowo, poprzez odłączenie 22-aminokwasowego peptydu aktywacji, a następnie przy udziale kompleksu trombina/trombomodulina (Ryc. 5) (Bajzar, 2000).



A: odłączenie peptydu aktywacyjnego z udziałem niepoznanej dotąd proteazy; B: aktywacja TAFI przez kompleks trombina/trombomodulina; C: spontaniczna zmiana konformacji, potencjalnie odwracalna.

Ryc. 5. Schemat przedstawiający organizację genu *TAFI* i mechanizm powstawania aktywnej (TAFIa) i nieaktywnej (TAFIai) formy jego produktu białkowego.

Źródło: zmodyfikowano na podstawie Bajzar, 2000.

TAFIa wykazuje działanie karboksypeptydazy i w początkowym etapie fibrynolizy odszczepia reszty aminokwasowe lizyny i argininy z C-końca łańcucha α -fibryny. Powoduje to ograniczenie zdolności wiązania plazminy do fibrynogenu (Bajzar i wsp., 2004). Zaburzenia w funkcjonowaniu układu fibrynolitycznego mogą być powodowane zarówno niedoborem jak i wzrostem stężenia i aktywności TAFIa. Niedobór może zwiększać skłonność do krwawień, z kolei nadmiar powoduje tendencję prozakrzepową, wynikającą z hamowania degradacji fibryny (Chapin i Hajjar, 2014).

W literaturze przedstawiane są najczęściej trzy polimorfizmy genu *TAFI*, mogące wpływać na stężenie TAFI we krwi (Shi i wsp., 2014). Pierwszy z nich to SNP 1040C/T, powodujący podstawienie alaniny treoniną w pozycji 147 produktu białkowego. Opisano jego związek z występowaniem choroby niedokrwiennej serca, zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu oraz dyslipidemii (Juhan-Vague i wsp., 2002, Morange i wsp., 2003, Santos i wsp., 2014). W 2014 roku opublikowano wyniki badania asocjacji polimorfizmu 1040C/T genu *TAFI* z TAB przeprowadzonego wśród uczestników brytyjskiego badania

epidemiologicznego LEADS (ang. *Leeds Aneurysm Development Study*). Wykazano brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy rozkładem genotypów w grupie badanej i kontrolnej dla tego wariantu polimorficznego (Bridge i wsp., 2014). Drugi polimorfizm to 505G/A, skutkujący zamianą treoniny na izoleucynę w pozycji 325 białka, którego obecność powiązано ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy żył głębokich (Martini i wsp., 2006). Kolejny wariant polimorficzny to -438G/A, wykazujący związek ze wzrostem śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych wśród mężczyzn (Reiner i wsp. 2005.).

W szeregu badań udowodniono występowanie związku pomiędzy genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami procesów krzepnięcia i fibrylizacji a zapadalnością na choroby sercowo-naczyniowe. Nieprawidłowości w układzie hemostazy oraz proces zapalny odgrywają istotną rolę także w patogenezie TAB. Ponieważ TAFI bierze udział zarówno w utrzymywaniu homeostazy pomiędzy układami krzepnięcia i fibrylizacji jak również w procesach zapalnych, wzbudza zainteresowanie badaczy jako potencjalny czynnik ryzyka ChSN.

1.7.4. Gen *FGB* kodujący łańcuch β fibrynowego

Kolejną cząsteczką, biorącą udział w procesie krzepnięcia krwi a także w reakcji zapalnej, jest syntetyzowany w hepatocytach fibrynogen (Davalos i wsp., 2012). Strukturalnie jest to homodimer, złożony z dwóch podjednostek połączonych mostkiem disiarczkowym. Obydwie podjednostki zbudowane są z łańcuchów polipeptydowych $A\alpha$, $B\beta$ i γ , kodowanych przez geny *FGA*, *FGB* i *FGG*, zlokalizowane na chromosomie 4 w pozycji q31.3 (Tousoulis i wsp., 2011). Każdy łańcuch posiada charakterystyczną C-końcową domenę FReD (ang. *fibrynogen related domain*, domena analogiczna do fibrynowego), nadającą mu zdolność rozpoznawania i wiązania innych cząsteczek oraz biorącą udział w formowaniu skrzepu (Doolittle i wsp., 2012). Fibrynogen odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi. W końcowej fazie kaskady krzepnięcia rozpuszczalny fibrynogen przekształca się w nierozpuszczalne włókna fibryny. Proces ten zachodzi przy udziale trombiny, która hydrolizuje wiązania pomiędzy Arg16 i Gly17 łańcucha $A\alpha$ i Arg14 i Gly17 łańcucha $B\beta$ fibrynowego, co powoduje odszczepienie dwóch par fibrynopeptydów A (FPA) i B (FPB). Powstałe w ten sposób monomery fibryny agregują i tworzą protofibryle, a następnie włókna i pęczki włókien fibryny. Włókna fibryny łączą się ze sobą w strukturę trójwymiarowego żelu fibrynowego, który wraz z agregatami płytek krwi tworzy czop hamujący krwawienie

(Blombäck, 1996). Poza rolą w procesie krzepnięcia krwi fibrynogen bierze udział w reakcjach odpornościowych organizmu i jest zaliczany do białek ostrej fazy, a jego synteza wzrasta w odpowiedzi na działanie mediatorów stanu zapalnego takich jak cytokiny. Działanie prozapalne fibrynogenu związane jest z jego możliwością łączenia się za pomocą domen FReD z komórkami systemu odpornościowego na zasadzie ligand-receptor. Fibrynogen wiąże się z receptorami powierzchniowymi leukocytów. Może się też wiązać z komórkami śródbłonna naczyniowego za pośrednictwem ICAM-1 lub VE-kadheryn dla których jest ligandem, a ponieważ wykazuje znaczne powinowactwo do leukocytów, sprzyja ich adhezji na powierzchni endotelium, co związane jest ze stanem zapalnym (Davalos i wsp., 2012, Doolittle i wsp., 2012).

Już w roku 1980, w publikacji prezentującej wczesne wyniki badania Northwick Park Heart Study, wykazano związek pomiędzy wysokim stężeniem fibrynogenu w osoczu a występowaniem choroby niedokrwiennej serca (Meade i wsp., 1980). Związek ten został potwierdzony w licznych późniejszych badaniach populacyjnych. Rezultaty takich programów badawczych jak PROCAM (ang. *Prospective Cardiovascular Munter Study*), ECAT AP (ang. *European Concerted Action in Thrombosis Angina Pectoris*), ARIC (ang. *Atherosclerosis Risk in Communitates*) czy CARDIA (ang. *Coronary Risk Development in Young Adults*) dowodzą, że fibrynogen jest niezależnym czynnikiem powikłań sercowo-naczyniowych. Metaanaliza przeprowadzona przez zespół Fibrinogen Studies Collaboration, podsumowująca efekty 31 badań prospektywnych, w których uczestniczyło łącznie 154 211 osób, wykazała związek zwiększonego stężenia fibrynogenu z wystąpieniem choroby niedokrwiennej serca, udarem mózgu (zwłaszcza niedokrwinnym), śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych innych niż choroba niedokrwienna czy udar mózgu. Dodatkowo opisano także wpływ stężenia osoczowego fibrynogenu na śmiertelność z przyczyn innych niż sercowo-naczyniowe (głównie choroby nowotworowe) u osób w średnim wieku i starszych. Nadmiar fibrynogenu zaobserwowano także w przebiegu kolagenoz czyli autoimmunizacyjnych chorób tkanki łącznej (Danesh i wsp., 2005, Kaptoge i wsp., 2007).

Wzrost stężenia fibrynogenu zależy zarówno od jego zwiększonej produkcji jak i od zwolnionej degradacji. Na podwyższenie stężenia fibrynogenu w osoczu wpływają takie czynniki jak: zaawansowany wiek, nadciśnienie tętnicze, otyłość, cukrzyca, dyslipidemia, nikotynizm czy stan zapalny. Obserwowane zmiany stężenia mogą być również przejawem zmienności genetycznej (Lim i wsp., 2003). W obrębie genu dla łańcucha β ludzkiego

fibrynogenu opisywane są najczęściej dwa polimorfizmy: -455A/G i -148C/T, zlokalizowane w regionie promotorowym, w sposób istotny statystycznie wpływające na stężenie fibrynogenu. Większe stężenie fibrynogenu skutkuje z kolei gęstszą strukturą skrzepu. Z danych literaturowych wiadomo, że organizacja przestrzenna skrzepów zmienia się w wielu chorobach sercowo-naczyniowych (Siegerink i wsp., 2009). W szczegółowych badaniach struktury skrzepów wykazano, że zamiana alaniny na treoninę w pozycji 312 łańcucha A α skutkuje większą średnicą włókien fibryny, zaś podstawienie argininy lizyną w pozycji 448 łańcucha B β powoduje zagęszczanie żelu fibrynowego (Standeven i wsp., 2003). Dotychczas nie udało się jednoznacznie wykazać bezpośredniego wpływu genetycznych polimorfizmów genów *FGA*, *FGB* czy *FGG* na ryzyko wystąpienia konkretnej jednostki chorobowej. Istnieje natomiast szereg doniesień na temat wpływu wariantów polimorficznych tych genów na stężenie fibrynogenu w osoczu. Współcześnie zarówno stężenie fibrynogenu jak i produktów jego degradacji, jakimi są D-dimery, stosowane jest w praktyce klinicznej w ocenie stanu zapalnego i aktywacji procesu wykrzepiania i fibrynolizy (Siegerink i wsp., 2009, Tousoulis i wsp., 2011).

2. CEL PRACY

Głównym celem pracy była ocena związku pomiędzy wybranymi odmianami polimorficznymi genu limfocytarnej fosfatazy tyrozynowej *PTPN22*, antygeny 4 związanego z cytotoksycznym limfocytom T *CTLA-4*, inhibitora fibrylizacji aktywowanego trombiną *TAFI* i łańcucha β fibrynogenu *FGB* a predyspozycją do wystąpienia tętniaka aorty brzusznej.

Cel ten realizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

1. Porównanie częstości występowania w grupie badanej i kontrolnej genotypów i alleli następujących polimorfizmów: 1858C/T genu *PTPN22* (rs2476601), -1123G/C genu *PTPN22* (rs2488457), 49A/G genu *CTLA-4* (rs231775), -438G/A genu *TAFI* (rs2146881) oraz -455G/A genu *FGB* (rs18000790).
2. Analiza zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a średnicą tętniaka aorty brzusznej, wyrażoną wskaźnikiem wielkości aorty (ang. *Aortic Size Index*) w grupie badanej i kontrolnej.
3. Analiza zależności pomiędzy genotypem w *locus TAFI* -438G/A a aktywnością produktu białkowego tego genu.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka uczestników badania

3.1.1. Grupa badana

Do grupy badanej włączono 305 pacjentów hospitalizowanych w latach 2010 - 2014 na Oddziale Chirurgii Naczyniowej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego, spośród których 298 chorych przyjętych było w trybie planowym celem operacyjnego leczenia tętniaka aorty brzusznej, a pozostałe 7 osób operowanych było w trybie pilnym z powodu pękniętego TAB. W grupie pacjentów tętniakowato poszerzoną aortę stwierdzano w badaniu USG i/lub angio – TK jamy brzusznej, a u wszystkich chorych ostateczne potwierdzenie diagnozy miało miejsce śródoperacyjnie. Rekrutację uczestników badania podjęto po przygotowaniu protokołu wraz z wyspecyfikowaniem istotnych elementów determinujących kwalifikacje osób do badań.

Kryteria włączenia do badania:

- rasa kaukaska,
- pisemna świadoma zgoda pacjenta na udział w badaniu oraz izolowanie i przechowywanie DNA,
- wiek powyżej 18 roku życia,
- potwierdzone śródoperacyjnie rozpoznanie TAB.

Kryteria wyłączenia z badania:

- rasa inna niż kaukaska,
- brak pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu oraz izolowanie i przechowywanie DNA,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby genetycznej z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby autoimmunizacyjnej i przewlekłych chorób zapalnych z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby nowotworowej z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia.

Z grupy badanej na podstawie kryteriów wyłączenia wykluczono: 12 osób ze względu na rozpoznanie choroby nowotworowej, 7 osób w związku z występowaniem choroby autoimmunizacyjnej (reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca, choroba Crohna-Leśniewskiego), 11 osób w związku z występowaniem choroby autoimmunizacyjnej lub nowotworowej wśród krewnych I stopnia i 1 pacjenta ze względu na podejrzenie zespołu Marfana. Ostatecznie do badania włączono 274 pacjentów. Wszyscy badani zapoznali się z „Informacją dla Pacjenta” dotyczącą celu i przebiegu badania i podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu z uwzględnieniem badań molekularnych i przechowywania materiału genetycznego (Załączniki 2 i 3).

Częściej stosowanym sposobem zaopatrzenia TAB było wszczepienie wewnątrznaczyniowej protezy samorozprężalnej z dostępu przez naczynia obwodowe (69%). U wszystkich chorych wszczepienie stentgraftów powiodło się. Stosowano dwa typy stentgraftów: Excluder (W.L. Gore) i Zenith (Cook Inc.). W trakcie żadnego z zabiegów nie zaszła potrzeba tzw. konwersji chirurgicznej. W okresie okołoperacyjnym (30 dni) do powikłań pooperacyjnych doszło u 25 chorych. Stwierdzono 8 zgonów: 3 zgony spowodowane krwawieniem do przestrzeni zaotrzewnowej, 2 z powodu niewydolności oddechowej, 2 z powodu nagłego zatrzymania krążenia i 1 z powodu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (sepsy). Wczesne powikłania pooperacyjne niepowikłane śmiercią, jakie odnotowano w badanej grupie, to: krwotok tętniczy spowodowany nieszczelnością protezy naczyniowej, ostre niedokrwienie kończyny dolnej, zawał mięśnia sercowego oraz zakażenie rany pooperacyjnej. Przed opuszczeniem szpitala wszyscy chorzy mieli wykonane badanie USG metodą doppler-duplex, w którym nie stwierdzono nieprawidłowości.

3.1.2. Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej włączono 250 wolontariuszy zakwalifikowanych w trakcie „białych sobót” przeprowadzonych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym pod hasłem: „Wczesne Wykrywanie Tętniaka Aorty Brzuszej” na przełomie marca i lutego 2013 roku. Każdy ochotnik miał ultrasonograficznie potwierdzony prawidłowy przebieg aorty i zwymiarowaną średnicę naczynia. Rekrutację uczestników badania podjęto po przygotowaniu protokołu wraz z wyspecyfikowaniem istotnych elementów determinujących kwalifikacje osób do badań.

Kryteria włączenia do badania:

- rasa kaukaska,
- wiek powyżej 60 roku życia,
- pisemna świadoma zgoda pacjenta na udział w badaniu oraz izolowanie i przechowywanie DNA,
- prawidłowy obraz USG brzusznego odcinka aorty.

Kryteria wyłączenia z badania:

- rasa inna niż kaukaska,
- wiek poniżej 60 roku życia,
- brak pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu oraz izolowanie i przechowywanie DNA,
- rozpoznanie poszerzenia lub tętniaka aorty brzusznej w przeprowadzonym badaniu USG,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie tętniaka z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby genetycznej z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby autoimmunizacyjnej i przewlekłych chorób zapalnych z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia,
- dodatni wywiad lub rozpoznanie choroby nowotworowej z uwzględnieniem krewnych I i II stopnia.

Do badania zgłosiło się 288 uczestników. W trakcie badania USG wykryto 10 poszerzeń brzusznego odcinka aorty i 3 poszerzenia tętnic biodrowych wspólnych, wstępnie rozpoznano 11 TAB, zgłosił się także jeden pacjent z protezą naczyniową po leczeniu operacyjnym TAB oraz jeden pacjent z tętniakiem aorty piersiowej. W trakcie wywiadu lekarskiego wykluczono kolejnych 12 pacjentów z powodu rozpoznania choroby nowotworowej lub autoimmunizacyjnej (łuszczyca, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów). Zdecydowano się na włączenie 2 osób w wieku 58 lat i jednej osoby w 59 roku życia, które zgłosiły się na badania pomimo kryterium wyłączenia dotyczącego wieku. Wszyscy uczestnicy badania zapoznali się z „Informacją dla uczestnika badania” dotyczącą

celu i przebiegu badania i podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu z uwzględnieniem badań molekularnych i przechowywania materiału genetycznego (Załączniki 5 i 6). Ponieważ płeć jest czynnikiem ryzyka wystąpienia TAB, w grupie kontrolnej zachowano proporcje pomiędzy ilością mężczyzn i kobiet zgodną z grupą badaną. Ostatecznie do badania włączono 250 osób.

3.1.3. Materiał do badań

Zarówno w przypadku grupy badanej, jak i kontrolnej, materiałem do badań była krew obwodowa, pobierana z żyły odłokciowej do probówek z odpowiednim antykoagulantem. Do oznaczeń genetycznych krew pobierano do probówek z EDTA (S-Monovette, 2,9 ml, Sarstedt). Probówki opisywano unikalnym kodem i przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu przeprowadzania procedury izolowania DNA. Natomiast w celu zbadania aktywności TAFI, krew pobierano do probówek z cytrynianem sodu (S-Monovette 2,9 ml, Sarstedt). Próbkę z krwią wirowano 15 min z szybkością obrotową 2500 rpm, następnie uzyskane w ten sposób osocze porcjowano i przechowywano w temperaturze – 80 °C do czasu przeprowadzania oznaczeń.

U wszystkich osób włączonych do grupy badanej i kontrolnej w zgromadzonej populacji oznaczono polimorfizmy 1858C/T i -1123G/C genu *PTPN22*, 49A/G genu *CTLA-4*, -438G/A genu *TAFI* oraz -455G/A genu *FGB*, a także aktywność TAFI. Oznaczenia przeprowadzono w Laboratorium Naukowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego. Badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowym (nr zgody KB/20/2014).

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Wywiad z uczestnikiem badania

U wszystkich osób włączonych do badania przeprowadzono wywiad na podstawie autorskiego kwestionariusza, uwzględniającego dane antropometryczne, czynniki ryzyka wystąpienia TAB oraz chorób autoimmunizacyjnych i genetycznych, również wśród krewnych I i II stopnia, występowanie chorób współistniejących i stosowaną farmakoterapię.

Wzory kwestionariuszy zastosowanych podczas wywiadu z pacjentami z TAB oraz osobami z grupy kontrolnej przedstawiono w Załącznikach 1 i 4.

W analizie wyników, poza klasycznymi danymi demograficznymi i klinicznymi, zebranymi w wywiadzie, uwzględniono następujące parametry:

- ASI – ang. *Aortic Size Index* – wskaźnik wielkości aorty

$ASI = AD [cm]/BSA[m^2] [cm/m^2]$, gdzie:

AD – ang. *aortic diameter* – średnica aorty (średnica brzusznego odcinka prawidłowej aorty bądź maksymalna średnica tętniaka aorty brzusznej),

BSA – ang. *Body Surface Area* – powierzchnia ciała, liczona ze wzoru Dubois'ów:

$BSA = 0,007184 \times \text{wzrost w cm}^{0,725} \times \text{masa ciała w kg}^{0,425} [m^2]$.

- BMI_{index} - index BMI

$BMI_{index} = AD [cm]/BMI [kg/m^2]$, gdzie:

BMI – ang. *Body Mass Index* – wskaźnik masy ciała

$BMI = \text{masa ciała [kg]} / (\text{wysokość ciała [m]})^2 [kg/m^2]$

(pomiarów masy ciała i wysokości ciała dokonywano za pomocą wagi ze wzrostomierzem z dokładnością do 0,1 kg)

- ILT – ang. *intraluminal thrombus* - skrzeplina przyścienna (podana wartość to maksymalna grubość skrzepliny w worku tętniaka [mm])

3.2.2. Izolowanie całkowitego genomowego DNA z krwi obwodowej

Procedurę izolowania genomowego DNA do oznaczeń genetycznych przeprowadzono we wszystkich zgromadzonych próbkach z 200 µl krwi pełnej, za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu QIAmp DNA Blood Mini Kit firmy Qiagen, zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. W zastosowanej metodzie wykorzystywana jest technologia separacji DNA na membranie silikonowej. Próbki krwi poddawane są lizie w środowisku buforu lizującego w obecności proteiny K. W trakcie procedury dochodzi do związania kwasów nukleinowych ze złożem krzemionkowym wypełniającym kolumnkę. Adsorpcja

DNA do złoża zachodzi dzięki obecności soli chaotropowej. Następnie złożo jest odplukiwane z inhibitorów reakcji PCR, białek i innych zanieczyszczeń. Elucja DNA przeprowadzana jest z zastosowaniem buforu elucyjnego o niskiej zawartości soli, który powoduje zmianę warunków wiązania. Do końcowej elucji stosowano 200 μ l buforu elucyjnego, a uzyskany materiał genetyczny poddawano analizie jakościowej i ilościowej i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych badań.

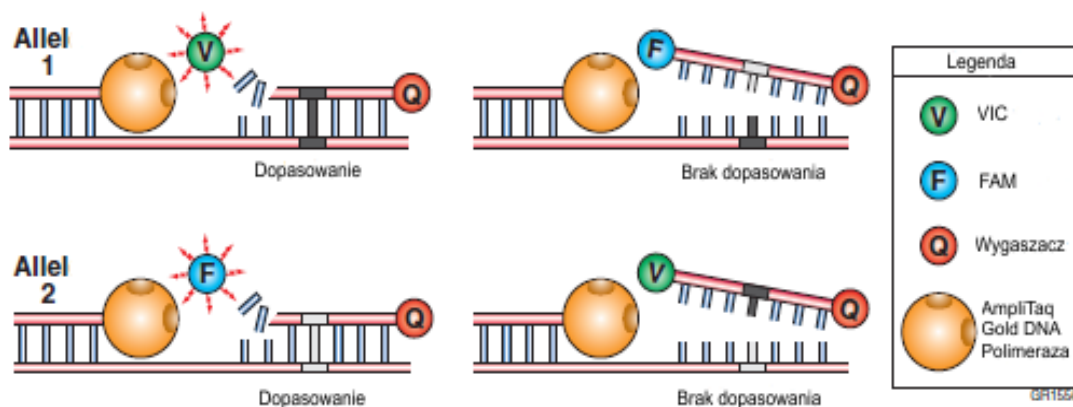
3.2.3. Analiza ilości i jakości wyizolowanego DNA

Analizę ilościową i jakościową wyizolowanego DNA przeprowadzono poprzez pomiar absorpcji z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 firmy ThermoScientific przy zastosowaniu fali o długości 260 i 280 nm. Zmierzone stężenie wyizolowanego DNA we wszystkich próbkach było wyższe niż 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, którą to wartość przyjęto za minimalną wymaganą do dalszych badań. W celu oceny jakości otrzymanego DNA, przeprowadzono pomiary absorpcji w 260 i 280 nm i obliczono stosunek $A_{260/280}$. Wartości niższe niż 1.5 świadczyłyby o znacznym zanieczyszczeniu preparatu, mogącym uniemożliwić amplifikację DNA, z kolei wyniki powyżej 2.0 wskazywałyby na zanieczyszczenie RNA. Wszystkie uzyskane wartości mieściły się w zakresie 1.8 – 2.0, co oznacza bardzo dobrą czystość DNA.

3.2.4. Oznaczanie polimorfizmów typu SNP metodą dyskryminacji alleli.

Analizę polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) -438G/A w genie *TAFI* oraz 1858C/T w genie *PTPN22* wykonano techniką dyskryminacji alleli (ang. *allelic discrimination*) z użyciem sond typu TaqMan. Metoda dyskryminacji alleli opiera się na łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*) i polega na amplifikacji określonych fragmentów DNA za pomocą zestawu starterów i sond znakowanych znacznikami fluorescencyjnymi. Do reakcji użyto komplementarnych do amplifikowanego fragmentu sond TaqMan znakowanych na końcu 5' barwnikami FAM (karboksyfluoresceina) lub VIC[®], które odpowiednio rozpoznają allel typu dzikiego lub allel zmutowany. Działanie sond oparte jest na zjawisku fluorescencyjnego rezonansowego transferu energii (FRET, ang. *Förster/Fluorescent Resonance Energy Transfer*) pomiędzy cząsteczką reporterową na końcu 5' a wygaszającą na końcu 3'. W wyniku wzbudzenia falą świetlną o odpowiedniej długości fluorochrom reporterowy przenosi energię na fluorochrom wygaszający, który emituje falę świetlną o innej

długości. W sondzie natywnej fluorochrom reporterowy i wygaszający znajdują się blisko siebie i nie dochodzi do emisji fluorescencji w zakresie charakterystycznym dla FAM lub VIC. Podczas wydłużania nici dochodzi do hydrolizy sondy pod wpływem polimerazy AmpliTaq, posiadającej aktywność 5'-egzonukleazową, co powoduje oddzielenie cząsteczki reporterowej od wygaszającej i emisję fluorescencji o długości fali odpowiedniej dla FAM lub VIC. Pomiar natężenia sygnału fluorescencji umożliwia detekcję próbek homozygotycznych i heterozygotycznych. Na Rycinie 6 zilustrowano schematycznie zasadę działania sond TaqMan w reakcji dyskryminacji alleli.



Ryc. 6. Schemat obrazujący zasadę działania sond typu TaqMan w reakcji dyskryminacji allelicznej (zmodyfikowano według Livak i wsp., 1995).

Reakcję prowadzono z zastosowaniem aparatu StepOnePlus (Life Technologies), w końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej 25,0 μ l, w której skład wchodziło 12,5 μ l TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Life Technologies), 1,25 μ l SNP Assay Mix (Life Technologies), 3 ng genomowego DNA oraz woda wolna od DNaz dodawana w ilości uzupełniającej mieszaninę do objętości 25,0 μ l. Jako kontrolę negatywną użyto mieszaniny pozbawionej genomowego DNA. Reakcja przebiegała w następujących warunkach temperaturowo – czasowych: 60 °C przez 30 sekund, 95 °C przez 10 minut, następnie 50 cykli w 92 °C przez 15 sekund i 60 °C przez 1 minutę. Do wykrywania polimorfizmu -438G/A rs2146881 w genie *TAFI* użyto zestawu sond i starterów C_16136443_10 (Life Technologies), sonda znakowana barwnikiem VIC była komplementarna do allelu G, natomiast barwnik FAM wykrywał allel A. Polimorfizm 1858C/T rs2476601 w genie *PTPN22* zbadano za pomocą zestawu C_16021387_20 (Life Technologies), w którym

barwnik VIC służył do detekcji allelu T, a barwnik FAM do allelu C. Reakcję prowadzono na 96-dółkowych płytkach MicroAMP Fast Optical (Life Technologies). Analiza wyników została przeprowadzona na podstawie wykresów punktowych uzyskanych w oprogramowaniu StepOne Software v 2.3.

3.2.5. Oznaczanie polimorfizmów typu SNP metodą PCR-RFLP

Typowanie SNPs 49A/G w genie *CTLA-4*, -1123C/G w genie *PTPN22* oraz -455G/A w genie *FBG* przeprowadzono z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*, RFLP). Polega ona na wykrywaniu różnic pomiędzy długościami fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu enzymem restrykcyjnym, dobranym tak aby badany polimorfizm utworzył lub wyeliminował rozpoznawaną przez niego sekwencję.

W pierwszym etapie oznaczenia przeprowadzono amplifikację wybranego fragmentu genu z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Veriti[®] Thermal Cycler (Life Technologies). Sekwencje starterów zaczerpnięto z literatury, odpowiednio dla SNPs genów *PTPN22*, *CTLA-4*, i *FBG* z publikacji Huang i wsp. 2012, Sallacki i wsp. 2005, Thomas i wsp. 1991. Natomiast warunki dla każdej reakcji dobierano i optymalizowano eksperymentalnie. Sekwencje zastosowanych starterów, składy mieszanin reakcyjnych oraz profile czasowo-termiczne reakcji PCR przedstawiono w Tabelach III, IV i V.

Tabela III. Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji PCR do amplifikacji fragmentów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FBG*.

Polimorfizm	Sekwencje starterów	
<i>PTPN22</i> -1123C/G	<i>Forward</i>	5'-CCA TTG AGA GGT TAT GCG AGC T-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CGC CAC CTT GCT GAC AAC AT-3'
<i>CTLA-4</i> 49A/G	<i>Forward</i>	5'-GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3'
<i>FBG</i> -455G/A	<i>Forward</i>	5'-AAG AAT TTG GGA ATG CAA TCT CTG CTA CCT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CTC CTC ATT GTC GTT GAC ACC TTG GGA C-3'

ang. *forward* – starter przedni; ang. *reverse* – starter wsteczny

Tabela IV. Skład zastosowanych mieszanin reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FGB*.

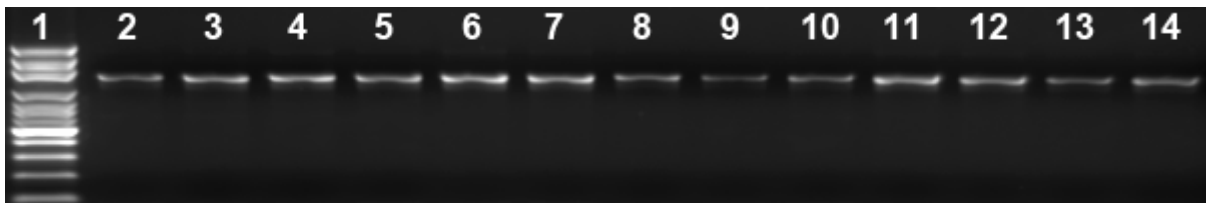
Składnik reakcji	Objętość na 1 próbkę [μ l]		
	<i>PTPN22</i> -1123C/G	<i>CTLA-4</i> 49A/G	<i>FGB</i> -455G/A
Woda (Ambion)	6,4	6,4	11,5
Bufor do PCR (AmpliTaq Gold [®] 360 PCR Master Mix 2x, LifeTechnologies)	7,5	7,5	12,5
Starter F (100 pmoli/ μ l, Genomed)	0,3	0,3	0,5
Starter R (100 pmoli/ μ l, Genomed)	0,3	0,3	0,5
Matryca (DNA)	0,5	0,5	0,5
Objętość końcowa	15,0	15,0	25,0

Tabela V. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FGB*.

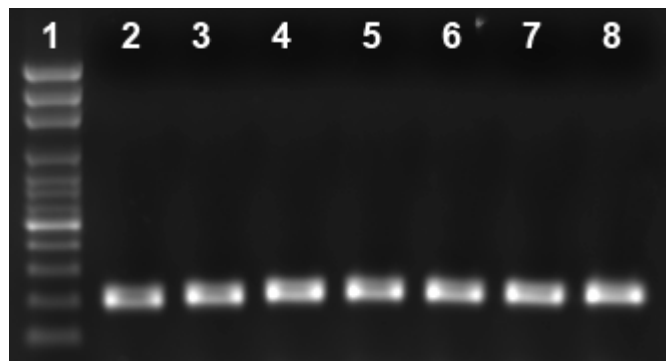
Polimorfizm	Etap reakcji	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas trwania
<i>PTPN22</i> -1123C/G	Wstępna denaturacja	95	2 min
	Denaturacja	95	30 s
	Przyłączanie starterów	56	30 s
	Synteza	72	30 s
	Wydłużanie końcowe	72	7 min
<i>CTLA-4</i> 49A/G	Wstępna denaturacja	94	4 min
	Denaturacja	94	45 s
	Przyłączanie starterów	55	45 s
	Synteza	72	45 s
	Wydłużanie końcowe	72	7 min
<i>FGB</i> -455G/A	Wstępna denaturacja	95	5 min
	Denaturacja	95	1 min
	Przyłączanie starterów	62	1,5 min
	Synteza	72	2 min
	Wydłużanie końcowe	72	30 min

Jakość i ilość uzyskanych w reakcji PCR amplifikonów sprawdzano elektroforetycznie w żelu agarozowym (Agarose Basica LE, Prona) zawierającym bromek etydy, przy napięciu 120 V w buforze $0,5 \times$ TBE. Do dołka w żelu nakładano 3 μ l markera wielkości DNA (GeneRuler 1 kB Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) lub mieszaninę złożoną z 2 μ l

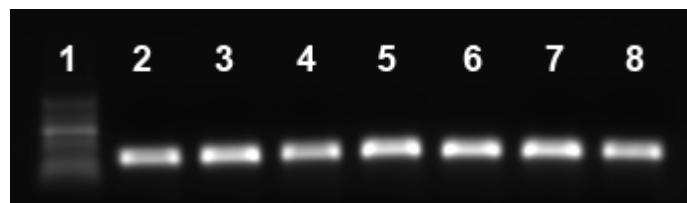
buforu obciążającego (GelPilot DNA Loading Dye, Qiagen) i 8 µl produktu reakcji PCR. Obraz rozdziału elektroforetycznego wizualizowano za pomocą transiluminatora UV Stella 2000 firmy Raytest, wykorzystując oprogramowanie LabImage 1D (Kapelan GmGH Bio-Imaging Solutions). Przykładowe zdjęcia uzyskanych elektroforogramów przedstawiono na Rycinach 7, 8 i 9.



Ryc. 7. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR dla genu *FGB* w obecności bromku etydyny (1,6% żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.



Ryc. 8. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR o długości 175 pz dla genu *PTPN22* w obecności bromku etydyny (1% żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.

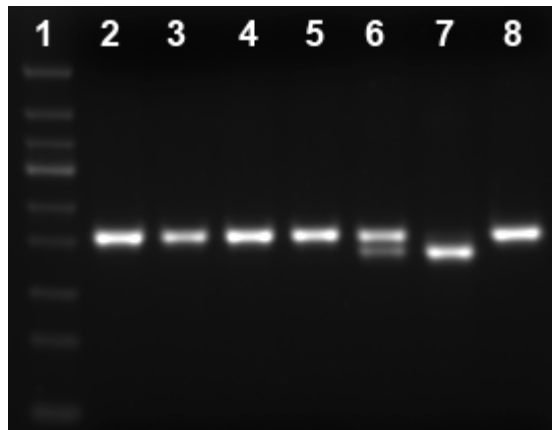


Ryc. 9. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR o długości 166 pz dla genu *CTLA-4* w obecności bromku etydyny (1% żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.

W drugim etapie przeprowadzania genotypowania badanych polimorfizmów, uzyskane amplikony trawiono enzymami restrykcyjnymi. Dla wariantu polimorficznego *PTPN22* -1123C/G, produkt reakcji PCR o długości 175 pz trawiono enzymem *SacI* (Fermentas) przez 3 godziny w temperaturze 37 °C. Otrzymano fragmenty o długościach odpowiadających poszczególnym genotypom:

- GG (175pz),
- CC (151pz, 24pz),
- GC (175pz, 151pz, 24pz).

Przykładowy wynik analizy PCR-RFLP po rozdzieleniu w żelu agarozowym, przedstawiający warianty genetyczne genu *PTPN22* przedstawiono na Rycinie 10.

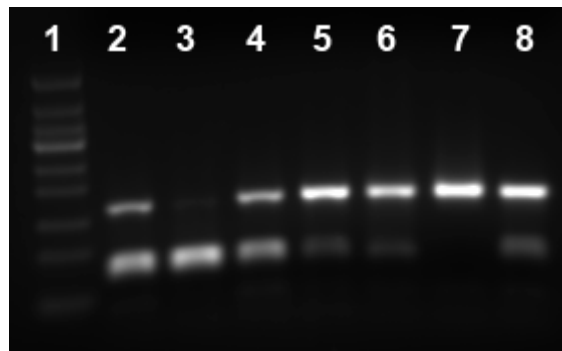


Ryc. 10. Wynik analizy SNP -1123C/G genu *PTPN22* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem *SacI*. Produkty rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 3, 4, 5 i 8 – homozygoty GG, tor 6 – heterozygota GC, tor 7 – homozygota CC.

W przypadku SNP 49A/G genu *CTLA-4* zastosowano restryktazę *BbvI*. Reakcje enzymatyczne przeprowadzono w temperaturze 65 °C przez 3 godziny. Otrzymano fragmenty o długościach odpowiadających poszczególnym genotypom:

- AA (162 pz),
- GA (162 pz, 74 pz)
- GG (88 pz, 74 pz).

Przykładowy wynik analizy PCR-RFLP po rozdzieleniu w żelu agarozowym, przedstawiający warianty genetyczne genu *CTLA-4* przedstawiono na Rycinie 11.

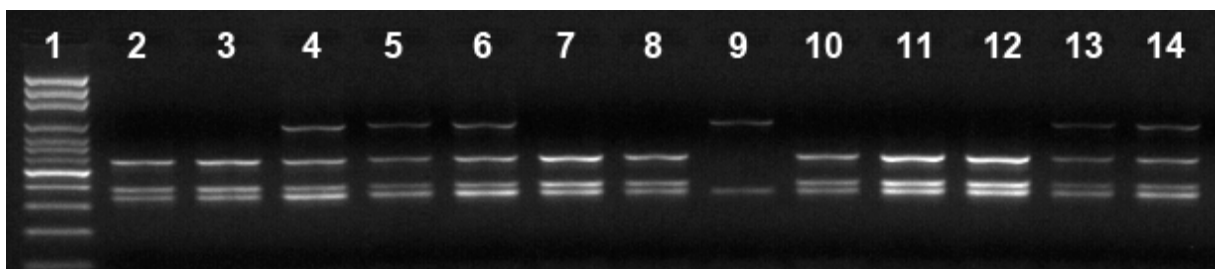


Ryc. 11. Wynik analizy SNP 49A/G genu *CTLA-4* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym *BbvI*. Produkty trawienia rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 4, 5, 6 i 8 – heterozygoty GA, tor 3 – homozygota GG, tor 7 – homozygota AA.

Natomiast dla wariantu polimorficznego -455G/A genu *FGB* otrzymany produkt reakcji PCR trawiono enzymem restrykcyjnym *HaeIII* w 37°C przez 3 godziny. Po trawieniu otrzymano fragmenty o długościach odpowiednio dla genotypów:

- AA (958 pz i 343 pz),
- GG (575 pz, 383 pz i 343 pz),
- GA (958 pz, 575 pz, 383 pz i 343 pz).

Przykładowy wynik analizy PCR-RFLP po rozdzieleniu w żelu agarozowym, przedstawiający warianty genetyczne genu *FBN* przedstawiono na Rycinie 12.



Ryc. 12. Wynik analizy SNP -455G/A genu *FGB* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym *HaeIII*. Produkty trawienia rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 3, 7, 8, 10, 11 i 12 – homozygoty GG, tory 4, 5, 6, 13 i 14 – heterozygota GA, tor 9 – homozygota AA.

3.2.6. Oznaczanie aktywności TAFI w osoczu

Oznaczenie aktywności TAFI w osoczu przeprowadzono za pomocą komercyjnie dostępnego testu TAFI Activity Kit firmy American Diagnostica GmbH (nr kat. ADG871). Całą procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją, dołączoną przez producenta. Substratem dla TAFI jest peptyd złożony z L-lizyny i L-argininy, w której α -pozycję zajmuje atom siarki. Jego degradacji przez TAFI towarzyszy powstawanie pochodnej tiolowej. Grupa tiolowa reaguje z bezbarwnym odczynnikiem Ellmana (kwas 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy), DNTB), tworząc tionitrobenzoesową pochodną białka oraz zabarwiony na żółty kolor anion tionitrobenzoesowy (TNB) o maksimum absorpcji przy 412 nm.



Absorbancja mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm jest proporcjonalna do ilości produktu zachodzącej reakcji enzymatycznej. Pomiar wykonywano w sposób ciągły przez 5 minut, przy długości fali 405 nm z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG LABTECH. Liniową część otrzymanej krzywej kinetycznej reakcji wykorzystano do obliczenia aktywności TAFIa w badanych próbkach osocza w porównaniu z krzywą standardową przy użyciu oprogramowania MARS Data Analysis Software w wersji V3.01 R2 firmy BMG LABTECH.

3.2.7. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Zgodność rozkładu genotypów z rozkładem oczekiwanym z równowagi Hardy'ego-Weinberga (H-W), weryfikowano testem chi-kwadrat (χ^2). Miarą odstępstwa częstości genotypów od równowagi Hardy'ego-Wenberga, dla *locus* z allelami a i b, jest współczynnik

$$f = \frac{p_{aa} - p_a^2}{p_a(1 - p_a)},$$

gdzie p_a to obserwowana częstość allelu a, p_{aa} to obserwowana częstość

homozygot *aa*. Współczynnik f przyjmuje wartość zero wtedy i tylko wtedy, kiedy *locus* znajduje się w równowadze H-W. Wartości dodatnie współczynnika wskazują na nadmiar homozygot. Wartości ujemne sygnalizują wzrost częstości heterozygot w stosunku do tego, czego należałoby oczekiwać, gdyby *locus* pozostawało w równowadze H-W. W przypadku

małych liczebności, p-wartość statystyki testowej, weryfikującej hipotezę o zgodności rozkładu genotypów z rozkładem H-W, wyznaczano metodą Monte Carlo.

Ilorazem szans (ang. *odds ratio*, OR) i przedziałem ufności, CI95%, dla niego, na poziomie $1-\alpha=0.95$, określano siłę związku genotypu z chorobą. Mediana i średnia arytmetyczna były miarami położenia. Oprócz tego, podano także pierwszy (Q1) i trzeci (Q3) kwartył w zbiorze obserwacji. Tam, gdzie miarą przeciętną obserwacji była mediana, miarą zróżnicowania obserwacji była statystyka $S_n = med\{med|x_i - x_j|; j = 1..n\}$ (Rousseeuw i Croux, 1993). Przy średniej arytmetycznej miarą zróżnicowania było odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD).

Dla loci PTPN22 1858C/T i PTPN22 -1123C/G obliczono niezrównoważenie sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD). Siłę LD określono współczynnikiem

$$R^2 = \frac{\sum_i^2 \sum_j^2 \frac{D_{ij}^2}{p_i q_j}}{\sum_i^2 \sum_j^2 \frac{D_{ij}^2}{p_i q_j}},$$

gdzie p_i and q_j są częstościami i -tego allelu w locus A i j -tego allelu w locus B, $D_{ij} = x_{ij} - p_i q_j$, x_{ij} jest częstością haplotypu z alellem i w locus A i allelem j w locus B. R^2 przyjmuje wartości z zakresu $[0,1]$, przy czym $R^2 = 0$ wtedy i tylko wtedy, kiedy oba loci są w równowadze (ang. *linkage equilibrium*, LE).

Modelem liniowym analizowano aktywność produktu genu *TAFI*, aTAFI. Wartości współczynników modelu i przedziały ufności, CI95%, szacowano numerycznie w oparciu o 5999 prób bootstrapowych. Tę część zmienności aktywności TAFI, którą można wyjaśnić modelem, określano współczynnikiem R^2 . Szczegółowe hipotezy o równości średnich aTAFI, w zależności od genotypu i grupy badanej, testowano statystyką F dla kontrastów. Współczynnikami korelacji $r_{alerting}$ i $r_{effect\ size}$ określano siłę efektów testowanych różnic. Współczynnik $r_{alerting}$ mierzy korelację liniową pomiędzy średnimi grupowymi a wagami kontrastu. Współczynnik $r_{effectsize}$ uwzględnia dwa dodatkowe źródła zmienności, tj. a) zróżnicowanie wewnątrzgrupowe i b) zmienność między grupami, której nie można wytłumaczyć testowanym kontrastem.

$$\text{Ogólnie } r_{effectsize} = \sqrt{\frac{\bar{F}_{kontrast}}{\bar{F}_{kontrast} + \bar{F}_{nie-kontrast} \times (ss_{nie-kontrast}) + ss_{wewn.grupowe}}},$$

przy czym $\bar{F}_{kontrast}$ jest liczony jak dla równych liczebności w l grupach, a ss to liczba stopni swobody. Trzy testowane hipotezy zostały sformułowane *a priori* a jedna *a posteriori*.

Średnica aorty w grupie kontrolnej oraz największa średnica tętniaka w grupie chorych zależą od czynników antropomorficznych, tzn. od wskaźnika masy ciała, BMI, i od powierzchni ciała ludzkiego, BSA. Dlatego w analizie zależności między rozważanymi polimorfizmami genetycznymi a średnicą aorty/tętniaka aorty posłużono się wskaźnikiem wielkości aorty ASI, który wyraża średnicę [cm] w stosunku do powierzchni ciała [m²] oraz wskaźnikiem BMI_{index}, który wyraża średnicę [cm] w stosunku do BMI [kg/m²]. Oba wskaźniki są ze sobą wysoko, dodatnio, skorelowane i były analizowane łącznie, jako zmienna dwuwymiarowa $d' = (ASI, BMI_{index}) \in \mathcal{R}^2$, opisująca średnicę aorty w grupie kontrolnej i tętniaka aorty brzusznej – w grupie chorych. Hipotezy o równości wektorów wartości oczekiwanych w grupach testowano w oparciu o ślad λ Pillai i Bartletta.

Z uwagi na to, że zmierzona grubość skrzepliny jest cechą *quasi* dyskretną, przyjmującą tylko kilkanaście różnych wartości, pacjentów podzielono na 6 rozłącznych grup. Do pierwszej grupy zaliczono $n = 47$ pacjentów, których grubość skrzepliny mieściła się w przedziale domkniętym 10-14 mm, do drugiego przedziału zaliczono $n = 48$ pacjentów, których grubość skrzepliny mieściła się w przedziale [15-19] mm. Innych pacjentów zaliczono do przedziałów: [20-20] ($n = 52$), [21-29] ($n = 43$), [30-35] ($n = 44$) oraz [36-46] ($n=18$). Formalnie, rozpatrywano grubość skrzepliny jako zmienną $k \in [11.5, 16, 20, 24.5, 32, 40]$. W nawiasie podano środki w/w przedziałów. Grubość skrzepliny była analizowana modelem zdefiniowanym jako $h[P(ILT \leq k | \underline{x})] = \alpha_k + \underline{\beta}^T \underline{x}$, gdzie h jest funkcją typu *logit*. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano oprogramowanie Microsoft Excel 2010 oraz GNU Octave 3.6.4.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka badanej populacji

Po uwzględnieniu kryteriów włączenia i wyłączenia ostatecznie badaniami objęto 274 pacjentów i 250 osób z grupy kontrolnej. W Tabeli VI i VII zamieszczono kolejno statystyki opisowe wieku i masy ciała chorych z TAB i osób z grupy kontrolnej. Średni wiek chorych wynosił 70.1 lat, zaś średni wiek osób bez tętniaka był równy 68.4 lata.

Tabela VI. Wiek osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Grupa	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max	Powyżej 65 lat	
							N	%
Chorzy	43	64	71	7	76	90	188	68.6
Kontrola	58	63	67	5	73	84	145	58.0
Razem	43	63	69	7	75	90	333	63.5

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.

Tabela VII. Masa ciała osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Grupa	Plec	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max
Chorzy	Kobiety	45	64	70	10	79	100
	Mężczyźni	52	70	80	12	89	140
	Razem	45	70	78.5	12	88.8	140
Kontrola	Kobiety	55	58.5	65	11	81.5	90
	Mężczyźni	55	74	82	9	90	120
	Razem	55	74	82	9	90	120
Razem		45	71	80	11	89	140

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.

Parametrem najczęściej wykorzystywanym do charakteryzowania TAB, a także do monitorowania rozwoju choroby i ryzyka pęknięcia tętniaka, jest jego maksymalna średnica. W prezentowanym badaniu, w celu przeprowadzenia wnikliwej oceny zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genetycznymi a wystąpieniem TAB, zdecydowano się poszerzyć analizę o parametry uwzględniające osobniczą zmienność uczestników badania. W tym celu

obliczono wskaźnik masy ciała, BMI, (Tabela VIII) oraz powierzchnię ciała, BSA, (Tabela IX) osób badanych. Parametry te posłużyły z kolei do wyznaczenia wskaźników wielkości aorty, BMI_{index} i ASI, odnoszących średnicę aorty do masy i powierzchni ciała uczestników badania.

Tabela VIII. Wskaźnik masy ciała (BMI) osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Grupa	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max	BMI > 30	
							N	%
Chorzy	17.28	24.22	27	3.55	30.08	45.9	72	26.3
Kontrola	16.6	24.92	27.04	3.15	29.58	38.74	57	22.8
Razem	16.6	24.57	27.02	3.39	29.76	45.9	129	24.6

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.

Tabela IX. Powierzchnia ciała (BSA) osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Grupa	Plec	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max
Chorzy	Kobiety	1.44	1.665	1.77	0.12	1.845	2.11
	Mężczyźni	1.58	1.83	1.92	0.14	2.04	2.73
	Razem	1.44	1.79	1.9	0.15	2.027	2.73
Kontrola	Kobiety	1.53	1.59	1.66	0.16	1.82	1.93
	Mężczyźni	1.56	1.87	1.97	0.12	2.05	2.39
	Razem	1.53	1.853	1.96	0.13	2.05	2.39
Razem		1.44	1.828	1.93	0.14	2.04	2.73

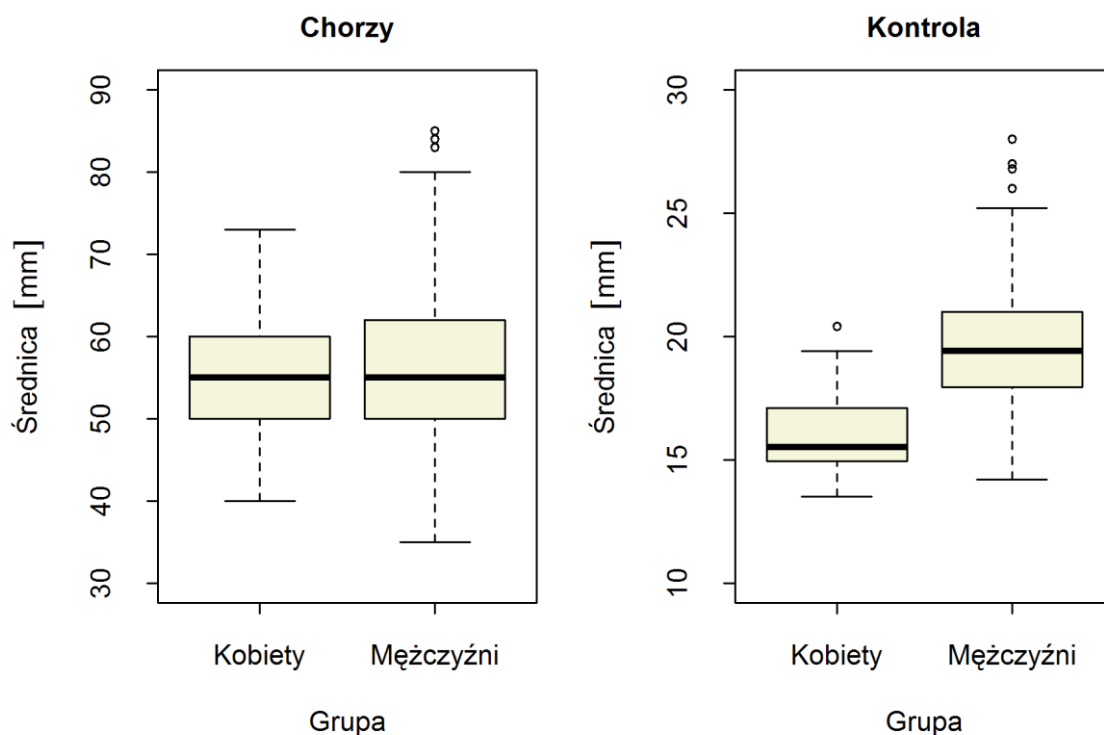
Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.

W Tabeli X oraz na Rycinie 13 zamieszczono porównanie średnicy aorty w grupach chorych mężczyzn i kobiet z TAB oraz z prawidłową średnicą aorty. Przeciętna średnica tętniaka w jego najszerszym miejscu wynosiła 55 mm, zarówno w grupie kobiet jak i w grupie mężczyzn, z przeciętną różnicą między dwoma dowolnie wybranymi osobami wynoszącą S_n = 7 mm. U trzech na czterech chorych średnica w najszerszym miejscu tętniaka wynosiła nie mniej niż Q1 = 50 mm, a co u czwartego była większa niż Q3 = 62 mm. Natomiast w grupie kontrolnej odnotowano różnicę wynoszącą 3.9 mm między przeciętnymi średnicami brzuszego odcinka aorty kobiet i mężczyzn, co jest wynikiem spodziewanym.

Tabela X. Średnica aorty [mm] osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Grupa	Płeć	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max
Chorzy	Kobiety	40	50	55	8	60	73
	Mężczyźni	35	50	55	7	62	120
	Razem	35	50	55	7	62	120
Kontrola	Kobiety	13.5	14.9	15.5	1.8	17.1	20.4
	Mężczyźni	14.2	17.9	19.4	1.9	21	28
	Razem	13.5	17.6	19.4	2	20.9	28

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.



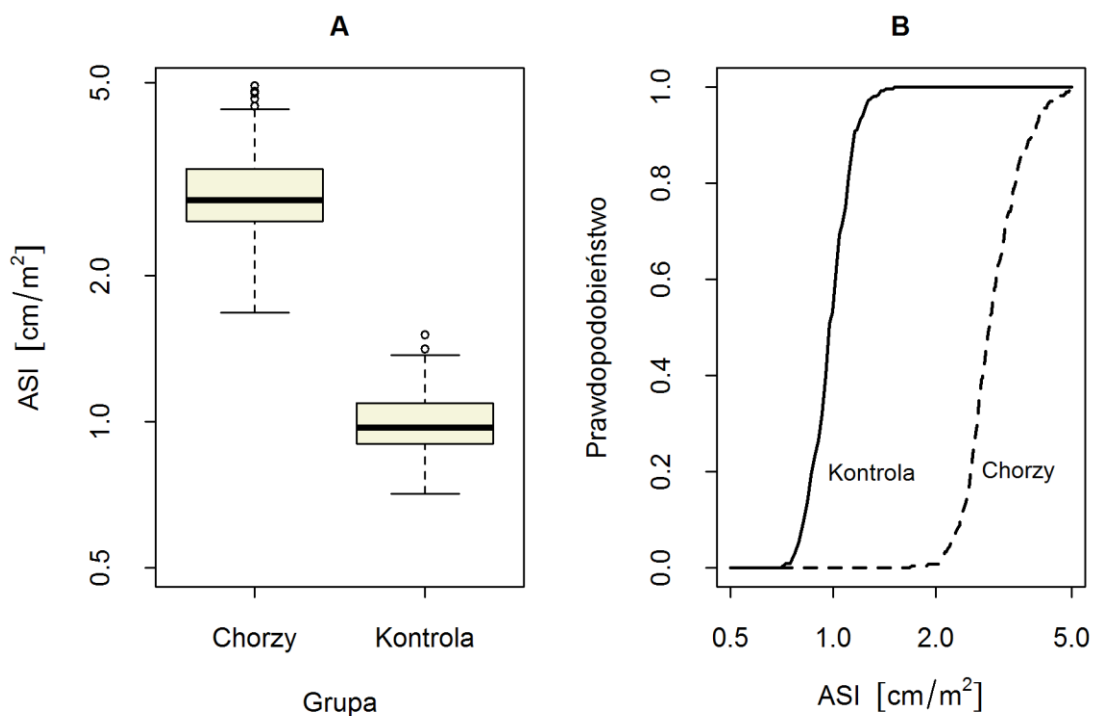
Ryc. 13. Średnica aorty [mm] osób badanych, w podziale na płeć. Na wykresie lewym mediany, kwartyły pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB. Na wykresie prawym – w grupie kontrolnej.

Statystyki opisowe ASI, czyli średnicy aorty w odniesieniu do powierzchni ciała, zamieszczono w Tabeli XI oraz na Rycinie 14. Przeciętna średnica tętniaka w jego najszerszym miejscu wynosiła 2.86 cm/m^2 powierzchni ciała z przeciętną różnicą między dwoma chorymi wynoszącą $S_n = 0.42 \text{ cm/m}^2$. Na wykresie prawym Ryciny 14 zamieszczono oszacowane na podstawie dystrybuanty empirycznej wartości prawdopodobieństwa spotkania osoby, której ASI wyniósłby nie więcej niż zadana wartość.

Tabela XI. Średnica aorty w stosunku do powierzchni ciała, ASI [cm/m^2], w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej ($n=274$) i kontrolnej ($n=250$).

Grupa	Min	Q1	Mediana	S_n	Q3	Max
Chorzy	1.68	2.59	2.86	0.42	3.318	6.18
Kontrola	0.71	0.9	0.97	0.11	1.088	1.51

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.



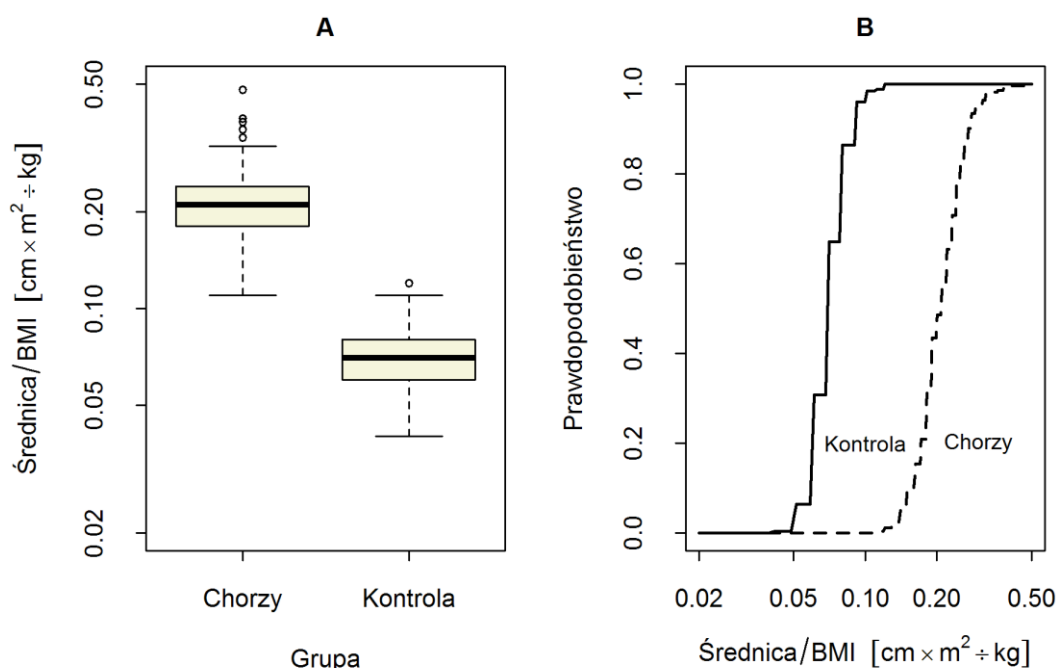
Ryc. 14. Średnica aorty w stosunku do powierzchni ciała, ASI [cm/m^2]. Na wykresie lewym mediany, kwartyły pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB i kontrolnej. Na wykresie prawym – dystrybuanta empiryczna ASI, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że ASI przyjmie wartość nie większą niż zadana.

Natomiast w Tabeli XII i na Rycinie 15 zamieszczono statystyki opisowe średnicy aorty w stosunku do wskaźnika masy ciała BMI. Przeciętna średnica aorty w przeliczeniu na BMI w grupie chorych z TAB jest 3 razy większa niż w grupie kontrolnej. Trzech na czterech chorych miało ten wskaźnik nie niższy niż $Q1 = 0.18$ a 25% chorych nie mniejszy niż 0.24. Podczas gdy w grupie kontrolnej 75% osób miało tę średnicę nie większą niż $Q3 = 0.08$. Z kolei na wykresie prawym Ryciny 15 zamieszczono oszacowane prawdopodobieństwo tego, że u losowo wybranej osoby omawiany wskaźnik przyjmie wartość nie większą niż wskazana.

Tabela XII. Średnica aorty w stosunku do BMI [$\text{cm} \times \text{m}^2/\text{kg}$], w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej ($n=274$) i kontrolnej ($n=250$).

Grupa	Min	Q1	Mediana	S_n	Q3	Max
Chorzy	0.11	0.18	0.21	0.04	0.24	0.48
Kontrola	0.04	0.06	0.07	0.01	0.08	0.12

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.



Ryc. 15. Średnica aorty w stosunku do BMI [$\text{cm} \times \text{m}^2/\text{kg}$]. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB i kontrolnej. Na wykresie prawym – dystrybuanta empiryczna wskaźnika, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że przyjmie on wartość nie większą niż zadana.

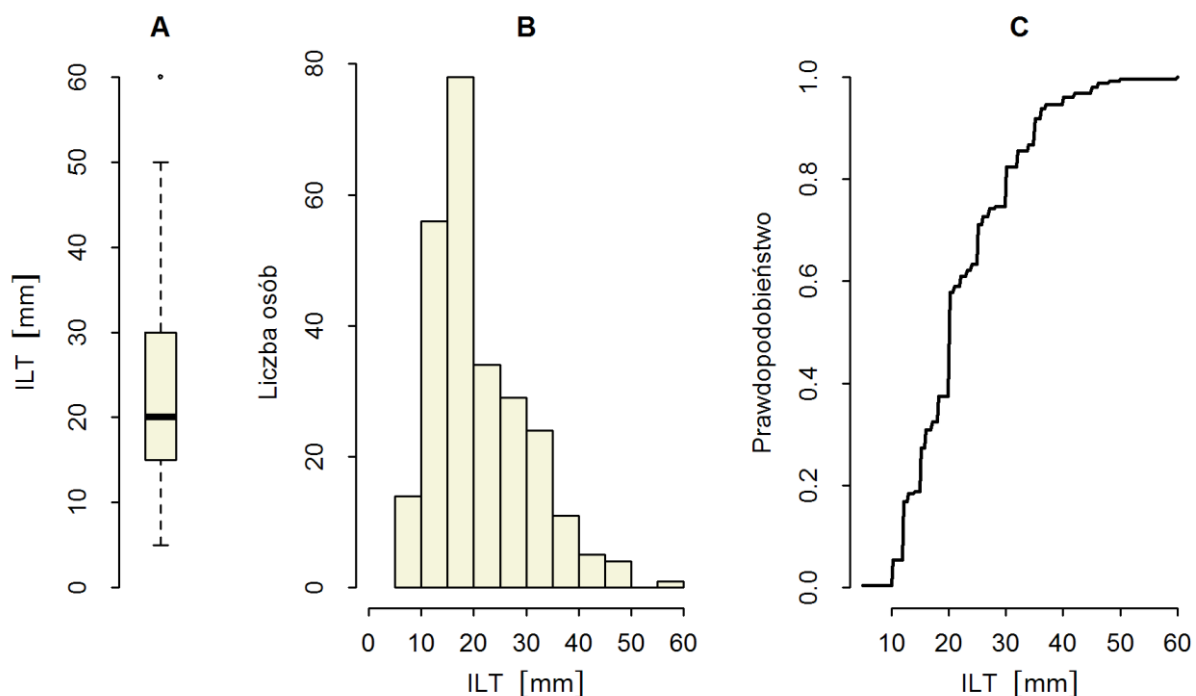
Bardzo często w worku TAB obecna jest skrzeplina przyścienna. W Tabeli XIII i na Rycinie 16 zamieszczono statystyki opisowe grubości skrzepliny w grupie chorych, w podziale na kobiety i mężczyzn. Ponieważ nie u wszystkich chorych skrzeplina występowała, w tabeli zamieszczono podsumowanie grubości u tych pacjentów, u których skrzeplinę stwierdzono.

Tabela XIII. Grubość skrzepliny przyściennej w grupie chorych, u których skrzeplinę stwierdzono (n=258), oraz częstość chorych bez skrzepliny (n=16), w podziale na płeć badanych.

Grupa	Min	Q1	Mediana	S _n	Q3	Max	Brak skrzepliny	
							N	%
Kobiety	10	12	19	8	23	35	3	8.6
Mężczyźni	5	15	20	7	30	73	13	5.4
Razem	5	15	20	7	30	73	16	5.8

Q1, Q3 – pierwszy i trzeci kwartył; S_n – miara zróżnicowania obserwacji, im wyższa tym wyższe zróżnicowanie; Min – najmniejsza obserwowana wartość; Max – największa obserwowana wartość.

Przeciętna grubość skrzepliny przyściennej w grupie kobiet wyniosła 19 mm z przeciętną różnicą między dwiema kobietami wynoszącą S_n = 8 mm. Grubość skrzepliny jest zatem w tej grupie dość zróżnicowana. Podobne zróżnicowanie grubości skrzepliny zaobserwowano w grupie chorych mężczyzn, u których skrzeplina miała grubość przeciętnie 20 mm. Wobec takich różnic w grubości skrzepliny między dwoma dowolnie wybranymi mężczyznami, lub między dwiema dowolnie wybranymi kobietami, obserwowana różnica w przeciętnej grubości skrzepliny między kobietami i mężczyznami, wynosząca 1 mm, jest bez jakiegokolwiek znaczenia. U ponad 75% osób w obu grupach grubość ta była większa niż 10 mm, oraz u 25% kobiet większa niż Q3 = 23 mm, a u 25% mężczyzn większa niż Q3 = 30 mm. Na 39 kobiet w grupie chorych skrzepliny nie miały 3 kobiety, co stanowi 8.6% kobiet. Dla porównania, w grupie 239 chorych mężczyzn skrzepliny nie stwierdzono u 13, co stanowi 5.6% mężczyzn z tętniakiem. Skrzeplina przyścienna nie występuje u co dwudziestego chorego (5.8%).



Ryc. 16. Grubość skrzepliny przyściennej [mm] w grupie chorych, u których stwierdzono skrzeplinę. Na wykresie **A** – mediana, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobny punkt, obserwacja odstająca. Na wykresie **B** – histogram grubości skrzepliny. Na wykresie **C** – dystrybuanta empiryczna, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że grubość skrzepliny przyjmie wartość nie większą niż zadana.

W ogólnej charakterystyce uczestników badania uwzględniono również czynniki ryzyka rozwoju TAB, występowanie chorób współistniejących oraz stosowaną farmakoterapię (Tabela XVI). W Tabeli XIV zamieszczono liczebności i odsetki osób w obu badanych grupach, u których występowały wymienione choroby współistniejące i czynniki ryzyka rozwoju TAB. Bardzo silnym czynnikiem ryzyka w genezie tętniaka aorty brzusznej jest palenie tytoniu. Osoba paląca ma $OR = 7.94$ razy więcej szans na rozwój tętniaka niż osoba niepaląca. Biorąc pod uwagę przedział ufności $CI_{95\%}(5.23; 12.7)$, szansa ta prawie na pewno jest 5 – krotnie większa.

Tabela XIV. Porównanie występowania chorób współistniejących i czynników ryzyka w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Grupa	Chorzy			Kontrola			OR	CI95%	
	Nie	Tak	% Tak	Nie	Tak	% Tak			
Choroby współistniejące i czynniki ryzyka									
Incydent mózgowo-naczyniowy	250	24	8.8	237	13	5.2	1.75	0.87	3.52
Cukrzyca typu 2	221	53	19.3	211	39	15.6	1.30	0.82	2.04
Nadciśnienie tętnicze	59	215	78.5	89	161	64.4	2.01	1.37	2.97
Zawał serca	204	70	25.5	222	28	11.2	2.72	1.69	4.39
Dyslipidemia	101	173	63.1	131	119	47.6	1.89	1.33	2.67
Choroby nerek	232	42	15.3	213	37	14.8	1.04	0.65	1.68
Przepuklina	232	42	15.3	180	70	28	0.47	0.30	0.72
Wczesne powikłania pooperacyjne	249	25	9.1	-	-	-	-	-	-
Palenie tytoniu	111	163	59.5	211	39	15.6	7.94	5.23	12.07

OR – *odds ratio*, iloraz szans; grupa chorych z TAB przyjęta jako grupa badana; CI95% – przedział ufności dla ilorazu szans na poziomie ufności $1-\alpha=0.95$.

U każdej osoby przeanalizowano współwystępowanie głównych czynników ryzyka rozwoju TAB: płeć męską, palenie tytoniu, wiek powyżej 65 roku życia, otyłość (BMI>30), nadciśnienie tętnicze i dyslipidemię. W tym celu zliczono liczbę występujących czynników ryzyka. Liczba ta może przyjmować wartości od zera do sześciu włącznie. Rozkład liczby czynników ryzyka w obu badanych grupach zamieszczono w Tabeli XV.

Tabela XV. Rozkład liczby czynników ryzyka rozwoju tętniaka aorty brzusznej (analizowane czynniki to: płeć męska, palenie tytoniu, wiek powyżej 65 roku życia, otyłość (BMI>30), nadciśnienie tętnicze i dyslipidemia), gdzie „0” oznacza brak czynników ryzyka a „6” występowanie wszystkich sześciu czynników ryzyka rozwoju tętniaka aorty brzusznej.

Suma czynników		0	1	2	3	4	5	6	Razem	Mediana S _n
Chorzy	N	1	4	25	56	112	62	14	274	Med = 4 S _n = 1
	%	0.4	1.5	9.1	20.4	40.9	22.6	5.1	100%	
	skum. %	0.4	1.9	11	31.4	72.3	94.9	100%	-	
Kontrola	N	0	25	53	85	63	22	2	250	Med = 3 S _n = 1
	%	0	10	21.2	34	25.2	8.8	0.8	100%	
	skum. %	0	10	31.2	65.2	90.4	99.2	100%	-	
OR = 4.03; CI95% (2.89; 5.59)										

skum. % – procent osób skumulowany.

W grupie 274 chorych najwięcej osób miało 4 różne czynniki ryzyka i osoby te stanowiły 40.9% osób w tej grupie. Natomiast w grupie kontrolnej 25.2% osób miało 4 czynniki ryzyka rozwoju TAB. Najwięcej osób w grupie kontrolnej miało 3 różne czynniki ryzyka i stanowiły one 34% osób w tej grupie. W Tabeli XV podano także odsetki skumulowane liczby osób, które miały co najwyżej określoną liczbę czynników ryzyka. W grupie chorych osoby, które miały co najwyżej 4 czynniki ryzyka, stanowiły łącznie 72.3% osób w tej grupie. Zaś w grupie kontrolnej osoby takie stanowiły aż 90% wszystkich osób w tej grupie.

Tabela XVI. Liczebności i częstości osób stosujących określone leczenie farmakologiczne w obu badanych grupach.

Grupa	Chorzy			Kontrola		
	Nie	Tak	%Tak	Nie	Tak	%Tak
Leczenie						
Statyny	112	162	59.1	161	89	35.6
Insulina	225	49	17.9	218	32	12.8
przeciw HTA	86	188	68.6	113	137	54.8
ASA	159	115	42.0	178	72	28.8
Beta-blokery	165	109	39.8	163	87	34.8
ACE-I	161	113	41.2	174	76	30.4
ARB	258	16	5.8	237	13	5.2
Diuretyki	218	56	20.4	220	30	12.0
CCB	195	79	28.8	204	46	18.4
mono HTA	206	68	24.8	204	46	18.4
kombi HTA	156	118	43.1	163	87	34.8
przeciwwzkrzepowe	224	50	18.2	231	19	7.6

przeciw HTA – leczenie farmakologiczne nadciśnienia tętniczego; ASA – kwas acetylosalicylowy; beta-blokery – leki blokujące receptory beta-adrenergiczne; ACE-I – inhibitory konwertazy angiotensyny; ARB – antagoniści receptora angiotensyny; CCB – blokery kanałów wapniowych; mono HTA – leczenie farmakologiczne nadciśnienia tętniczego jednym lekiem; kombi HTA – leczenie farmakologiczne nadciśnienia tętniczego więcej niż jednym lekiem; przeciwwzkrzepowe – w tym również ASA

4.2. Wyniki oznaczeń polimorfizmów genetycznych

4.2.1. Polimorfizm 1858C/T genu *PTPN22*

Analizując wyniki genotypowania polimorfizmu 1858C/T *PTPN22* wykazano, że rozkład genotypów w grupie chorych znacząco odbiega od rozkładu, którego należałoby oczekiwać, gdyby *locus* znajdowało się w równowadze Hardy'ego-Weinberga ($p = 0.0011$). Współczynnik $f = 0.22$ wskazuje na niedobór heterozygot w tej grupie. Jednocześnie w grupie kontrolnej to miejsce polimorficzne znajduje się w niemalże idealnej równowadze ($f = 0.016$). Częstości poszczególnych genotypów i alleli przedstawiono w Tabeli XVII. Wśród wszystkich uczestników badania najczęściej występującym genotypem był CC, bez względu na obecność TAB.

Tabela XVII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *PTPN22* 1858C/T w grupie badanej i kontrolnej.

<i>PTPN22</i> 1858C/T	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
CC	220	80.3	186	74.4
CT	44	16.1	59	23.6
TT	10	3.6	5	2.0
Razem	274	100%	250	100%
Zgodność z rozkładem Hardy'ego-Weinberga	$\chi^2_{1ss=1} = 13.45$ $p = 0.0011$		$\chi^2_{1ss=1} = 0.016$ $p = 0.899$	
Miara odstępstwa rozkładu genotypów od rozkładu Hardy'ego-Weinberga	$f = 0.22$		$f = 0.008$	
	CI95% 0.061; 0.38		CI95% -0.11; 0.14	
Genotypy	CC	CT	TT	
Chorzy	220	44	10	
Kontrola	186	59	5	
OR	1*	0.63	1.61	
CI95%	-	0.41; 0.98	0.57; 4.61	
$\chi^2_{1ss=1} = 4.71$; $p = 0.0299$				
Allele	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
C	484	88.3	431	86.2
T	64	11.7	69	13.8
Razem	548	100%	500	100%

* Genotyp CC jako grupa odniesienia.

4.2.2. Polimorfizm -1123G/C genu *PTPN22*

W Tabeli XVIII zamieszczono wyniki analizy miejsca polimorficznego -1123G/C w genie *PTPN22*. Rozkład genotypów w grupie chorych odbiega od rozkładu, którego należało by oczekiwać, gdyby *locus* było w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Współczynnik $f = 0.13$ dla tej grupy wskazuje na niedobór heterozygot. Analiza rozkładu genotypów w grupie kontrolnej nie dostarcza żadnych przesłanek do twierdzenia, że *locus* w tej grupie osób nie jest w równowadze Hardy'ego-Weinberga ($f = 0.024$). Zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej najczęściej obserwowano genotyp CG.

Tabela XVIII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *PTPN22* -1123G/C w grupie badanej i kontrolnej.

<i>PTPN22</i> -1123G/C	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
GG	171	62.4	147	58.8
GC	83	30.3	88	35.2
CC	20	7.3	15	6
Razem	274	100%	250	100%
Zgodność z rozkładem Hardy'ego-Weinberga	$\chi^2_{1ss=1} = 4.62$ $p = 0.0243$		$\chi^2_{1ss=1} = 0.14$ $p = 0.7226$	
Miara odstępstwa rozkładu genotypów od rozkładu Hardy'ego-Weinberga	$f = 0.13$		$f = 0.024$	
	CI95% 0.003; 0.26		CI95% -0.1; 0.15	
Genotypy	GG	GC	CC	
Chorzy	171	83	20	
Kontrola	147	88	15	
OR	1*	0.81	1.14	
CI95%	-	0.56; 1.18	0.57; 2.28	
$\chi^2_{1ss=1} = 1.43; p = 0.2314$				
Allele	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
G	425	77.6	382	76.4
C	123	22.4	118	23.6
Razem	548	100%	500	100%

* Genotyp GG jako grupa odniesienia.

4.2.3. Polimorfizm 49A/G genu *CTLA-4*

Porównując częstości genotypów i alleli przedstawione w Tabeli XIX można stwierdzić, że nie ma dowodów na to, by polimorfizm 49A/G w genie *CTLA4* miał związek z występowaniem tętniaka aorty brzusznej ($\chi^2_{1ss=1} = 1.43$; $p = 0.2314$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w dystrybucji genotypów pomiędzy badanymi grupami.

Tabela XIX. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *CTLA-4* 49 A/G w grupie badanej i kontrolnej.

<i>CTLA-4</i> 49A/G	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
AA	121	44.2	94	37.6
AG	114	41.6	117	46.8
GG	39	14.2	39	15.6
Razem	274	100%	250	100%
Zgodność z rozkładem Hardy'ego-Weinberga	$\chi^2_{1ss=1} = 2.03$ $p = 0.1821$		$\chi^2_{1ss=1} = 0.067$ $p = 0.7881$	
Miara odstępstwa rozkładu genotypów od rozkładu Hardy'ego-Weinberga	$f = 0.086$		$f = 0.016$	
	CI95% -0.03; 0.204		CI95% -0.11; 0.11	
Genotypy	AA	AG	GG	
Chorzy	121	114	39	
Kontrola	94	117	39	
OR	1*	0.76	0.78	
CI95%	-	0.52; 1.1	0.46; 1.3	
$\chi^2_{1ss=1} = 1.43$; $p = 0.2314$				
Allele	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
A	356	65	305	61
G	192	35	195	39
Razem	548	100%	500	100%

* Genotyp AA jako grupa odniesienia.

4.2.4. Polimorfizm -455G/A genu *FGB*

W Tabeli XX zamieszczono wyniki analizy częstości genotypów i alleli w miejscu polimorficznym -455G/A genu *FGB*. Częstość homozygoty GG w grupie chorych z TAB wyniosła 55.1%, a w grupie kontrolnej 57.6%. Obserwowany rozkład częstości genotypów w grupie chorych nie odbiega od rozkładu oczekiwanego z równowagi Hardy’ego-Weinberga ($p = 0.8687$). W grupie kontrolnej natomiast częstości genotypów w sposób nieprzypadkowy odbiegają od częstości oczekiwanej z równowagi H-W ($p = 0.0199$), ponieważ współczynnik f , będący miarą odstępstwa rozkładu częstości genotypów od rozkładu H-W wynosi $f = 0.147$ i wskazuje na niedobór heterozygot. Częstości każdego allelu w obu grupach są niemal takie same.

Tabela XX. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *FGB* -455G/A w grupie badanej i kontrolnej.

<i>FGB</i> -455G/A	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
GG	151	55.1	144	57.6
GA	106	38.7	82	32.8
AA	17	6.2	24	9.6
Razem	274	100%	250	100%
Zgodność z rozkładem Hardy’ego-Weinberga	$\chi^2_{1ss=1} = 0.078$ $p = 0.8687$		$\chi^2_{1ss=1} = 5.45$ $p = 0.0199$	
Miarą odstępstwa rozkładu genotypów od rozkładu Hardy’ego-Weinberga	$f = -0.017$		$f = 0.147$	
	CI95% -0.13; 0.1		CI95% 0.012; 0.28	
Genotypy	GG	GA	AA	
Chorzy	151	106	17	
Kontrola	144	82	24	
OR	1*	1.23	0.68	
CI95%	-	0.85; 1.78	0.35; 1.31	
$\chi^2_{1ss=1} = 0.026; p = 0.8710$				
Allele	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
G	408	74.5	370	74
A	140	25.5	130	26
Razem	548	100%	500	100%

* Genotyp GG jako grupa odniesienia.

4.2.5. Polimorfizm -438G/A genu *TAFI*

Analiza wyników genotypowania miejsca polimorficznego -438G/A genu *TAFI*, której wyniki przedstawiono w Tabeli XXI, nie daje podstaw do twierdzenia, że istnieje związek między genotypem w tym miejscu a zachorowaniem na tętniaka aorty brzusznej ($\chi^2_{1ss=1} = 1.95$; $p = 0.1625$).

Tabela XXI. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *TAFI* -438 G/A w grupie badanej i kontrolnej.

<i>TAFI</i> -438 G/A	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
GG	170	62	144	57.6
GA	94	34.3	90	36
AA	10	3.6	16	6.4
Razem	274	100%	250	100%
Zgodność z rozkładem Hardy'ego-Weinberga	$\chi^2_{1ss=1} = 0.46$ $p = 0.5914$		$\chi^2_{1ss=1} = 0.15$ $p = 0.7303$	
Miara odstępstwa rozkładu genotypów od rozkładu Hardy'ego-Weinberga	$f = -0.04$		$f = 0.02$	
	CI95% -0.15; 0.08		CI95% -0.09; 0.15	
Genotypy	GG	GA	AA	
Chorzy	170	94	10	
Kontrola	144	90	16	
OR	1**	0.88	0.54	
CI95%	-	0.62; 1.27	0.24; 1.21	
$\chi^2_{1ss=1} = 2.1$; $p = 0.1473$				
Allele	Chorzy		Kontrola	
	n	%	n	%
G	434	79.2	378	75.6
A	114	20.8	122	24.4
Razem	548	100%	500	100%

* Genotyp GG jako grupa odniesienia.

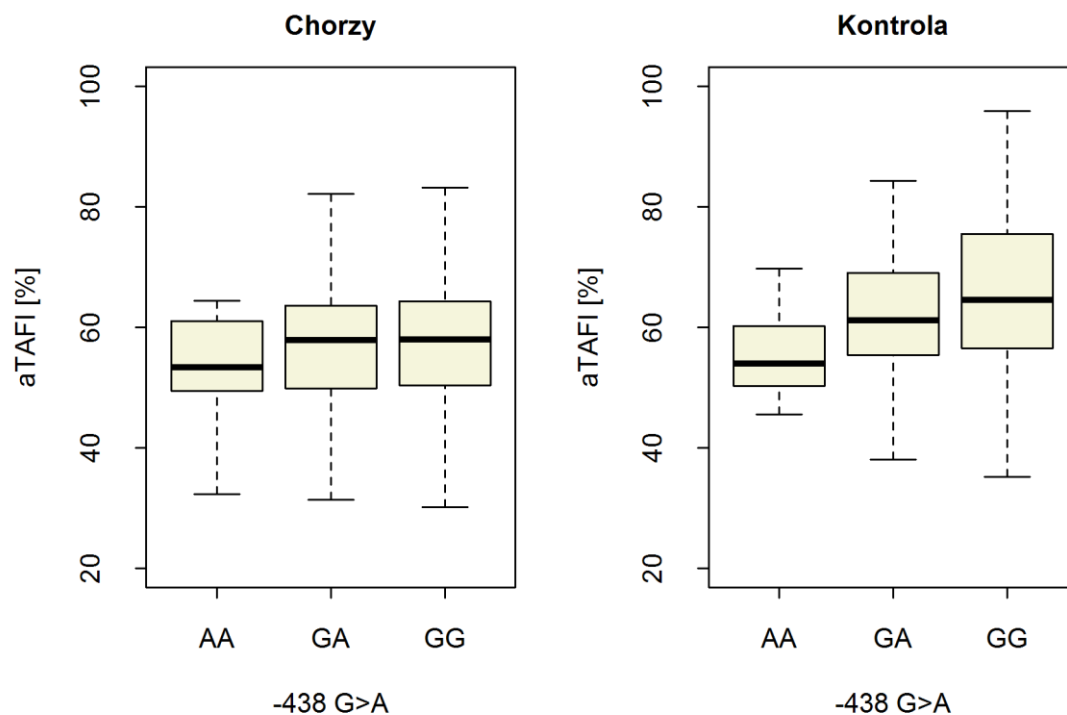
Dodatkowo, oprócz genotypowania miejsca polimorficznego -438G/A *TAFI*, przeprowadzono także ocenę aktywności produktu białkowego genu *TAFI*, aTAFI. W Tabeli XXII zamieszczono statystyki opisowe aktywności TAFI, wyrażonej w procentach, w zależności od genotypu *TAFI* w polimorfizmie -438G/A oraz łącznie, w grupie chorych i kontrolnej.

Tabela XXII. Aktywność produktu genu *TAFI*, aTAFI [%], w zależności od genotypu *TAFI* -438G/A w grupie chorych z TAB i kontrolnej oraz łącznie dla całej populacji badanej.

Grupa	AA	AG	GG	Razem
Chorzy	52.35 (10.55) [32.3-64.4] n=10	57.06 (10.85) [31.4-82.1] n=94	57.46 (10.81) [30.1-83.2] n=165	57.13 (10.81) [30.1-83.2] n=269
Kontrola	55.41 (6.93) [45.5-69.7] n=16	61.84 (10.39) [38-84.3] n=89	65.89 (13.02) [35.2-95.9] n=144	63.77 (12.14) [35.2-95.9] n=249
Razem	54.23 (8.44) [32.3-69.7] n=26	59.38 (10.87) [31.4-84.3] n=183	61.39 (12.59) [30.1-95.9] n=309	60.32 (11.93) [30.1-95.9] n=518

W tabeli podano średnie, (odchylenia standardowe), [zakresy] i liczebności próby.

Średnia aktywność TAFI w grupie chorych z genotypem AA wyniosła 52.35% z odchyleniem standardowym wynoszącym SD = 10.55%. Średnia aktywność w grupie chorych o genotypie GG wyniosła zaś 57.46%, a więc o około 5 punktów procentowych więcej niż w grupie homozygot AA. W grupie osób kontrolnych o genotypie AA średnia aktywność była równa 55.41%, natomiast w grupie kontrolnych homozygot GG była o 10 punktów procentowych wyższa i wyniosła 65.89%. Różnice w aktywności TAFI zaprezentowano także na Rycinie 17.



Ryc. 17. Aktywność produktu genu *TAFI* [%], w zależności od genotypu *TAFI*-438G/A i grupy badanej. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne w grupie chorych z TAB. Na wykresie prawym – w grupie kontrolnej.

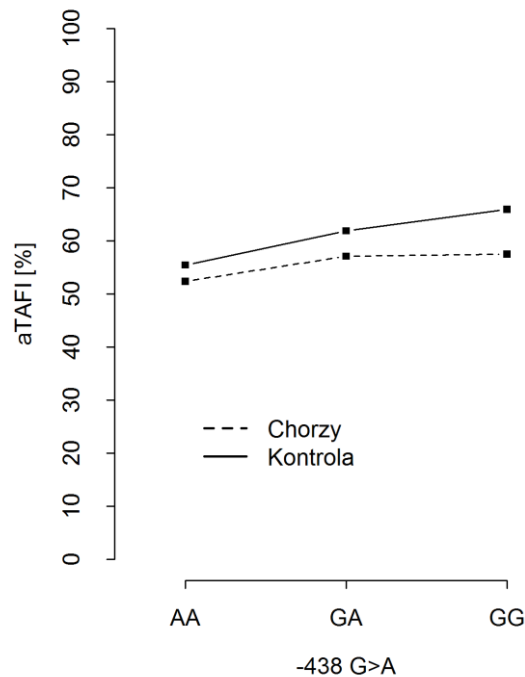
W Tabeli XXIII zamieszczono podsumowanie modelu, który najlepiej opisuje zależność między poziomem aktywności TAFI a genotypem i grupą badaną.

Tabela XXIII. Zależność między aktywnością TAFI a genotypem *TAFI* -438G/A i tętniakiem aorty brzusznej.

Zmienna	Zmiana w średniej aktywności TAFI	CI95%		p-wartość
Allel G	+5.78	2.56	8.99	0.0005
Kontrola	+6.87	4.91	8.83	<0.0001
$F_{3; 514} = 19.6; p < 0.0001$ $R^2 = 0.097$				

Średnia aktywność rośnie wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie tak, że z każdym kolejnym allelem G średnia aktywność wzrasta o 5.78 punktów procentowych (Ryc. 18). Przedział ufności dla tej różnicy pokazuje, że w rzeczywistości może to być nawet

9 punktów procentowych i prawie na pewno nie mniej niż 2.56 punktów procentowych. Opisana zależność dotyczy w takim samym stopniu osób z chorych z TAB jak i osób kontrolnych ($p = 0.1573$). Tak więc różnica w aktywności TAFI między heterozygotą GA i homozygotą AA wynosi tyle samo, co między homozygotą GG a heterozygotą GA. Nie ma dowodów, aby opisana zależność nie była liniowa ($p = 0.1735$). Średnia aktywność TAFI jest większa w grupie kontrolnej średnio o 6.87 punktów procentowych w porównaniu z grupą chorych z TAB i dotyczy to w takim samym stopniu każdego z trzech genotypów. Nie ma dowodów, aby różnica między chorymi i kontrolą była inna w zależności od genotypu *TAFI* ($p = 0.1573$).



Ryc. 18. Średnie poziomy aktywności TAFI w zależności od genotypu *TAFI* -438G/A w obu badanych grupach.

4.3. Średnica aorty

Średnica brzuszego odcinka aorty w grupie kontrolnej oraz największa średnica tętniaka w grupie chorych zależą od czynników antropomorficznych, tzn. od wskaźnika masy ciała, BMI, i od powierzchni ciała ludzkiego, BSA. Dlatego w analizie zależności między rozważanymi polimorfizmami genetycznymi a średnicą aorty/tętniaka aorty posłużono się

wskaźnikiem wielkości aorty ASI, który wyraża średnicę naczynia [cm] w stosunku do powierzchni ciała [m²] oraz wskaźnikiem BMI_{index}, który wyraża średnicę [cm] w stosunku do BMI [kg/m²]. Oba wskaźniki są ze sobą wysoko dodatnio skorelowane (współczynnik korelacji liniowej między nimi wynosi $r = 0.87$), dlatego zostały poddane łącznej analizie jako zmienna dwuwymiarowa $d' = (ASI, BMI_{index}) \in \mathfrak{R}^2$, opisująca odpowiednio średnicę aorty w grupie kontrolnej i średnicę tętniaka aorty brzusznej w grupie chorych. Tak wyrażona średnica, d' , koreluje z kilkoma zmiennymi antropometrycznymi i klinicznymi, więc ewentualne zależności między d' a polimorfizmami genetycznymi były analizowane przy uwzględnieniu tych korelacji. Wyniki analizy d' w grupie chorych zamieszczono w Tabeli XXIV. Z kolei w Tabeli XXV zamieszczono wyniki analizy związku między średnicą aorty brzusznej, wyrażoną zmienną d' , a polimorfizmami genetycznymi w grupie kontrolnej.

Tabela XXIV. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty, d' , a czynnikami klinicznymi i genetycznymi u chorych z TAB. W tabeli podano procentową różnicę w średnicy dla danej składowej d' , tzn. dla ASI i dla BMI_{index}, w stosunku do grupy odniesienia.

Czynniki kliniczne i antropometryczne	ASI			BMI _{index}			λ_{Pillai}	p-wartość	
	Różnica %	CI95%		Różnica %	CI95%				
Mężczyzna	-8.60	-13.86	-3.02	1.20	-6.29	9.29	0.131	<0.0001	
Wiek	0.37	0.13	0.61	0.43	0.14	0.71	0.037	0.0073	
Palenie	4.43	-0.09	9.15	4.21	-1.14	9.86	0.017	0.1085	
Nadciśnienie	-4.36	-9.40	0.97	-7.67	-13.35	-1.63	0.036	0.0085	
Cukrzyca typu 2	-1.40	-6.79	4.30	-7.23	-13.26	-0.78	0.055	0.0007	
Choroby nerek	7.50	0.72	14.74	5.44	-2.25	13.73	0.027	0.0270	
Polimorfizmy	Różnica %	CI95%		Różnica %	CI95%		λ_{Pillai}	p-wartość	
FGB [*] -455G/A	GA	3.72	-6.47	15.01	5.32	-6.21	18.28	0.008	0.717
	GG	3.68	-6.42	14.88	6.30	-5.13	19.12		
PTPN22 1858 C/T	CT	-1.46	-6.40	3.75	-1.94	-7.54	4.01	0.023	0.190
	TT	-10.55	-18.78	-1.48	-14.75	-24.08	-4.26		
PTPN22 -1123 G/C	GC	5.39	-3.17	14.70	4.83	-6.28	17.26	0.027	0.131
	GG	4.24	-3.95	13.14	6.95	-3.97	19.12		
CTLA-4 49 A/G	GA	1.98	-2.29	6.43	4.23	-1.22	9.99	0.016	0.399
	GG	-1.95	-8.03	4.53	-0.87	-7.78	6.55		
TAFI -438 G/A	GA	9.29	-0.28	19.78	10.20	-1.99	23.90	0.010	0.629
	GG	7.14	-1.85	16.94	7.52	-4.06	20.50		

* Przykładowo: genotyp AA jako grupa odniesienia.

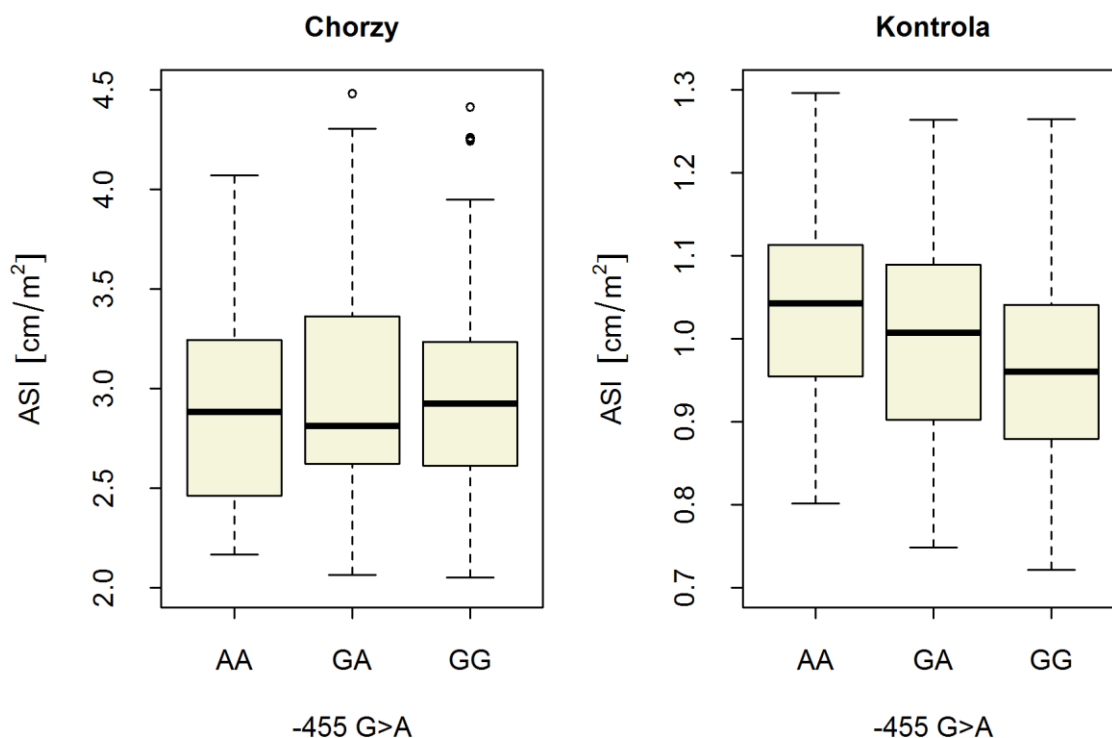
Tabela XXV. Zależność pomiędzy średnicą aorty, d' , a czynnikami klinicznymi i genetycznymi w grupie kontrolnej. W tabeli podano procentową różnicę w średnicy dla danej składowej d' , tzn. dla ASI i dla BMI_{index}, w stosunku do grupy odniesienia.

Czynniki kliniczne i antropometryczne	ASI			BMI _{index}			λ_{Pillai}	p-wartość	
	Różnica %	CI95%		Różnica %	CI95%				
Mężczyzna	2.12	-5.71	10.59	15.08	4.47	26.77	0.068	0.0002	
Palenie	3.39	-1.15	8.14	1.34	-4.03	7.01	0.012	0.2464	
Nadciśnienie	-0.13	-3.45	3.31	-3.20	-7.09	0.85	0.039	0.0085	
Cukrzyca typu 2	-2.22	-6.40	2.15	-6.81	-11.62	-1.73	0.041	0.0071	
Polimorfizmy	Różnica %	CI95%		Różnica %	CI95%		λ_{Pillai}	p-wartość	
<i>FGB</i> [*] -455G/A	GA	-4.51	-9.77	1.05	-4.19	-10.53	2.60	0.043	0.0368
	GG	-7.02	-11.93	-1.83	-8.47	-14.28	-2.26		
<i>PTPN22</i> 1858 C/T	CT	0.32	-3.43	4.21	-1.40	-5.84	3.24	0.014	0.495
	TT	-1.43	-11.89	10.27	-7.02	-18.81	6.50		
<i>PTPN22</i> -1123 G/C	GC	2.12	-4.95	9.71	7.60	-1.28	17.29	0.031	0.11
	GG	2.67	-4.23	10.06	9.56	0.78	19.12		
<i>CTLA-4</i> 49 A/G	GA	-0.36	-3.78	3.18	-2.94	-6.94	1.22	0.03	0.128
	GG	2.74	-2.05	7.76	2.96	-2.79	9.06		
<i>TAFI</i> -438 G/A	GA	2.05	-4.67	9.24	3.19	-4.99	12.08	0.005	0.894
	GG	2.97	-3.58	9.96	3.93	-4.02	12.55		

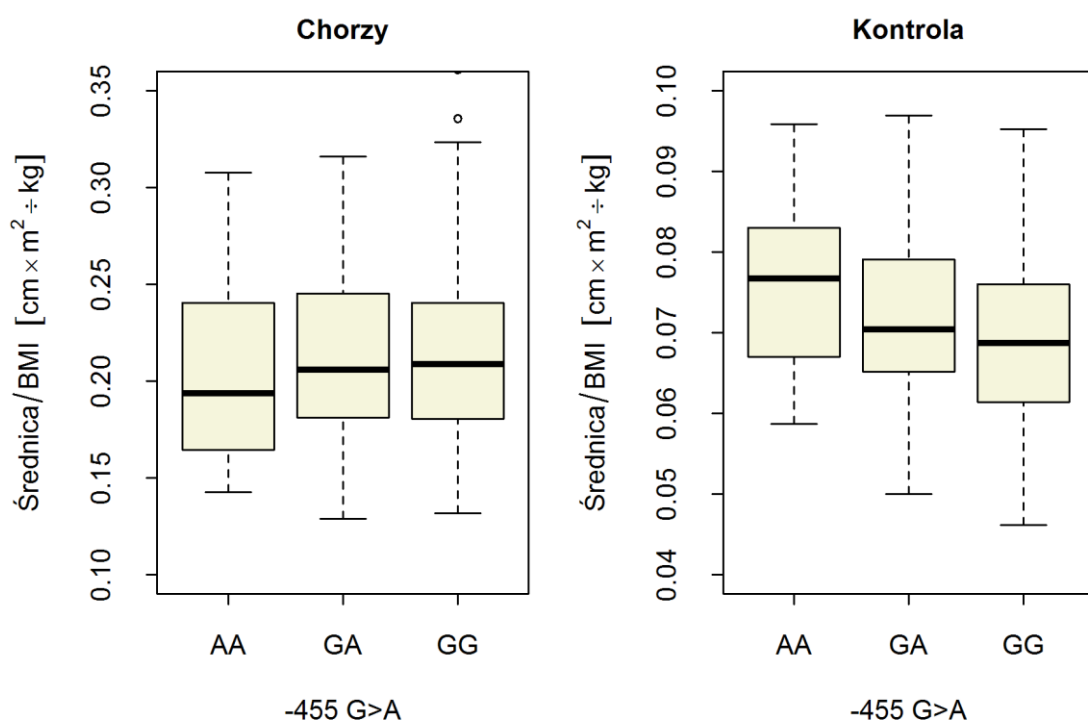
* Przykładowo: genotyp AA jako grupa odniesienia.

W analizie związków pomiędzy średnicą aorty osób z grupy kontrolnej a polimorfizmami genetycznymi uwzględniono, podobnie jak w przypadku grupy chorych, informację o paleniu tytoniu mimo, że nie ma przekonujących dowodów na związek palenia ze średnicą aorty prawidłowej ($\lambda_{\text{Pillai}} = 0.012$; $p = 0.2464$). Osoby chorujące na cukrzycę typu 2 mają mniejszą średnicę aorty prawidłowej niż osoby bez cukrzycy ($\lambda_{\text{Pillai}} = 0.041$; $p = 0.0071$). Związek ten ujawnia się w tym, że średnia wartość wskaźnika BMI_{index} w grupie osób z cukrzycą jest o około 7% niższa w porównaniu ze średnią wartością tego wskaźnika w grupie osób bez cukrzycy. Przedział ufności CI95% pokazuje jednak, że prawie na pewno nie jest to więcej niż 11%. Opisaną zależność prawdopodobnie należy tłumaczyć tym, że czynnikiem ryzyka w cukrzycy typu 2 jest wysokie BMI. Tak więc nawet jeśli sama średnica aorty nie ma związku z cukrzycą 2, to osoby z cukrzycą mają średnio wyższe wskaźniki masy ciała, BMI, a tym samym niższe wartości wskaźnika średnicy aorty, tj. BMI_{index}.

Analiza związku polimorfizmów genetycznych ze średnicą aorty prawidłowej wykazała, że polimorfizm -455G/A w genie *FGB* ma związek ze średnicą aorty ($\lambda_{Pillai}=0.043$; $p=0.0368$). Związek ten polega na tym, że wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie średnica aorty maleje. Z każdym allelem G średnia wartość wskaźników ASI i BMI_{index} maleje o około 4%. Średnia wartość ASI w grupie heterozygot GA jest o 4.51% niższa w porównaniu ze średnią wartością ASI w grupie homozygot AA, a średnia wartość BMI_{index} w grupie heterozygot jest niższa o 4.19%. Jednocześnie średnia wartość ASI w grupie homozygot GG jest o 7% niższa w porównaniu ze średnią wartością ASI w grupie homozygot AA, a średnia wartość BMI_{index} w grupie GG jest niższa o 8.47% w porównaniu ze średnią w grupie AA. Tak więc ludzie o genotypie AA w tym miejscu polimorficznym charakteryzują się wyższą średnicą aorty prawidłowej w porównaniu do osób o genotypach GA i GG. Tymczasem zależności między genotypem *FGB* -455G/C a średnicą tętniaka w grupie osób chorych nie stwierdzono. Porównanie tych zależności w grupie chorych i kontrolnej zilustrowano także na Rycinach 19 i 20.



Ryc. 19. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty w grupie chorych oraz średnicą tętnicy prawidłowej, wyrażonych jako ASI [cm/m²], a genotypem w polimorfizmie -455G/C genu *FGB*.



Ryc. 20. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty w grupie chorych oraz średnicą tętnicy prawidłowej, wyrażonych jako $BMI_{index} [cm \times m^2 / kg]$, a genotypem w polimorfizmie -455G/C genu *FGF*.

Nie znaleziono dowodów na to, aby pozostałe polimorfizmy miały związek ze średnicą tętniaka aorty w grupie chorych i ze średnicą aorty prawidłowej w grupie kontrolnej. Średnica tętniaka nie ma także związku z aktywnością produktu genu *TAFI*, aTAFI ($\lambda_{Pillai} = 0.017$; $p = 0.1046$), podobnie jak średnica aorty prawidłowej ($\lambda_{Pillai} = 0.014$; $p = 0.1941$).

4.4. Skrzeplina przyścienna

W Tabeli XXVI zamieszczono wyniki analizy zależności między polimorfizmami genetycznymi a grubością skrzepliny przyściennej w worku tętniaka. Z uwagi na to, że zmierzona grubość skrzepliny jest cechą *quasi* dyskretną, przyjmującą tylko kilkanaście różnych wartości, pacjentów podzielono na 6 rozłącznych grup. Do pierwszej grupy zaliczono $n = 47$ pacjentów, których grubość skrzepliny mieściła się w przedziale domkniętym [10-14] mm, do drugiego przedziału włączono $n = 48$ pacjentów, których grubość skrzepliny

mieściła się w przedziale [15-19] mm. Kolejnych pacjentów zaliczono do przedziałów: [20-20] (n = 52), [21-29] (n = 43), [30-35] (n = 44) oraz [36-46] (n=18). Na skutek wprowadzenia tego podziału, formalnie rozpatrywano grubość skrzepliny jako zmienną $k \in [11.5, 16, 20, 24.5, 32, 40]$. W nawiasie podano środki utworzonych przedziałów.

Tabela XXVI. Zależność pomiędzy grubością skrzepliny przyściennej w worku tętniaka a czynnikami klinicznymi i genetycznymi.

Czynniki kliniczne i antropometryczne		OR	CI95%		$\chi^2_{1ss=2}$	p-wartość
ASI		6.46	3.95	10.74	57.72	<0.0001
Mężczyzna		3.67	1.83	7.50	13.62	0.0002
Polimorfizmy genetyczne		OR	CI95%		$\chi^2_{1ss=2}$	p-wartość
<i>FGF3</i> * -455G/A	GA	1.33	0.53	3.38	0.40	0.8202
	GG	1.24	0.50	3.08		
<i>PTPN22</i> 1858 C/T	CT	0.63	0.34	1.16	2.98	0.2257
	TT	0.52	0.14	1.88		
<i>PTPN22</i> -1123 G/C	GC	1.38	0.51	3.77	5.93	0.052
	GG	2.29	0.89	5.99		
<i>CTLA-4</i> 49 A/G	GA	1.04	0.65	1.68	1.05	0.5915
	GG	0.72	0.35	1.48		
<i>TAFI</i> -438 G/A	GA	0.41	0.11	1.45	2.07	0.3552
	GG	0.41	0.12	1.40		

* Przykładowo: genotyp AA jako grupa odniesienia.

W tabeli podano szansę tego, że grubość skrzepliny będzie wynosiła nie mniej niż $k \in [11.5, 16, 20, 24.5, 32, 40]$ milimetrów, w stosunku do grupy odniesienia.

Grubość skrzepliny jest związana ze średnicą tętniaka, wyrażoną jako wskaźnik ASI. Jeżeli wartość wskaźnika ASI wzrośnie o 1 cm/m^2 , to szansa tego, że grubość skrzepliny będzie nie mniejsza niż k rośnie $\text{OR} = 6.46$ razy dla każdego $k \in [11.5, 16, 20, 24.5, 32, 40]$. Szansa tego, że osoba, której wskaźnik wielkości tętniaka aorty wynosi $\text{ASI} = 2.5$ będzie miała skrzeplinę o grubości nie mniejszej niż $k = 16$ jest $\text{OR} = 6.46$ razy większa niż szansa tego zdarzenia u osoby, której $\text{ASI} = 1.5$. Przeprowadzona analiza pozwala stwierdzić, że im większa średnica tętniaka (wyrażona jako zmienna ASI) tym grubsza skrzeplina przyścienna ($\chi^2_{1ss=2} = 57.72$; $p < 0.0001$).

Kolejną zmienną związaną z grubością skrzepliny jest płeć ($\chi^2_{1ss=2} = 13.62$; $p = 0.0002$). Grubość skrzepliny u mężczyzny jest większa niż u kobiety o tej samej średnicy tętniaka (wyrażonej jako ASI). Przykładowo, mężczyzna, którego wskaźnik $\text{ASI} = 1.5$ ma

OR = 3.67 razy więcej szans na to, by grubość jego skrzepliny była nie mniejsza od $k = 24.5$ mm niż kobieta, mająca taką samą wartość wskaźnika ASI. Przedział ufności dla tego ilorazu szans wynosi CI95% (1.83; 7.50), tak więc prawie na pewno szanse mężczyzny nie są mniejsze niż OR = 1.83 krotnie, a nie wykluczone, że są nawet OR = 7.5 razy większe niż szanse kobiety o tym samym wskaźniku ASI. Zaobserwowana zależność dotyczy każdej grubości skrzepliny $k \in [11.5, 16, 20, 24.5, 32, 40]$. Natomiast nie wykazano związku żadnego z wariantów polimorficznych badanych genów z grubością skrzepliny.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Początki koncepcji czynników ryzyka rozwoju chorób sięgają roku 1948, kiedy to z inicjatywy Narodowego Instytutu Chorób Serca (*National Heart Institute*, obecnie noszący nazwę Narodowego Instytutu Chorób Serca, Płuc i Układu Krwionośnego, *National Heart Lung and Blood Institute*) rozpoczęło się jedno z najbardziej uznawanych badań epidemiologicznych w dziejach medycyny – *Framingham Heart Study* (FHS). Pierwszym opisanym czynnikiem wpływającym na rozwój chorób serca było palenie papierosów. Istnienie jakościowego związku pomiędzy stężeniem cholesterolu w osoczu krwi, nadciśnieniem tętniczym i nieprawidłowościami w aktywności elektrycznej serca a wystąpieniem choroby niedokrwiennej serca opublikowano już w 1957 roku. Natomiast ilościową analizę tych parametrów przedstawiono 4 lata później. Wtedy też sformułowano pierwszą definicję czynnika ryzyka, zgodnie z którą jest to element, który wyprzedza ujawnienie się choroby i zwiększa prawdopodobieństwo jej rozwoju. Zaobserwowano również addytywny wpływ czynników ryzyka na rozwój chorób serca. Zidentyfikowane w FHS czynniki, wówczas przełomowe, dziś są zaliczane do tzw. klasycznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (Dawber i wsp., 1957, Kannel i wsp., 1961).

Tworząc charakterystykę grupy uczestniczącej w badaniu, przeprowadzono analizę wpływu czynników ryzyka na rozwój TAB. W ocenie uwzględniono parametry, zidentyfikowane w licznych badaniach epidemiologicznych jako czynniki ryzyka wystąpienia tętniaka, takie jak: płeć męska, palenie tytoniu, wiek powyżej 65 roku życia, otyłość ($BMI > 30$), nadciśnienie tętnicze i dyslipidemia. Uzyskane wyniki potwierdziły dobrze już udokumentowany w piśmiennictwie fakt współistnienia u chorych kilku czynników ryzyka oraz to, że skumulowany wpływ tych czynników zwiększa ryzyko zapadalności na tętniaka. Porównując grupę badaną i kontrolną zaobserwowano, że szansa uniknięcia TAB u osoby, która ma co najwyżej k czynników ryzyka jest $OR = 4.03$ razy większa niż szansa osoby, która ma więcej niż k czynników. Efekt ten jest silny. Obie grupy wyraźnie różnią się liczbą czynników ryzyka. Przedział ufności dla tego ilorazu, wynoszący $CI_{95\%}$ (2.89; 5.59) oznacza, że prawie na pewno szansa ta nie jest mniejsza niż 2.89 – krotnie. Ryzyko powstania tętniaka u osoby, która ma więcej niż k czynników ryzyka jest $OR = 4$ razy większe w porównaniu z osobą, która ma nie więcej niż k różnych czynników ryzyka. Zaobserwowana

prawidłowość odnosi się do każdej liczby czynników ryzyka $k \in [0,5]$. (Collin i wsp., 1988, Forsdahl i wsp. 2009, Simoni i wsp., 1995).

Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że obok czynników środowiskowych, również czynniki genetyczne odgrywają rolę w patogenezie tętniaka aorty brzusznej. Wyniki badań epidemiologicznych nie pozostawiają co do tego wątpliwości. Z uwagi na złożoność obserwowanych fenotypów tętniaka, wpływ genów na zapadalność na TAB pochodzi najprawdopodobniej zarówno z sumowania się wpływów alleli lub *loci* jak i z interakcji pomiędzy nimi (wpływ addytywny i nieaddytywny). Predyspozycja do rozwoju tej choroby jest także zapewne wynikiem interakcji genotypu z czynnikami środowiskowymi. Nawet jeżeli w przyszłości okaże się, że na rozwój tego schorzenia wpływają głównie ewolucyjnie młode, rzadkie geny, to stale dokonujący się postęp technologiczny i metodologiczny w epidemiologii molekularnej pozwala sądzić, że możliwa będzie ich identyfikacja. Jej wynikiem z kolei może być nie tylko poznanie patomechanizmu choroby i wyjaśnienie przyczyn klinicznej różnorodności obserwowanych fenotypów TAB, ale także usprawnienie wczesnej diagnostyki i zmniejszenie przedwczesnej umieralności, związane z szybszym przeprowadzaniem korekty chirurgicznej u pacjentów będących w lepszym stanie ogólnym. Może także stworzyć szansę na opracowanie strategii zindywidualizowanej terapii spowalniającej degradację ściany aorty i wdrożenie poradnictwa genetycznego dla rodzin obciążonych ryzykiem zachorowania na TAB (Grundman, 2011, Kuivaniemi i wsp., 2012).

TAB jest chorobą występującą z narastającą częstością wraz ze zwiększającym się wiekiem pacjentów. Z upływem lat nie dość, że kumulują się skutki zaburzeń szlaków sygnalizacyjnych i uszkodzeń komórek, to dodatkowo obniża się zdolność obrony systemu immunologicznego i skuteczność mechanizmów naprawczych, co skutkuje zwiększoną podatnością całego organizmu na choroby. Niekiedy dochodzi także do reakcji odpornościowej, spowodowanej zaburzeniem tolerancji immunologicznej na własne antygeny. Autoprzeciwciała są najczęściej spotykane u osób starszych. Jednocześnie chorzy z TAB są często poddawani terapii farmakologicznej ze wskazań kardiologicznych. W badanej grupie częstość ta wyniosła blisko 70%. Z doniesień literaturowych wiadomo, że przyjmowanie niektórych leków, takich jak stosowany w komorowych i nadkomorowych zaburzeniach rytmu serca prokainamid, przeciwnadciśnieniowa hydralazyna, kaptopryl czy metyldopa, antagoniści kanału wapniowego bądź diuretyki tiazydowe, może wpływać na inicjowanie procesów autoimmunizacyjnych i prowokować powstawanie chorób tkanki łącznej. Jedną z lepiej przebadanych i opisanych pod tym kątem chorób jest toczeń

rumieniowaty indukowany lekami, a lista leków mogących wywoływać jego wystąpienie wynosi ponad 90 pozycji i stale się wydłuża. Dwa spośród wybranych do badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej genów-kandydatów, *PTPN22* i *CTLA4*, biorą udział w mechanizmach regulujących odpowiedź immunologiczną u ludzi. W licznych publikacjach opisano związek ich wariantów polimorficznych z wystąpieniem chorób autoimmunizacyjnych w różnych populacjach (Gregersen i wsp., 2006, Pretel i wsp., 2014, Romo-Tena i wsp., 2013).

W przeprowadzonym badaniu polimorfizmu 1858C/T genu *PTPN22*, wśród osób z TAB stwierdzono niedobór heterozygot. Może to oznaczać, że omawiany polimorfizm ma związek z zapadalnością na tętniaka aorty brzusznej. Związek ten mógłby polegać na tym, że osoba, która jest heterozygotą CT ma o około 37% mniej szans na zachorowanie w porównaniu do homozygoty CC (OR = 0.63). Przedział ufności dla tego ilorazu, wynoszący CI95% (0.41; 0.98) wskazuje, że heterozygota może mieć nawet ponad dwukrotnie mniej szans na zachorowanie (OR = 0.41) w porównaniu z homozygotą CC. Jednak z powodu bardzo małych liczebności homozygot TT w obu grupach wnioskowanie o szansach zachorowania osób o tym genotypie jest ograniczone a uzyskane wyniki niepewne. Jeżeli istnieje zależność między polimorfizmem *PTPN22* 1858C/T a zachorowaniem na tętniaka aorty brzusznej, to najprawdopodobniej polega ona na tym, że heterozygoty CT mają niższą szansę na zachorowanie w porównaniu do obu homozygot, które z kolei nie różnią się od siebie. Również w przypadku polimorfizmu -1123G/C genu *PTPN22* stwierdzono niedobór heterozygot w grupie osób z TAB. Ponieważ obydwa opisywane polimorfizmy dotyczą tego samego genu, prawdopodobnie znajdują się w nierównowadze gametycznej ze sobą. Stwierdzono, że szansa zachorowania na tętniaka u osoby będącej heterozygotą GC jest o około 9% niższa w porównaniu z szansą na zachorowanie homozygoty GG (OR = 0.81). Przedział ufności dla tego ilorazu pokazuje, że szansa ta może być nawet dwukrotnie niższa (OR = 0.56). Z przeprowadzonej analizy wynika, że jeśli istnieje zależność między polimorfizmem *PTPN22* -1123G/C a zapadalnością na TAB, to najprawdopodobniej polega ona na tym, że heterozygoty GC mają niższą szansę na zachorowanie w porównaniu do homozygot, które z kolei nie różnią się od siebie. Nie można jednak stwierdzić istnienia takiej zależności, nie ryzykując pomyłki z prawdopodobieństwem większym niż żądane $\alpha = 0.05$ ($\chi^2_{1ss=1} = 1.43$; $p = 0.2314$). Nawet jeżeli w przypadku tego polimorfizmu opisywana zależność istnieje, to jest to i tak efekt bardzo słaby (OR = 0.81). Najprawdopodobniej jednak różnice, jakie uzyskano w rozkładach genotypów między grupą chorych i kontrolną, wynikają z tego,

że locus *PTPN22* -1123G/C jest w niezrównoważeniu gametycznym (*linkage disequilibrium*, LD) z locus *PTPN22* 1858C/T. Obserwowane różnice mogą być także wynikiem heterozji na poziomie molekularnym, charakteryzującej się występowaniem istotnie różnego wpływu heterozygot na fenotyp w porównaniu z homozygotami. W dostępnej literaturze nie odnaleziono badań zależności pomiędzy omawianymi SNPs a występowaniem TAB. Natomiast sama dystrybucja alleli, obserwowana w badanej populacji, nie odbiega od opublikowanych przez inne zespoły wyników genotypowań. Jak wynika z piśmiennictwa, częstość występowania allelu T w miejscu polimorficznym 1858C/T genu *PTPN22* wynosi w polskiej populacji około 12.6%. Wynik ten znajduje odzwierciedlenie w rezultatach badań jakie uzyskano, gdzie częstości tego allelu wyniosły 11.7% w grupie osób z TAB i 13.8% w grupie kontrolnej. Z kolei allel -1123C *PTPN22* występował z częstością 23.5% w grupie 236 osób zrekrutowanych wśród pacjentów Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, bez klinicznych oznak i z ujemnym wywiadem w kierunku występowania chorób autoimmunizacyjnych. Podczas gdy w grupie osób z TAB i kontrolnej allel C obserwowano z częstościami 22.4% i 23.6% czyli także bardzo podobnie (Burn i wsp., 2011, Comings i MacMurray, 2000, Fichna i wsp., 2010).

Analizując rozkład genotypów, jaki uzyskano dla polimorfizmu 49A/G genu *CTLA-4*, stwierdzono, że szansa zachorowania na tętniaka u osoby będącej heterozygotą AG jest 1.3 razy niższa w porównaniu z szansą osoby będącej homozygotą AA (OR = 0.76). Taki sam efekt zaobserwowano w przypadku homozygoty GG (OR = 0.78). Jeśli zatem istnieje zależność między zapadalnością na TAB a rozważanym polimorfizmem, to najprawdopodobniej polega ona na tym, że homozygota AA ma o około 30% więcej szans na rozwinięcie tętniaka w porównaniu do heterozygoty. Nie ma jednak wystarczających dowodów na poparcie takiego twierdzenia. Dla wyjaśnienia wątpliwości konieczne byłoby przeprowadzenie badania w grupach o liczebności zapewniającej moc statystyczną uzyskanego wyniku. Jak już wspomniano, mutacje i polimorfizmy genów *PTPN22* i *CTLA-4* są powszechnie badane i opisywane jako predysponujące do wystąpienia chorób autoimmunizacyjnych. Z drugiej strony liczne doniesienia dotyczą potencjalnego związku TAB z genami zaangażowanymi w regulację reakcji autoimmunologicznej. Ohara i wsp. oceniali wpływ chorób autoimmunizacyjnych na wystąpienie TAB w grupie 429 pacjentów leczonych chirurgicznie. Tkanki pochodzące od chorych ze współistniejącą chorobą autoimmunizacyjną, uzyskane śródoperacyjnie, wykazywały większy stopień degradacji blaszki elastycznej wewnętrznej aorty w porównaniu z materiałem pochodzącym od grupy

kontrolnej bez tych schorzeń. Nie sposób jednak stwierdzić czy był to wynik wpływu samych tylko zaburzeń układu immunologicznego czy też może wieloletniego oddziaływania leków należących do grupy kortykosteroidów, stosowanych u tych pacjentów a powodujących degenerację tkanki łącznej (Ohara i wsp., 2000). Najbardziej prawdopodobny wydaje się jednak łączny skutek działania farmakoterapii i nieprawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, być może także wraz z innymi czynnikami ryzyka. Kolejny zespół badaczy, oceniając związek występowania TAB z chorobami autoimmunizacyjnymi, wyodrębnił spośród 520 przypadków podgrupę 31 tętniaków zapalnych. Okazało się, że u wszystkich spośród 6 pacjentów obciążonych chorobą autoimmunizacyjną rozwinął się właśnie tętniak zapalny (Haug i wsp. 2003). Wyniki uzyskane w badaniach własnych nie wskazują na zależność pomiędzy oznaczonymi polimorfizmami genów *PTPN22* i *CTLA-4* a wystąpieniem TAB. Sugerowałoby to, że w zapadalności na tę chorobę rolę odgrywa czynnik związany z reakcją zapalną ale nie autoimmunologiczną. Analizując uzyskane wyniki trzeba jednak uwzględnić fakt, że zastosowane kryteria włączenia i wyłączenia uczestników badania wyeliminowały osoby, u których występowały choroby autoimmunizacyjne. Dlatego jeżeli występuje zależność pomiędzy tymi chorobami, to nie została ona zaobserwowana. W zgromadzonym materiale nie zdecydowano się na przeprowadzanie takiej analizy, ponieważ liczebności osób z chorobami autoimmunizacyjnymi były zbyt małe, żeby możliwe było uzyskanie wyniku na satysfakcjonującym poziomie prawdopodobieństwa. W związku z czym uznano, że zastosowanie wspomnianych kryteriów wyłączenia z badania zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej nie powinno wpłynąć w sposób istotny na ostateczny wynik oznaczeń. Interesujące i zasadne wydaje się jednak kontynuowanie badań w większej grupie chorych.

Procesowi degradacji aorty i poszerzaniu się zwyrodniałego naczynia towarzyszy toczący się proces zapalny, szeroko opisywany w literaturze. Proces zapalny z kolei jest ściśle powiązany z procesem krzepnięcia krwi. W czasie reakcji zapalnej aktywowane są zarówno czynniki pochodzące z komórek nacieku zapalnego ale także należące do układu fibrynolizy i krzepnięcia. Ze względu na regulatorowe funkcje, pełnione zarówno w procesie krzepnięcia jak i zapalenia, przedmiotem intensywnych badań jest obecnie inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI). Czynnikiem ten jest enzymem proteolitycznym, ograniczającym powstawanie aktywnej plazminy w procesie fibrynolizy. Substratem dla niego może być nie tylko fibryna ale także przeciwzapalne peptydy (bradykinina, anafilatoksyny C3a i C5a, osteopontyna, annexyna II, chemerin). Szczególną uwagę zespołów badawczych przykuwają

genetyczne uwarunkowania aktywności inhibitora TAFI, ponieważ polimorfizmy kodującego go genu *TAFI*, mogą wpływać bezpośrednio na jego stężenie i aktywność we krwi. Przeprowadzone dotychczas w różnych ośrodkach biomedycznych badania wyraźnie wskazują na związek trzech funkcjonalnych polimorfizmów *TAFI* [1040C/T; 505G/A; -438G/A] z wystąpieniem chorób sercowo-naczyniowych, szczególnie tych o podłożu zakrzepowym (Du i wsp., 2009, Henry i wsp., 2001; Juhan-Vague i wsp. 2002, Myles i wsp. 2003, van Tilburg i wsp., 2000).

Również zmiany w stężeniu i aktywności TAFI w osoczu obserwowane są w różnych jednostkach chorobowych, zarówno o podłożu zapalnym jak i zakrzepowym. Spadek stężenia TAFI został opisany w grupie pacjentów z marskością wątroby, a także u osób z nieswoistym zapaleniem jelit. Niska aktywność TAFI powiązana jest też z patogenezą uszkodzenia organów w rozsianym krzepnięciu śródnaczyniowym, w przebiegu sepsy oraz w chorobie Behçeta, w przebiegu której obserwuje się układowe zapalenie małych i dużych naczyń. Także wyniki wcześniejszych badań własnych, dotyczących oceny aktywności TAFI w osoczu pacjentów z TAB, sugerują udział tego czynnika w procesach koagulacyjnych towarzyszących rozwojowi tętniaka. Nie można wykluczyć, że wyraźny spadek aktywności inhibitora TAFI, zaobserwowany u tych chorych, może wynikać ze zmian polimorficznych genu *TAFI*. Wobec powyższych danych, podjęcie badań w kierunku identyfikacji zmian pojedynczych nukleotydów w sekwencji *TAFI* w grupie osób z TAB uznano za szczególnie uzasadnione. Dodatkowo za tym kierunkiem badań przemawiał fakt, iż niedobór inhibitora fibrynolizy TAFI sprzyja powstawaniu TAB w modelowym organizmie myszy, a efekt ten jest bezpośrednio powiązany z nieprawidłowościami fibrynolizy (Donmez i wsp., 2010, Dubis i wsp. 2014, Golledge i wsp., 2007, Gresele i wsp., 2008, Saibeni i wsp., 2004, Zeerleder i wsp., 2006).

Wyniki przeprowadzonych analiz asocjacji wskazują no to, że jeżeli związek SNP -438G/A *TAFI* z występowaniem TAB istnieje, to jest on bardzo słaby i najprawdopodobniej polega na tym, że szansa zachorowania homozygoty AA jest o połowę niższa niż szansa zachorowania osób będących nosicielami dwóch pozostałych genotypów. Efektu tego nie stwierdzono jednak na wymaganym poziomie ufności, a ponadto hipoteza ta nie znajduje wsparcia w wynikach weryfikacji zgodności rozkładów genotypów w obu grupach z rozkładami oczekiwanymi z rozkładu Hardy'ego-Weinberga. Rozpatrując ewentualny związek rozważanego miejsca polimorficznego z występowaniem tętniaka, analizowano także inny model genetyczny tej zależności. W modelu addytywnym założono,

że efekt fenotypowy heterozygoty będzie pośredni efektem fenotypowym dwóch homozygot. Oczekiwano zatem, że szansa zachorowania na tętniaka u homozygoty AA będzie o jedną trzecią niższa w porównaniu z szansą zachorowania homozygoty GG (OR = 0.775). Obserwowany iloraz szans dla homozygoty AA jest jednak wyraźnie niższy i wynosi OR = 0.54. Rozważane efekty są ponadto zbyt słabe, przy danych liczebnościach prób.

W celu wykazania potencjalnych zależności pomiędzy zmianą genetyczną -438G/A genu *TAFI* a aktywnością inhibitora TAFI w osoczu chorych z TAB, obok genotypowania miejsca polimorficznego -438G/A, przeprowadzono także ocenę aktywności tego czynnika. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniej opublikowane rezultaty badania pilotażowego, stwierdzono bowiem istotny spadek aktywności czynnika TAFI w grupie osób z TAB. Wykazano, że średnia aktywność TAFI jest większa w grupie kontrolnej o 6.87 punktów procentowych w porównaniu z grupą chorych z TAB. Otrzymany wynik, świadczący o obniżonej aktywności czynnika regulującego zarówno procesy koagulacyjne jak i zapalne, wskazuje na nieprawidłowości w molekularnych mechanizmach kontrolujących obydwie te procesy we krwi chorych z TAB. W literaturze zagadnienie to jest często poruszane ze względu na powikłania związane z nadkrzepliwością krwi u osób kwalifikowanych do trudnych zabiegów chirurgicznych. Ponieważ TAB rozwija się głównie u osób starszych, z samej racji wieku są one zwykle w grupie podwyższonego ryzyka wystąpienia powikłań okołoperacyjnych. Jak wynika z danych literaturowych, TAFI obniża potencjał fibrynolityczny osocza i jednocześnie wzmacnia jego aktywność prozakrzepową, uczestnicząc tym samym w procesie stabilizacji powstającego skrzepu. Dlatego zmiany w aktywności tego czynnika mogą pogłębiać dysfunkcję hemostazy i przyczyniać się do wystąpienia powikłań z tym związanych. Prawidłowe funkcjonowanie fibrynolizy i układu krzepnięcia oraz sprawne działanie mechanizmów ich kontroli zabezpiecza organizm przed stanami patologicznymi takimi jak skaza krwotoczna lub zakrzepica. Układ fibrynolityczny, którego elementem składowym jest TAFI, odpowiada za rozpuszczenie śródnaczyniowych złogów fibryny i utrzymanie drożności łożyska naczyniowego. Przy sprawnie funkcjonujących mechanizmach regulacji fibrynolizy, intensywne formowanie się skrzepu wewnątrznaczyniowego nie jest możliwe. W osoczu pacjentów z TAB dominuje tendencja prozakrzepowa, a w miejscu zmian zwyrodnieniowych aorty często pojawia się skrzeplina przyścienna, charakteryzująca się zwykle mniejszymi porami i bardziej gęstą strukturą. Jej grubość koreluje ze średnicą tętniaka. Towarzysząca tętniakowi skrzeplina przyścienna jest biologicznie aktywna i zdolna do wylapywania leukocytów, absorpcji krążących składników

osocza i agregatów płytkowych. Niedobór aktywności TAFI w osoczu chorych z TAB może świadczyć o tym, że czynnik ten aktywnie uczestniczy w procesie powstawania i modulacji skrzepu w świetle nadmiernie poszerzonej aorty. Prawdopodobnie ulega on wyczerpaniu, ponieważ jest aktywnie zaangażowany w tworzenie skrzepu, który pozostając w stałym kontakcie z krążącą krwią poddawany jest ciągłej przebudowie (Bajzar, 2000, Bajzar i wsp., 2004, Kazi i wsp., 2003, Mosnier i wsp., 2003).

Następnie sprawdzono czy istnieje zależność między aktywnością białka TAFI a genotypem *TAFI* -438G/A i tętniakiem aorty brzusznej. Stwierdzono, że aktywność TAFI rośnie wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie, tak samo w grupie chorych i kontrolnej. Z każdym kolejnym allelem G średnia aktywność wzrasta o 5.78 punktów procentowych (CI95% (2.56;8.99), $p = 0.0005$). Jednocześnie w grupie kontrolnej aktywność TAFI jest zawsze większa niż w grupie chorych, bez względu na genotyp *TAFI* -438G/A, średnio o 6.87 punktów procentowych (CI95% (4.91;8.83), $p < 0.0001$). W celu głębszego przeanalizowania tych zależności sformułowano i testowano cztery hipotezy, dla których otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli XXVII. Znakami +, 0, – oznaczono grupy jednorodne (nieodróżnialne w danej hipotezie). Dodatkowo grupy jednorodne oznaczano kolorami.

Tabela XXVII. Hipotezy różnie opisujące zależność pomiędzy aktywnością TAFI a chorobą i genotypem *TAFI* -438G/A.

Hipoteza	Chorzy			Kontrola			$r_{alerting}$	$r_{effect\ size}$	$F_{contrast}$ I _{ss=1;512}	p-wartość
	AA	GA	GG	AA	GA	GG				
H1	+	+	+	–	–	–	0.616	0.238	11.98	0.0006
H2	–	0	+	–	0	+	0.723	0.279	12.37	0.0005
H3	–	0	+	+	0	–	0.249	0.096	1.47	0.2262
H4*	–	–	–	–	+	+++	0.923	0.356	48.97	<0.00001

* Hipoteza sformułowana *a posteriori*.

Formułując pierwszą hipotezę, H1, założono, że średnia aktywność TAFI zależy tylko od grupy badanej, tzn. różnice występują tylko między chorymi i grupą kontrolną a genotyp *TAFI* -438G/A nie ma znaczenia. Porównywano zatem dwie grupy: chorych {AA, GA, GG} traktowanych łącznie, oraz grupę kontrolną {AA, GA, GG} także traktowaną łącznie, bez rozróżniania genotypów. Analiza pokazała, że średnia aktywność w grupie chorych jest inna

niż w grupie kontrolnej ($F_{contrast} = 11.98$; $p = 0.0006$). Współczynnik $r_{alerting}$, określający zgodność średnich grupowych z testowaną hipotezą, przyjmuje wartość $r_{alerting} = 0.616$, co świadczy o tym, że średnie grupowe w umiarkowanym stopniu wspierają omawianą hipotezę. Po uwzględnieniu dwóch dodatkowych źródeł zmienności, tj. zróżnicowania obserwacji wewnątrz grup oraz różnic między średnimi grupowymi, których nie da się wytłumaczyć testowaną hipotezą, stwierdzono, że współczynnik $r_{effect\ size} = 0.238$.

Hipotezę drugą, H2, oparto na założeniu, że wpływ na średnią aktywność TAFI ma tylko genotyp w miejscu polimorficznym *TAFI* -438G/A, a różnic między chorymi i grupą kontrolną nie ma. Wyodrębniono zatem 3 oddzielne grupy, oznaczone w Tabeli XXVII symbolami +, 0, -. Dla tak postawionej hipotezy uzyskano $r_{alerting} = 0.723$, zatem średnie grupowe dobrze pasują do testowanej hipotezy. Po uwzględnieniu dwóch dodatkowych źródeł zmienności otrzymano $r_{effect\ size} = 0.279$, który pokazuje, że dane eksperymentalne trochę lepiej wspierają hipotezę H2 niż omawianą wyżej H1. Na tej podstawie stwierdzono, że bez wątplenia genotyp w miejscu polimorficznym *TAFI* -438G/A ma związek z aktywnością produktu tego genu ($F_{contrast} = 12.37$; $p = 0.0005$).

Trzecia testowana hipoteza, H3, wypływa z założenia, że zarówno genotyp *TAFI* -438G/A jak i choroba mają związek z poziomem aktywności TAFI ale związek genotypu nie jest taki sam w grupie chorych i kontrolnej a różnice między chorymi i kontrolą zależą od genotypu. Założono tu zatem istnienie interakcji między genotypem a chorobą. Wyniki przedstawione w Tabeli XXVII pokazują, że hipoteza ta nie znajduje poparcia w danych eksperymentalnych. Współczynnik korelacji między średnimi grupowymi a ujętymi w hipotezie zależnościami jest niski i wynosi $r_{alerting} = 0.249$, a po uwzględnieniu różnic między średnimi grupowymi, których omawiana hipoteza nie tłumaczy jak i różnic między obserwacjami w obrębie poszczególnych grup, współczynnik $r_{effect\ size} = 0.096$. Wartość ta jest bardzo mała i oznacza, że hipoteza H3 nie znajduje potwierdzenia w wynikach pomiarów aktywności TAFI ($F_{contrast} = 1.47$; $p = 0.2262$).

Hipotezy H1, H2 i H3 zostały sformułowane *a priori*, gdyż są tak oczywiste, że zamiar ich testowania został powzięty zanim otrzymano wyniki pomiarów aktywności TAFI. Inaczej było w przypadku hipotezy czwartej, H4, która wywodzi się z uzyskanych wyników. Sformułowano ją na podstawie różnic między przeciętnym poziomem aktywności TAFI obserwowanych w zależności od genotypu i grupy badanej. Hipoteza ta zakłada, że średnia aktywność TAFI spada wraz ze wzrostem liczby alleli A (czyli rośnie wraz ze wzrostem

liczby alleli G) a także, że w grupie chorych aktywność TAFI nie zależy od genotypu -438G/A *TAFI* i przyjmuje średnią wartość taką, jak średnia aktywność TAFI u osób z grupy kontrolnej o genotypie AA. Innymi słowy, wszyscy chorzy mają średnią aktywność TAFI taką samą, bez względu na genotyp -438G/A i taką samą jak średnia aktywność u osób AA w grupie kontrolnej. Wyniki testowania H4, przedstawione w Tabeli XXVII, ujawniają, że jest to hipoteza najlepiej pasująca do danych eksperymentalnych. Współczynnik $r_{alerting} = 0.923$ świadczy o bardzo wysokiej zgodności średnich grupowych z założeniami tej hipotezy, a po uwzględnieniu różnic między grupami, których nie da się wytłumaczyć w jej ramach oraz różnic między aktywnością w obrębie trzech wyróżnionych grup uzyskano $r_{effect\ size} = 0.356$. Jest to wartość najwyższa spośród czterech testowanych hipotez i pokazuje, że H4 znajduje najlepsze potwierdzenie w danych eksperymentalnych ($F_{contrast} = 48.97$; $p < 0.0001$). Należy jednak zastrzec, że dobre dopasowanie hipotezy do danych może wynikać nie z tego, że opisywana w H4 zależność rzeczywiście występuje ale z tego, że hipoteza ta została sformułowana *a posteriori*, czyli na podstawie otrzymanych danych.

W H4 zakładano zarówno efekt genotypu jak i efekt choroby w związku z aktywnością produktu TAFI, podobnie jak w hipotezach H1 i H2. Jednak H4 jest od nich bardziej skomplikowana, gdyż zakłada, że efekt genotypu nie jest taki sam w grupie chorych i kontrolnej, a jeśli obie grupy różnią się aktywnością to różnice te nie są takie same w przypadku trzech genotypów *TAFI* -438G/A. Wobec powyższego uzasadnione wydaje się przyjęcie, że zależność między poziomem aktywności TAFI a genotypem -438G/A i chorobą lepiej opisano hipotezami H1 i H2 niż, wymagającą więcej założeń, hipotezą H4.

Średnia aktywność TAFI rośnie wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie. Homozygoty GG mają więc wyższą średnią aktywność TAFI aniżeli homozygoty AA w obu analizowanych grupach. Jak wynika z piśmiennictwa, polimorfizm ten podobnie jak dwa pozostałe 1040C/T i 505A/A jest powiązany ze stężeniem białka TAFI we krwi. W przypadku polimorfizmu -438G/A, który jest przedmiotem badań rozprawy, wyższe stężenie antygeny TAFI obserwuje się właśnie u homozygot GG, co jest zgodne z prezentowanymi wynikami, dotyczącymi aktywności TAFI w badanych grupach. Analiza uzyskanych wyników genotypowania wariantu -438G/A w grupie badanej i kontrolnej nie wykazała zamian w częstości występowania poszczególnych alleli, które w świetle literatury warunkują zmianę stężenia antygeny TAFI we krwi. Na tej podstawie można wnioskować, że obserwowany spadek aktywności tego czynnika nie wynika ze spadku stężenia antygeny TAFI uwarunkowanego genotypem -438G/A *TAFI*. Wiadomym jest, że wraz ze spadkiem stężenia

danego czynnika we krwi należy się spodziewać spadku jego aktywności. Obecność antygeny nie jest jednak równoznaczna z obecnością aktywnego białka we krwi. W krwioobiegu TAFI może występować jako nieaktywny zymogen, miejscowo uaktywniany proteolitycznie trombiną, w czasie nasilenia się procesów koagulacyjnych. Oznaczenia poziomu stężenia obejmują więc zarówno nieaktywną formę TAFI jak i aktywny inhibitor. Spadek aktywności jaki obserwowano w grupie chorych z TAB nie musi zatem wiązać się ze spadkiem stężenia TAFI we krwi.

Dotychczas przeprowadzone w innych ośrodkach badania także wykluczyły związek dwóch funkcjonalnych polimorfizmów, 1040C/T i 505A/A, genu *TAFI* z wystąpieniem TAB. Wyniki genotypowania przedstawione w niniejszej pracy wskazują, iż trzeci spośród znanych polimorfizmów funkcjonalnych –438G/A również nie wpływa na powstawanie TAB. Nie można jednak wykluczyć istnienia innych polimorfizmów genu *TAFI*, które mogą mieć związek z zaobserwowanym w grupie chorych spadkiem aktywności TAFI i zapadalnością na TAB. Wiedza na temat wzajemnych powiązań procesu zapalenia, krzepnięcia i fibrynolizy jest niepełna i wymaga intensywnych prac, które pozwolą zrozumieć molekularne mechanizmy ich kontroli. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie badań uzupełniających w kierunku poznania genetycznych podstaw aktywności inhibitora TAFI zarówno na poziomie biochemicznym, jak i genetycznym. Istotne jest uzyskanie informacji na temat stężenia antygeny TAFI w obu analizowanych grupach a następnie określenie zależności poziomu stężenia tego czynnika od innych, nie opisanych do tej pory czynników genetycznych.

Kolejnym ogniwem, łączącym proces hemostazy i zapalenia, jest fibrynogen. Początki badań nad powiązaniem tego czynnika z chorobami sercowo-naczyniowymi sięgają połowy ubiegłego stulecia, a z upływem czasu związek ten został potwierdzony w licznych badaniach populacyjnych. Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez zespół Fibrynogen Studies Collaboration wykazały, że wzrost stężenia fibrynogenu w osoczu o 1 g/l powoduje zwiększenie ryzyka wystąpienia choroby sercowo-naczyniowej 2.42 razy przy przedziale ufności CI95% (2.24; 2.60). Jak opisano w literaturze, na wzrost stężenia fibrynogenu w osoczu wpływa tocząca się reakcja zapalna, infekcja oraz palenie papierosów. Przedmiotem licznych badań był również wpływ czynników genetycznych na profil jego stężenia. Szczególnie dokładnie przebadany został gen *FGB*, kodujący łańcuch β fibrynogenu. Ponieważ produkcja tego łańcucha jest czynnikiem limitującym syntezę fibrynogenu, oczywistym jest, że zaburzenia w regulacji kodującego go genu mogą wpływać na stężenie

fibrynogenu. Jak wynika z danych literaturowych, genotyp AA w miejscu polimorficznym -455G/A w regionie promotorowym genu *FGB* związany jest z około 10% wzrostem wartości stężenia fibrynogenu w porównaniu do homozygot GG (Anderson i wsp., 2013, Danesh i wsp., 2005, Standeven i wsp., 2003).

Porównanie częstości genotypów, jakie zaobserwowano w grupie chorych i kontrolnej, nie dało podstaw do twierdzenia, że polimorfizm *FGB* -455G/A ma związek z występowaniem tętniaka aorty brzusznej ($\chi^2_{1ss=1} = 0.026$; $p = 0.8710$). Szansa zachorowania heterozygoty GA jest OR = 1.23 razy większa niż szansa zachorowania homozygoty GG. Przedział ufności CI95% (0.85; 1.78) dla tego ilorazu pokazuje jednak, że nie można wykluczyć, nie ryzykując pomyłki z prawdopodobieństwem większym niż dopuszczalne, że w rzeczywistości heterozygota ma OR = 1.17 razy mniej szans na powstanie TAB w porównaniu z homozygotą GG. Podobnie zaobserwowano, że szansa zachorowania homozygoty AA jest o 32% niższa w porównaniu z szansą zachorowania homozygoty GG (OR = 0.68) ale przedział ufności CI95%(0.35; 1.31) wskazuje, że nie można wykluczyć, iż w rzeczywistości taka zależność w ogóle nie występuje. Analizując obecnie dostępną literaturę stwierdzono, że badania zależności pomiędzy tym wariantem polimorficznym a występowaniem TAB przeprowadzone zostały tylko przez jeden inny ośrodek, również w populacji polskiej. Badania te obejmowały 134 osoby z TAB i 136 osób z grupy kontrolnej i wykazały, że osoby z genotypem GA mają OR = 3.01 razy więcej szans na zachorowanie na TAB (CI95% 1.83; 4.96). Różnica opisanych wyników w stosunku do wyników badań własnych może wynikać z odmienności metodologicznych, takich jak dobór populacji badanej. Osoby z grupy kontrolnej w przytoczonym badaniu zostały scharakteryzowane jako zdrowi wolontariusze, bez historii ani objawów klinicznych TAB, o które trudno w przypadku choroby przebiegającej najczęściej bezobjawowo. Zastanawiający jest również fakt, że zarówno u wszystkich pacjentów z TAB jak i osób bez tętniaka nie stwierdzono w wywiadzie występowania chorób sercowo-naczyniowych. Natomiast grupa kontrolna zrekrutowana do badań własnych jest jedną z lepiej opisanych i dobranych grup porównawczych dla chorych z TAB w świetle danych opublikowanych w literaturze, chociażby ze względu na ultrasonograficznie zwymiarowany brzuszny odcinek aorty (Oszajca i wsp., 2012).

Istotnym parametrem, stosowanym w praktyce klinicznej do opisu tętniaka aorty brzusznej oraz kontrolowania tempa rozwoju choroby, jest jego średnica. Jest to jeden z kluczowych czynników wpływających na algorytm postępowania leczniczego. Ponieważ na średnicę tętniaka mają wpływ międzyosobnicze różnice w wielkości naczyń, stwierdzono,

że do badań naukowych, a w szczególności badań dotyczących polimorfizmów genetycznych, dla których uzyskiwane wartości OR zwykle są niewielkie, jest to parametr niewystarczający. Żeby zmniejszyć efekt wpływu różnic osobniczych na przeprowadzaną analizę zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genetycznymi a średnicą aorty prawidłowej lub tętniakowato poszerzonej, posłużono się wskaźnikiem wielkości aorty ASI. Parametr ten wyraża średnicę naczynia [cm] w stosunku do powierzchni ciała [m²]. Zastosowano także wskaźnik BMI_{index}, który wyraża średnicę aorty [cm] w stosunku do BMI [kg/m²]. Zabieg ten, wprowadzając normalizację wartości ocenianych parametrów poprzez ich indeksowanie, ma niebagatelne znaczenie dla interpretacji uzyskanych wyników (Lo i wsp., 2014).

Zaobserwowano, że mężczyźni mają wskaźnik ASI niższy średnio o 8.6% w porównaniu do chorych kobiet. W badanej grupie osób płeć wykazuje więc związek ze średnicą tętniaka ($\lambda_{\text{Pillai}} = 0.131$; $p < 0.0001$). Przedział ufności CI95%(-13.86; -3.02) jaki uzyskano dla tej różnicy pokazuje, że prawie na pewno różnica ta nie jest większa niż 13.86% i nie mniejsza niż 3.02%. Takich różnic nie wykazano w przypadku wskaźnika BMI_{index}, gdyż otrzymana z próby różnica wynosiła tylko 1.2%, dodatkowo przedział ufności CI95%(-6.29; 9.29) pokrywając zero nie dostarczył dowodów na to, że taka różnica istnieje. Również w grupie kontrolnej wykazano związek średnicy aorty brzusznej z płcią ($\lambda_{\text{Pillai}} = 0.068$; $p = 0.0002$). Związek ten przejawia się w tym, że średnia uzyskana wartość BMI_{index} w grupie mężczyzn jest o 15.08% większa w porównaniu ze średnią wartością tego wskaźnika w grupie kobiet. Przedział ufności dla tej różnicy, wynoszący CI95%(4.47; 26.77) oznacza, że w rzeczywistości różnica ta może wynosić nawet 26% i prawie na pewno nie jest niższa niż 4.5%. Zgodnie z oczekiwaniami, potwierdzono także związek średnicy TAB z wiekiem pacjenta ($\lambda_{\text{Pillai}} = 0.037$; $p = 0.0073$). Z każdym kolejnym rokiem życia średnia wartość ASI i BMI_{index} wzrasta o ok. 0.4%. Oznacza to, że w grupie osób starszych o 10 lat oba wskaźniki będą wyższe średnio o ok. 4.0% w porównaniu z grupą osób młodszych, przy pozostałych zmiennych klinicznych utrzymanych na tym samym poziomie.

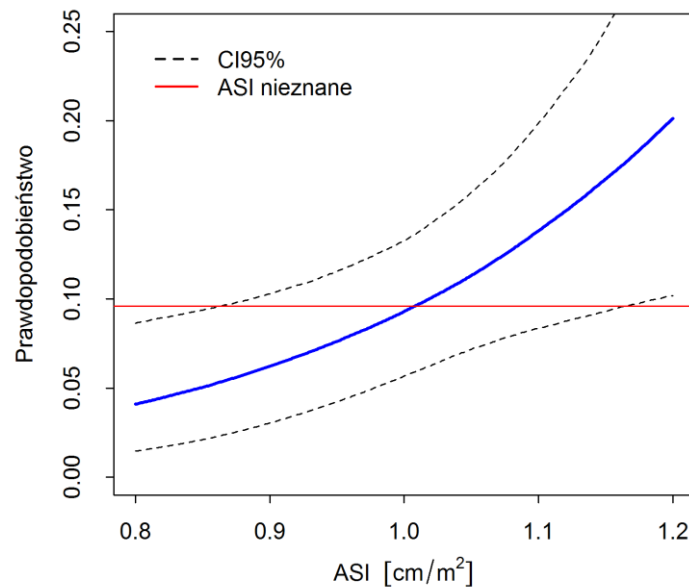
Uwzględniając wpływ czynników klinicznych na wskaźniki ASI i BMI_{index}, przeprowadzono analizę związku pomiędzy nimi a polimorfizmami genetycznymi oznaczanymi w pracy. W przypadku polimorfizmu 1858C/T w genie *PTPN22* stwierdzono, że homozygoty TT mają średnio o 10.55% niższe wskaźniki ASI i o około 14.75% niższe wskaźniki BMI_{index} w porównaniu do homozygot CC. Przedziały ufności CI95% dla tych różnic nie pokrywają zera, co mogłoby świadczyć o tym, że różnice te nie są przypadkowe.

Należy jednak zwrócić uwagę, że jednocześnie przedziały te są bardzo szerokie, a tym samym mało precyzyjne, gdyż genotyp TT jest rzadki i posiadało go tylko 10 osób w grupie chorych. Globalna statystyka $\lambda_{Pillai} = 0.023$ wskazuje, że nie można wykluczyć, iż różnice te są przypadkowe ($p = 0.19$). Ponadto nie ma dowodów także na związek średnicy tętniaka z drugim polimorfizmem w tym genie, tj. z genotypem w *locus* -1123G/C mimo, że pomiędzy oba *loci* występuje znaczące niezrównoważenie gametyczne (miary *linkage disequilibrium*, LD, $D' = 0.83$, $r^2 = 0.39$).

Rozpatrując z kolei polimorfizm -455G/A *FGB* zaobserwowano, że osoby o genotypie GA mają średnio o 3.72% wyższy wskaźnik ASI niż osoby o genotypie AA, oraz średnio o 5.32% wyższy wskaźnik BMI_{index} niż osoby o genotypie AA. Przedziały ufności CI95% dla tych różnic pokazują jednak brak dowodów na to, że różnice między genotypami w rzeczywistości występują. Podobnie osoby o genotypie GG w tym *locus* mają średnio o 3.68% wyższy wskaźnik ASI niż osoby o genotypie AA i o 6.3% wyższy wskaźnik BMI_{index}. Tak samo jednak, jak w przypadku heterozygot GA, przedziały ufności CI95% dla zaobserwowanych z próby różnic nie dostarczają dowodów na potwierdzenie tej tezy. Aby jednak dokładniej scharakteryzować związek średnicy aorty prawidłowej z genotypem w miejscu polimorficznym -455G/A genu *FGB* przeanalizowano jak znajomość średnicy aorty, wyrażona wskaźnikiem ASI, wpływa na ocenę prawdopodobieństwa tego, że dowolna osoba z grupy kontrolnej ma genotyp AA w miejscu -455G/A genu *FGB*. Jeśli nie jest znany wskaźnik ASI dla tej osoby, to można stwierdzić, że prawdopodobieństwo tego, że osoba ta jest homozygotą AA wynosi $P(AA | ASI = ?) = 0.096$, gdyż na tyle oszacowano częstość tego genotypu w populacji kontrolnej. Przedział ufności dla tej częstości wynosi CI95%(0.062; 0.14). Wiadomo jednak, że wraz ze wzrostem liczby alleli A w tym *locus* oczekiwana wartość ASI także rośnie, a homozygoty AA mają ten parametr większy od pozostałych dwóch genotypów. Znając zatem wartość wskaźnika ASI dla danej osoby można określić prawdopodobieństwo tego, że jest ona homozygotą AA. Prawdopodobieństwo to będzie zależało od wartości ASI. Opisaną zależność zilustrowano na Rycinie 21, na której $P(AA | ASI = ?) = 0.096$ zaznaczono czerwoną linią. Z przebiegu niebieskiej krzywej można odczytać jakie jest prawdopodobieństwo tego, że osoba, która może być kontrolą dla chorych na tętniaka¹, jest homozygotą AA. Przykładowo, jeśli u danej osoby wskaźnik ASI = 0.9, to

¹ Celowo nie użyto sformułowania „dowolna osoba nie mająca tętniaka aorty”, gdyż grupa kontrolna w tej pracy nie jest najpewniej reprezentatywną, pod względem częstości genotypów w polimorfizmie *FGB* -455 G/A, grupą całej populacji generalnej osób nie posiadających tętniaka. Być może jest, ale tego nie można zakładać

prawdopodobieństwo tego, że osoba ta jest homozygotą AA nie wynosi $P = 0.096$ lecz jest o 35% mniejsze i wynosi $P(AA | ASI = 0.9) = 0.062$. Podobnie prawdopodobieństwo tego, że osoba jest AA, jeśli jej wskaźnik $ASI = 1.1$ wynosi $P(AA | ASI = 1.1) = 0.138$. Rozpatrując różnice pomiędzy prawdopodobieństwami AA dla $ASI=0.9$ i $ASI=1.1$, stwierdzono, że pomiędzy tymi dwoma wartościami ASI różnica wynosi 22%, a różnica pomiędzy oszacowanymi dla nich prawdopodobieństwami aż 122%. Pokazuje to, że związek między genotypem *FGB* -455G/A a wskaźnikiem ASI w grupie kontrolnej nie jest mały.



Ryc. 21. Prawdopodobieństwo (linia niebieska) tego, że osoba z populacji kontrolnej będzie homozygotą AA w miejscu polimorfizmu -455G/A genu *FGB*, w zależności od jej wskaźnika ASI. Linia czerwona zaznacza to samo prawdopodobieństwo przy nieznajomości ASI u tej osoby.

W celu określenia, czy związek polimorfizmu *FGB* -455G/A ze średnicą aorty brzusznej jest silny czy słaby, można wyrazić go także w ilorazach szans (OR) tego, że dana osoba jest homozygotą AA jeśli jej wskaźnik ASI przyjmuje daną wartość. Pozostając przy powyższych przykładach $ASI = 0.9$ i $ASI = 1.1$, szansa tego iż osoba jest homozygotą AA jeśli jej $ASI = 1.1$ wzrasta $OR = 1.5$ razy w stosunku do szansy tego zdarzenia przy nieznajomości ASI. Podobnie, szansa tego, że osoba nie jest AA, jeśli jej $ASI = 0.9$ wzrasta $OR = 1.6$ razy w stosunku do szansy tego zdarzenia oszacowanej bez znajomości ASI.

z uwagi na to, że są to osoby cierpiące na określone choroby i dobrane celowo tak, by być dobrą kontrolą dla badanych osób z tętniakiem aorty brzusznej.

Dodatkowo należy zauważyć, że przedstawiony na Rycinie 16 zakres wartości ASI od 0.8 do 1.2 obejmuje 90% typowych wartości w grupie kontrolnej (pominięto 5% najniższych i 5% najwyższych wartości). Wartość ASI = 1.2 jest większa 1.5 razy od wartości ASI=0.8. Oszacowane zaś dla tych punktów prawdopodobieństwa wynoszą $P(AA | ASI = 0.8) = 0.041$ oraz $P(AA | ASI = 1.2) = 0.2$, zatem prawdopodobieństwo AA dla ASI = 1.2 jest aż 4.88 razy większe niż dla ASI = 0.8.

Biorąc pod uwagę powyższą analizę oraz wcześniej opisane wyniki uzyskane przez inny polski zespół, a także fakt, że rozkład częstości genotypów dla *FGB* -455G/A odbiega od rozkładu Hardy'ego-Weinberga, zdecydowano się przeprowadzić teoretyczną analizę rozkładu częstości oczekiwanych w sytuacji, gdyby *locus* to znajdowało się w równowadze H-W. Jej wyniki przedstawiono w Tabeli XXVIII.

Tabela XXVIII. Rozkłady częstości genotypów dla polimorfizmu *FGB* -455G/A w grupie kontrolnej obserwowane w badaniu oraz oczekiwane w sytuacji, gdyby *locus* to znajdowało się w równowadze Hardy'ego-Weinberga.

FGB -455 G/A	AA	GA	GG	Razem
Obserwowane [n]	24	82	144	250
Obserwowane [%]	9.6	32.8	57.6	100
Oczekiwane zgodnie z H-W [n]	16.9	96.2	136.9	250
Oczekiwane zgodnie z H-W [%]	6.8	38.5	54.8	100
Różnica [n]	7.1	-14.2	7.1	-
Rezyduum	1.73	-1.45	0.61	-

n: liczba; H-W: rozkład Hardy'ego-Weinberga

Symulacja ta uwiarydliwiła, że odstępowanie rozkładu genotypów od równowagi H-W przejawia się przede wszystkim nadmiarem homozygot AA (rezyduum = 1.73), kosztem mniejszej liczby heterozygot GA (rezyduum = -1.45). Jak omówiono powyżej, polimorfizm -455G/A genu *FGB* ma związek ze średnicą aorty prawidłowej, wyrażonej jako ASI, polegający na tym, że im więcej alleli A, tym większa średnica ASI w grupie kontrolnej (Rycina 21). Osoby w grupie kontrolnej to osoby, które mogłyby potencjalnie mieć tętniaka aorty. Analiza polimorfizmu *FGB* -455G/A wykazała, że w grupie tych kontrolnych osób występuje nadmiar genotypów AA w stosunku do tego, czego należało by oczekiwać, gdyby żaden z genotypów nie był preferowany. Wobec powyższego wywnioskowano, że

polimorfizm *FGB* -455G/A ma związek z tętniakiem aorty brzusznej mimo, że porównanie częstości genotypów w obu grupach nie wykazuje różnic. Nie wykazuje, ale dlatego, że częstości genotypów w grupie kontrolnej są przesunięte w stronę nadmiaru AA. O ile żaden z trzech genotypów *FGB* nie jest preferowany w tętniaku aorty brzusznej, to tworząc grupę kontrolną wyselekcjonowano nietypową grupę ludzi pod względem *locus FGB*, którzy z powodzeniem mogliby mieć tętniaka ale go nie mają. Tym samym wykazano, że polimorfizm ten może odgrywać rolę w powstawaniu lub zapobieganiu rozwojowi tętniaka aorty brzusznej. Żeby jednak jeszcze dokładniej sprawdzić tę zależność, po przeanalizowaniu literatury w tym zakresie, zdecydowano się na przeprowadzenie dodatkowej analizy, której wyniki omówiono poniżej.

W badaniu przeprowadzonym wśród chorych z zakrzepicą żył głębokich, leczonych w akademickim szpitalu w Graz w Austrii i w grupie kontrolnej, nie stwierdzono różnic w częstości występowania wariantów polimorficznych -455G/A genu *FGB*. Rozkłady częstości genotypów w tych grupach pozostawały w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Analizując wyniki uzyskane we wspomnianym badaniu, dostrzeżono podobieństwo między grupą osób w austriackiej próbie kontrolnej, austriackiej próbie osób z zakrzepicą żył głębokich oraz własną grupą osób z tętniakiem aorty ($\chi^2_{1ss=4} = 0.8341$; $p = 0.9338$). Zaobserwowano uderzająco wysoką zgodność rozkładów genotypów, w związku z czym zdecydowano się połączyć te trzy grupy w jedną grupę o łącznej liczebności 897 osób. Rozkład genotypów w tej łączonej grupie również nie odbiegał od równowagi H-W ($p = 0.1983$). Tę łączną grupę, nazwaną Razem, porównano z grupą kontrolną dla TAB. Wyniki przedstawiono w Tabeli XXIX (Renner i wsp., 2002).

Tabela XXIX. Łączna analiza genotypów w *locus FGB -455G/A*, zbierająca wyniki uzyskane w pracy Austriaków (Renner i wsp., 2002) oraz w grupach chorych z TAB i kontrolnej.

<i>FGB -455G/A</i>	AA	GA	GG	Razem
Renner i wsp.: kontrola	20	133	163	316
%	6.3	42.1	51.6	100%
rezyduum	-0.461	1.335	-1.073	-
Renner i wsp.: chorzy	18	126	163	307
%	5.9	41	53.1	100%
rezyduum	-0.828	0.870	-0.430	-
TAB	17	106	151	274
%	6.2	38.7	55.1	100%
rezyduum	-0.512	-0.111	0.369	-
Razem	55	365	477	897
%	6.1	40.7	53.2	100%
$\chi^2_{\text{ISS}=4} = 0.8341; p = 0.9338$				
Kontrola dla TAB	24	82	144	250
%	9.6	32.8	57.6	100%
rezyduum	1.915	-2.262	1.241	-
OR	1*	1.94	1.45	
CI95%	-	1.14; 3.32	0.86; 2.42	
$\chi^2_{\text{ISS}=2} = 7.2452; p = 0.0267$				

*Genotyp AA jako grupa odniesienia.

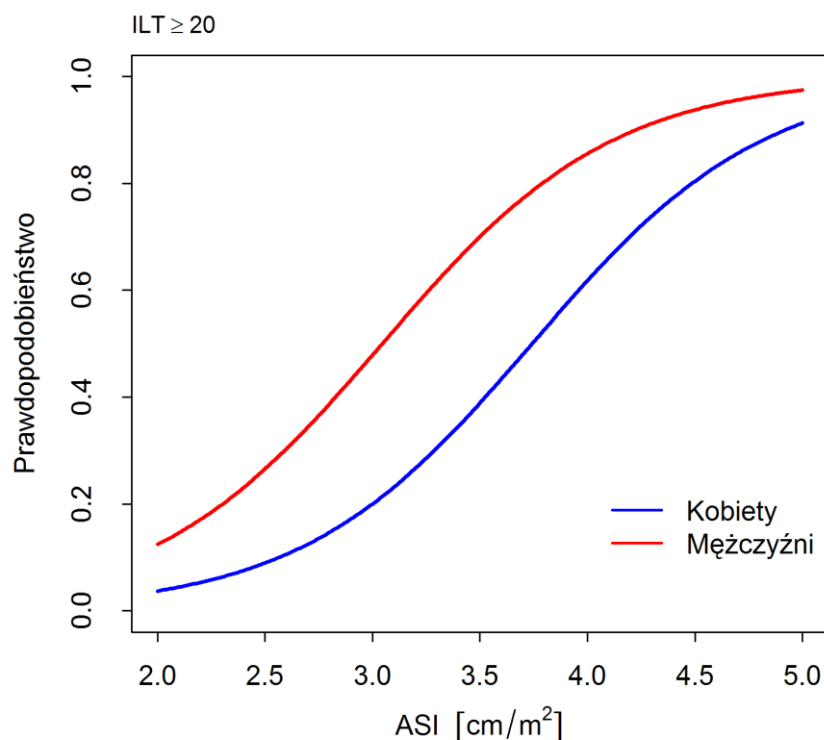
Źródło: Wykorzystano wyniki badań własnych oraz przedstawione w pracy Renner i wsp., 2002

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że grupy te różnią się od siebie nieprzypadkowo ($\chi^2_{\text{ISS}=2} = 7.2452; p = 0.0267$). Zaobserwowano, że w grupie kontrolnej dla TAB jest więcej homozygot AA niż należałoby oczekiwać, gdyby grupa ta nie różniła się od trzech pozostałych grup, tzn. dwóch austriackich i grupy TAB. Dla obserwowanej liczebności homozygot AA w grupie kontrolnej dla TAB, wynoszącej n=24 uzyskano wysoką wartość standaryzowanego rezyduum (in. reszta, odstępstwo) wynoszącą 1.915, co plasuje ją w ogonie standardowej krzywej normalnej. Rezyduum jest wysokie i dodatnie, gdyż obserwowana liczebność AA jest dużo za duża w porównaniu do oczekiwanej, wynoszącej n = 17.2. Co

więcej, dla obserwowanej liczebności heterozygot GA w grupie kontrolnej dla TAB, wynoszącej $n = 82$ osoby, uzyskano rezyduum $= -2.262$, gdyż oczekiwana liczebność jest większa i wynosi $n = 97.4$ osoby. Heterozygota GA ma $OR = 1.94$ razy więcej szans na wystąpienie tętniaka aorty niż homozygota AA. Przedział ufności pokazuje, że może to być nawet $OR = 3.32$ razy więcej. Podobnie, homozygota GG ma $OR = 1.45$ razy więcej szans na tętniaka w porównaniu z homozygotą AA. Ostatecznie wykazano więc, że polimorfizm *FGB* -455G/A ma związek z TAB. Przejawia się on tym, że warto być homozygotą AA aby nie mieć TAB. Ponadto osoby kontrolne dla TAB, będące homozygotą AA, mają największą średnicę ASI. Innymi słowy im więcej allelu A, tym większa średnica ASI w grupie kontrolnej.

Jak już wspomniano, wzrost aktywności prozakrzepowej może mieć znaczenie w procesie formowania się skrzepliny przyściennej, która bardzo często towarzyszy tętniakowi aorty brzusznej. Jak wynika z danych literaturowych, zmniejsza ona o około 8% ciśnienie panujące w świetle tętniaka i powoduje równomierny rozkład sił działających ścianę tętniaka, dzięki czemu zmniejsza obciążenie hemodynamiczne ściany i szybkość powiększania się średnicy tętniaka. Z drugiej jednak strony utrudnia transport składników odżywczych i tlenu, co przyczynia się do ścieńczenia ściany TAB i zwiększa ryzyko jego pęknięcia (Humphrey i Holzapfel, 2012).

W świetle uzyskanych wyników genotypowań, żaden z badanych polimorfizmów nie jest związany z grubością skrzepliny. Na Rycinie 22 zamieszczono krzywe ilustrujące prawdopodobieństwo zdarzenia, że grubość skrzepliny przyściennej będzie nie mniejsza niż 20 mm, w zależności od wskaźnika ASI. Szansa na to, że grubość skrzepliny pacjenta o genotypie GA, w miejscu polimorficznym -455G/A genu *FGB*, będzie nie mniejsza niż $k = 16$ mm jest $OR = 1.33$ razy większa niż szansa tego zdarzenia u pacjenta o genotypie AA w tym *locus*. Jednak przedział ufności dla tego ilorazu, wynoszący $CI_{95\%}$ (0.53; 3.38), pokazuje, że nie można wykluczyć iż w rzeczywistości szansa heterozygoty GA jest dwukrotnie mniejsza niż szansa homozygoty AA ($OR = 0.53$). Nie ma więc dowodu na różnice w grubości skrzepliny między homozygotami GA i AA. Taki sam wniosek wyciągnięto z porównania homozygoty GG z homozygotą AA. Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że nie ma żadnych przesłanek do twierdzenia, że genotyp w miejscu polimorficznym -455G/A genu *FGB* ma związek z grubością skrzepliny przyściennej w tętniaku aorty brzusznej ($\chi^2_{1ss=2} = 0.40$; $p = 0.8202$). Analogiczne wyniki uzyskano dla pozostałych badanych polimorfizmów.



Rycina 22. Prawdopodobieństwo, że grubość skrzepliny przyściennej będzie nie mniejsza niż 20 mm, w zależności od wskaźnika ASI, u kobiet i mężczyzn.

Ograniczeniem przeprowadzonych badań może być dobór grupy badanej, rekrutowanej wyłącznie spośród pacjentów zakwalifikowanych do operacji naprawczej TAB. Obecnie nie jest jednak możliwy dobór reprezentatywnej próby populacji, z jednej strony ze względu na brak badań przesiewowych a z drugiej strony z uwagi na wysoką śmiertelność wynikającą z bezobjawowego przebiegu schorzenia. Natomiast konstruując grupę kontrolną dołożono wszelkich starań aby była jednorodna i dobrana odpowiednio do celów i założeń badania. Biorąc pod uwagę, że procesy takie jak degradacja elastyny, przebudowa kolagenu czy reakcja zapalna są charakterystyczne również dla innych lokalizacji tętniaków, to pomimo różnic w etiologii uzasadnionym wydaje się sprawdzić uzyskane wyniki także w innych lokalizacjach badanej patologii.

Podsumowując, niniejsze doniesienie stanowi pierwszą obserwację dotyczącą wpływu polimorfizmu *FGB* -455G/A na wskaźnik średnicy aorty ASI. Potwierdza tym samym

doniesienie innego polskiego zespołu, że polimorfizm *FGB* -455G/A ma związek z TAB. Przejawia się on tym, że homozygota AA ma mniejsze szanse na wystąpienie TAB. Drugim istotnym wynikiem jest potwierdzenie występowania obniżonej aktywności TAFI u chorych z TAB, opisanego we wcześniejszym pilotażowym badaniu własnym. Natomiast oryginalnym rezultatem jest stwierdzenie, że różnica w aktywności TAFI pomiędzy badanymi grupami nie zależy od genotypu -438G/A *TAFI* oraz wykazanie zależności między częstością allelu G w tym miejscu polimorficznym a aktywnością TAFI.

Już dziś wiadomo, że efekt wpływu podłoża genetycznego na patomechanizm TAB jest wielogenowy, a zmiany w genach przyczyniające się do rozwoju TAB są złożone. Wynika to między innymi z faktu stosunkowo małej penetracji pojedynczych *loci* oraz addytywnego wpływu różnych alleli na zapadalność na TAB. Prawdopodobnie niektóre mutacje, występując pojedynczo, nie wykazują związku z tętniakiem, jednak w zestawieniu z innymi *loci* predysponują do jego wystąpienia. Nie należy również zapominać o oddziaływaniach genotypu ze środowiskiem. Wydaje się, że w przyszłości analizy z zastosowaniem wysokoprzepustowych technik genotypowania będą stanowić naturalne uzupełnienie tradycyjnej oceny TAB. Żeby tak się stało, konieczne jest przeprowadzenie badań molekularnego podłoża tego schorzenia tak, aby w przyszłości móc modyfikować algorytmy postępowania profilaktycznego, diagnostycznego i leczniczego. Trzeba pamiętać, że nadrzędnym celem oceny polimorfizmu genetycznego nie jest odpowiedź na pytanie, czy istnieje zależność pomiędzy konkretnym układem alleli a wystąpieniem choroby, ale to, jakie będzie praktyczne znaczenie tej korelacji. W przypadku TAB szczególnie przydatna w praktyce klinicznej byłaby identyfikacja genetycznych czynników prognostycznych, których oznaczenie pozwoliłoby przewidywać rozwój choroby i tym samym podejmować decyzje terapeutyczne. Molekularne badania wariantów polimorficznych genów wydają się być drogą zarówno do zrozumienia patogenezy jak i do zastosowania w nowoczesnej diagnostyce i planowaniu leczenia złożonych chorób sercowo-naczyniowych, w tym tętniaka aorty brzusznej.

6. WNIOSKI

Analiza uzyskanych wyników badań, przeprowadzonych na próbie populacji polskiej, pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

1. Występowanie tętniaka aorty brzusznej w badanej grupie nie jest uwarunkowane wariantami polimorficznymi 1858C/T genu *PTPN22* (rs2476601), -1123G/C genu *PTPN22* (rs2488457), 49A/G genu *CTLA4* (rs231775) oraz -438G/A genu *TAFI* (rs2146881).
2. Polimorfizm -455G/A genu *FGB* (rs18000790) wykazuje zależność z występowaniem tętniaka aorty brzusznej. Wariant polimorficzny -455G/A *FGB* wpływa na wskaźnik wielkości aorty ASI (ang. *Aortic Size Index*) w grupie kontrolnej w ten sposób, że wraz ze wzrostem liczby alleli A rośnie ASI.
3. Aktywność inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI) zależy od genotypu -438G/A *TAFI*. Badania biochemiczne i genetyczne przeprowadzone w badanej populacji wykazały, że średnia aktywność inhibitora TAFI rośnie wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie. Homozygoty GG mają wyższą średnią aktywność inhibitora TAFI aniżeli homozygoty AA.
4. Obniżenie aktywności inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną w grupie osób z tętniakiem aorty brzusznej w porównaniu do grupy kontrolnej nie zależy od genotypu -438G/A *TAFI*.

7. STRESZCZENIE

Tętniak aorty brzusznej jest chorobą wieloczynnikową, w przebiegu której nierozpoznane jak dotąd czynniki endo- i egzogenne zapoczątkowują i modulują proces patologicznego poszerzania się ściany aorty. Pomimo wielu badań, prowadzonych zarówno w materiale ludzkim jak i na modelu zwierzęcym, etiologia tej choroby jest wciąż słabo zdefiniowana. Niemniej jednak autorzy aktualnych publikacji poświęconych temu zagadnieniu zgadzają się co do połączonego wpływu czynników środowiskowych i genetycznych na jego powstawanie i rozwój. Dotychczas nie opracowano skutecznego systemu wczesnej diagnostyki ani terapii farmakologicznej. Pomimo ciągłego rozwoju chirurgii, także wyniki leczenia chorych z tętniakiem objawowym czy pękniętym nie są zadowalające.

Geny *PTPN22*, *CTLA4*, *FGB* oraz *TAFI* i ich polimorfizmy pojedynczych nukleotydów wytypowano do badania ze względu na biologiczne funkcje, potencjalnie łączące je z występowaniem tętniaka aorty brzusznej. Gen *PTPN22* koduje limfocytarną fosfatazę tyrozynową, a jego polimorfizm 1858C/T przyczynia się do zaburzenia przekazywania sygnału do wnętrza limfocytów T, co może skutkować zwiększeniem ryzyka rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Z kolei polimorfizm 49A/G genu *CTLA-4* powoduje zamianę treoniny na alaninę w cząsteczce CTLA-4. Zmiana ta zaburza apoptozę aktywowanych limfocytów i prowadzi do utraty kontroli nad nimi, co może powodować rozwój chorób o podłożu zapalnym. Cząsteczką, biorącą udział w procesie krzepnięcia krwi a także w reakcji zapalnej, jest syntetyzowany w hepatocytach fibrynogen, którego łańcuch B β kodowany jest przez gen *FGB*. Polimorfizm -455A/G genu *FGB* wpływa na stężenie fibrynogenu we krwi. Również aktywowany trombiną inhibitor fibrylizy, TAFI, bierze udział zarówno w utrzymywaniu homeostazy pomiędzy układami krzepnięcia i fibrylizy jak i w procesach zapalnych, a jego wariant polimorficzny -438G/A w badaniach populacyjnych wykazywał związek ze wzrostem śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych wśród mężczyzn.

Celem pracy była ocena związku pomiędzy wybranymi odmianami polimorficznych genów *PTPN22*, *CTLA4*, *TAFI* i *FGB* a predyspozycją do wystąpienia tętniaka aorty brzusznej, a także analiza zależności między badanymi polimorfizmami a średnicą tętniaka aorty brzusznej i brzusznego odcinka prawidłowej aorty oraz analiza zależności między genotypem w locus TAFI -438 G/A a aktywnością produktu białkowego tego genu.

Do badań włączono 305 pacjentów hospitalizowanych w latach 2010 - 2014 na Oddziale Chirurgii Naczyniowej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego, natomiast do grupy kontrolnej włączono 250 wolontariuszy zakwalifikowanych w trakcie „białych sobót” przeprowadzonych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowym pod hasłem: „Wczesne Wykrywanie Tętniaka Aorty Brzuszej” na przełomie marca i lutego 2013 roku. Każdy ochotnik miał ultrasonograficznie potwierdzony prawidłowy przebieg aorty i zwymiarowaną średnicę naczynia. Materiałem do badań była krew obwodowa, pobierana z żyły odłokciowej do próbek z antykoagulantem. Analizę polimorfizmów pojedynczego nukleotydu -438G/A w genie *TAFI* oraz 1858C/T w genie *PTPN22* wykonano techniką dyskryminacji alleli z użyciem sond typu TaqMan. Typowanie SNPs 49A/G w genie *CTLA-4*, -1123C/G w genie *PTPN22* oraz -455G/A w genie *FBG* przeprowadzono z wykorzystaniem metody PCR-RFLP. Oznaczenie aktywności TAFI w osoczu przeprowadzono za pomocą komercyjnie dostępnego testu TAFI Activity Kit firmy American Diagnostica GmbH. Zgodność rozkładu genotypów z rozkładem oczekiwanym z równowagi Hardy’ego-Weinberga, weryfikowano testem chi-kwadrat χ^2 . Ilorazem szans i przedziałem ufności (CI95%) dla niego na poziomie $1-\alpha=0.95$ określano siłę związku genotypu z chorobą. Dla loci *PTPN22* 1858C/T i *PTPN22* -1123C/G obliczono niezrównoważenie sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD). Modelem liniowym analizowano aktywność produktu genu *TAFI*, aTAFI.

Porównanie częstości genotypów w grupie chorych i kontrolnej nie daje podstaw do twierdzenia, że polimorfizmy *CTLA-4* 49A/G, *PTPN22* 1858C/T i *PTPN22* -1123C/G mają związek z występowaniem tętniaka aorty brzusznej. Natomiast rozpatrując polimorfizm -455G/A *FBG* zaobserwowano, że osoby o genotypie GA mają średnio o 3.72% wyższy wskaźnik ASI niż osoby o genotypie AA, oraz średnio o 5.32% wyższy wskaźnik BMI_{index} niż osoby o genotypie AA. Przeprowadzona analiza pozwoliła na wysnucie następujących wniosków: heterozygota GA ma 1.94 razy więcej szans na wystąpienie tętniaka aorty brzusznej niż homozygota AA, a przedział ufności pokazuje, że może to być nawet OR =3.32 razy więcej. Podobnie, homozygota GG ma 1.45 razy więcej szans na tętniaka w porównaniu z homozygotą AA. Polimorfizm *FBG* -455G/A ma związek z TAB. Ponadto osoby kontrolne dla TAB, będące homozygotą AA, mają największą średnicę ASI. Im więcej allelu A, tym większa średnica ASI w grupie kontrolnej. Z kolei w przypadku polimorfizmu -438G/A *TAFI*, wyższe stężenie antygeny TAFI obserwuje się u homozygot GG, co jest

zgodne z prezentowanymi wynikami, dotyczącymi aktywności TAFI w badanych grupach. Przy czym spadek aktywności TAFI w grupie badanej nie zależy od badanego genotypu -438G/A. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że średnia aktywność TAFI rośnie wraz ze wzrostem liczby alleli G w genomie. Homozygoty GG mają wyższą średnią aktywność TAFI aniżeli homozygoty AA w obu analizowanych grupach. Jak wynika z piśmiennictwa, polimorfizm ten jest powiązany ze stężeniem białka TAFI we krwi. Wiadomym jest, że wraz ze spadkiem stężenia danego czynnika we krwi należy się spodziewać spadku jego aktywności. Obecność antygeny nie jest jednak równoznaczna z obecnością białka aktywnego we krwi. W krwioobiegu TAFI może występować jako nieaktywny zymogen uaktywniany proteolitycznie trombiną miejscowo, w czasie nasilenia się procesów koagulacyjnych. Zatem nie można wykluczyć, że wraz ze spadkiem aktywności TAFI spada jego stężenie.

Pewnym jest, że obok czynników środowiskowych również czynniki genetyczne odgrywają rolę w patogenezie tętniaka aorty brzusznej. Wyniki badań epidemiologicznych nie pozostawiają co do tego wątpliwości. Z uwagi na złożoność obserwowanych fenotypów tętniaka, wpływ genów na zapadalność na TAB pochodzi najprawdopodobniej zarówno z sumowania się wpływów alleli lub *loci* jak i z interakcji pomiędzy nimi (wpływ addytywny i nieaddytywny). Predyspozycja do rozwoju tej choroby jest także wynikiem interakcji genotypu z czynnikami środowiskowymi. Nawet jeżeli w przyszłości okaże się, że na tą chorobę wpływają głównie ewolucyjnie młode, rzadkie geny, to stale dokonujący się postęp technologiczny i metodologiczny w epidemiologii molekularnej pozwala sądzić, że możliwa będzie ich identyfikacja. Jej wynikiem z kolei może być nie tylko poznanie patomechanizmu choroby i wyjaśnienie przyczyn klinicznej różnorodności obserwowanych fenotypów TAB ale także usprawnienie wczesnej diagnostyki i zmniejszenie przedwczesnej umieralności. Stworzy także szansę na opracowanie strategii terapii zindywidualizowanej i wdrożenie poradnictwa genetycznego dla rodzin obciążonych ryzykiem zachorowania.

8. ABSTRACT

An abdominal aortic aneurysm is a multifactorial disease, in the course of which the unrecognized yet endogenous and exogenous factors initiate and modulate the pathological process of widening of the aortic wall. Despite the many studies conducted both in human material and in the animal model, the etiology of this disease is still poorly defined. Nevertheless, the authors of the recent publications on this subject agree on the combined effect of environmental and genetic factors on its formation and development. No effective system for early diagnosis or drug therapy has yet been developed. Despite the continuous development of surgery, the results of treatment of patients with symptomatic or ruptured aneurysm are also unsatisfactory.

PTPN22, *CTLA4*, *FGB* and *TAFI* genes and single nucleotide polymorphisms were selected for the study due to biological functions, which possibly combine them with the occurrence of an abdominal aortic aneurysm. The *PTPN22* gene encodes a lymphoid tyrosine phosphatase and its polymorphism of 1858C/T contributes to abnormal signal transduction into T lymphocytes, which may result in increased risk for the development of an immune response. In turn, the polymorphism 49A/G of the *CTLA-4* gene causes conversion of threonine to alanine in the CTLA-4 molecule. This change distorts the apoptosis of activated lymphocytes, and leads to loss of control over them, which can result in the development of inflammatory diseases. The molecule, which participates in the process of blood clotting and in the inflammatory response, is the fibrinogen synthesized in hepatocytes, whose B β chain is encoded by *FGB* gene. The -455A/G polymorphism of *FGB* gene affects the concentration of fibrinogen in the blood. Also, the TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) is involved in both maintaining the homeostasis between coagulation and fibrinolysis systems as well as in inflammatory processes, and its -438G/A polymorphic variant in population-based studies showed the relation with increased mortality from cardiovascular causes among men.

The purpose of the study was to assess the relationship between the selected polymorphic variants of *PTPN22*, *CTLA4*, *TAFI* and *FGB* genes and predisposition to an abdominal aortic aneurysm, as well as to analyse the correlation between the studied polymorphisms and the diameter of the abdominal aortic aneurysm and the abdominal aortic segment as well as the analysis of the proper relationship between the genotype at *TAFI* -438G/A locus and the activity of the protein product of this gene.

The 305 patients hospitalized in the years 2010-2014 at the Department of General and Vascular Surgery, Regional Specialist in Wrocław, Research and Development Centre were enrolled in the test; the control group included 250 volunteers enrolled in the course of the free research and advice in the hospital on Saturdays performed at the Regional Specialist Hospital in Wrocław, Research and Development Centre - under the slogan: "Early Detection of Abdominal Aortic Aneurysm" in late March and early February 2013. The correct course of the aorta and sized vessel diameter in each volunteer was confirmed by ultrasound. The experimental material was peripheral blood taken from the antecubital vein into tubes containing anticoagulant. The analysis of the -438G/A Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the *TAFI* gene and 1858C/T in the *PTPN22* gene was performed by allelic discrimination technique using TaqMan-type probes. The typing of the 49A/G SNPs in the *CTLA-4* gene, -1123C/G in the *PTPN22* gene and -455G/A in the *FBG* gene was performed using the Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP). Determination of the TAFI activity in plasma was performed using a commercially available TAFI Activity Kit assay from American Diagnostica GmbH. The compliance of the genotype distribution with the distribution expected from the Hardy-Weinberg equilibrium, was verified by the chi-square test, χ^2 . The odds ratio (OR) and confidence interval of CI95%, at the level of $1-\alpha = 0.05$ were used to determine the strength of the genotype association with the disease. For *PTPN22* 1858C/T and *PTPN22* -1123C/G loci, the linkage disequilibrium (LD) was calculated. The linear model was used to analyse the TAFI activity (aTAFI) of the gene product.

The comparison of genotype frequencies in patients and controls did not give rise to a claim that polymorphisms of *CTLA-4* 49A/G, *PTPN22* 1858C/T and *PTPN22* -1123C/G are associated with the occurrence of abdominal aortic aneurysm. In contrast, considering the polymorphism of -455G/A *FBG*, it has been observed that people with the GA genotype have an average of 3.72% higher ASI rate than people with the AA genotype, and an average of 5.32% higher BMI index than those with the AA genotype. The analysis made it possible to draw the following conclusions: the GA heterozygote has OR = 1.94 times more chances of aortic aneurysm than the AA heterozygote, and the confidence interval shows that it may even be OR = 3.32 times more. Similarly, the GG homozygote has OR = 1.45 times more chance of the aneurysm as compared to the AA homozygote. The *FBG* -455G/A polymorphism is related to the TAB. In addition, people in the control group for the TAB, which is the AA homozygote, have the largest diameter of the ASI. The more the A allele, the larger the diameter of the ASI in the control group. In turn, in the case of the -438G/A *TAFI*

polymorphism, a higher concentration of the TAFI antigen is observed in the GG homozygotes, which is consistent with the presented results concerning the TAFI activity in the test groups. A decrease in the TAFI activity in the test group does not depend on the tested -438G/A genotype. The statistical analysis of the obtained results showed that the average TAFI activity increases with the number of the G alleles in the genome. The GG homozygotes have a higher than average TAFI activity as compared to the AA homozygotes in both analysed groups. As the literature clearly shows, this polymorphism is associated with TAFI protein concentration in the blood. It is known that with the decrease in the concentration of the particular agent in the blood, a decrease in its activity can be expected. The presence of the antigen is not synonymous with the presence of the active protein in the blood. In the blood stream, TAFI may occur as an inactive zymogen proteolytically activated by thrombin locally with an increase in coagulation processes. Therefore, it cannot be ruled out that with the decrease in the TAFI activity, its concentration decreases.

It is certain that in addition to environmental factors, genetic factors also affect the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. Epidemiological studies leave no doubt about it. Due to the complexity of the observed phenotypes of the aneurysm, the impact of the genes on the incidence of TAB probably comes from the sum of influences of alleles or loci and from the interaction between them (an additive and non-additive impact). Predisposition to the development of this disease is also the result of the genotype interaction with environmental factors. Even if it is shown in the future that this condition affects mainly evolutionarily young and rare genes, the constantly advancing technology and methodology in molecular epidemiology suggest that it will be possible to identify them. In turn, not only can the pathogenesis of the disease and explanation of the clinical causes for the observed TAB phenotype diversity be known as a result thereof, but also the early diagnosis and reduction of premature mortality can improve. It will also create an opportunity to develop individualized treatment strategies and implement genetic counselling for high risk families.

9. LITERATURA

Anderson J.J., Wendy L., Jeffrey I. W., Genetics of Coagulation: What the Cardiologist Needs to Know. *Canadian Journal of Cardiology* 2013; 29(1): 75–88.

Bajzar L., Jain N., Wang P., Walker J.B., Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med* 2004; 32(5): 320-324.

Bajzar L., Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor and an Antifibrinolytic Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(12): 2511-2518.

Baxter B.T., McGee G.S., Shively V.P., Drummond I.A., Dixit S.N. i wsp., Elastin content, cross-links, and mRNA in normal and aneurysmal human aorta. *J Vasc Surg* 1992; 16: 192–200.

Begovich A.B., Carlton V.E., Honigberg L.A., Schrodi S.J., Chokkalingam A.P. i wsp., A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet* 2004; 75(2): 330–337.

Bilińska M., Frydecka I., Noga L., Dobosz T., Zołędziewska M. i wsp., Progression of multiple sclerosis is associated with exon 1 CTLA-4 gene polymorphism. *Acta Neurol Scand.* 2004; 110(1): 67-71.

Biros E., Cooper M., Palmer L.J., Walker P.J., Norman P.E. i wsp., Association of an allele on chromosome 9 and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2010; 212(2): 539–542.

Biros E., Norman P.E., Jones G.T., van Rij A.M., Yu G. i wsp., Meta-analysis of the association between single nucleotide polymorphisms in TGF- β receptor genes and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2011; 219(1): 218–223.

Blombäck B., Fibrinogen and fibrin--proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 1996; 83(1): 1-75.

Borkett-Jones H.J., Stewart G., Chilvers A.S., Abdominal aortic aneurysms in identical twins. *J R Soc Med* 1988; 81(8): 471-472.

Børsting C., Morling N., Single-Nucleotide Polymorphisms. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier 2013, 233-238.

Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K. i wsp., A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; 36: 337–338.

Botvinick E.H., Perini R., Bural G., Chen W., Chryssikos T. i wsp., The Aging of the Heart and Blood Vessels: A Consideration of Anatomy and Physiology in the Era of Computed Tomography, Magnetic Resonance Imaging, and Positron Emission Tomographic Imaging Methods With Special Consideration of Atherogenesis. *Semin Nucl Med* 2007; 37(2): 120–143.

Bown M.J., Braund P.S., Thompson J., London N.J., Samani N.J. i wsp., Association between the coronary artery disease risk locus on chromosome 9p21.3 and abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1(1): 39–42.

Bridge K.I., Macrae F., Bailey M.A., Johnson A., Philippou H. i wsp., The alpha-2-antiplasmin Arg407Lys polymorphism is associated with Abdominal Aortic Aneurysm. *Thromb Res* 2014; 134(3): 723–728.

Brophy C.M., Reilly J.M., Smith G.J., Tilson M.D., The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg.* 1991; 5(3): 229-233.

Burn GL., Svensson L., Sanchez-Blanco C., Saini M., Cope A.P., Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease. *FEBS Lett* 2011; 585(23): 3689–3698.

Carrell T.W., Burnand K.G., Wells G.M., Clements J.M., Smith A., Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2002; 105: 477–482.

Celermajer D.S., Sorensen K.E., Spiegelhalter D.J., Georgakopoulos D., Robinson J. i wsp., Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 471–476.

Chang W.W., Zhang L., Yao Y.S., Su H., Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(9): 9159-65.

Chapin J.C., Hajjar K.A., Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* 2014.

Chen Z., Zhang H., Xia B., Wang P., Jiang T. i wsp., Association of PTPN22 gene (rs2488457) polymorphism with ulcerative colitis and high levels of PTPN22 mRNA in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28(10): 1351-1358.

Clifton M.A., Familial abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 1977; 64(11): 765-766.

Cloutier J.F., Veillette A., Cooperative Inhibition of T-Cell Antigen Receptor Signaling by a Complex between a Kinase and a Phosphatase. *J Exp Med* 1999; 189(1): 111-121.

Collin J., Araujo L., Walton J., Lindsell D., Oxford Screening Programme for Abdominal Aortic Aneurysm in Men Aged 65 to 74 Years. *Lancet* 1988; 332 (8611): 613–615.

Comings D.E., MacMurray J.P., Molecular Heterosis: a Review. *Mol Genet Metab* 2000;71(1-2): 19–31.

Cornuz J., Sidoti Pinto C., Tevæearai H., Egger M., Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health* 2004; 14(4): 343-349.

Criswell L.A., Pfeiffer K.A., Lum R.F., Gonzales B., Novitzke J. i wsp., Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(4):561-571.

Danesh J., Lewington S., Thompson S.G., Lowe G.D., Collins R. i wsp., Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality An

Individual Participant Meta-analysis. Fibrinogen Studies Collaboration. *JAMA* 2005; 294(14): 1799-1809.

Davalos D., Akassoglou K., Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol* 2012; 34(1): 43-62.

Dawber T.R., Moore F.E., Mann G.V., Coronary Heart Disease in the Framingham Study. *Am J Public Health* 1957; 47(4 Part 2): 4-24.

Donmez A., Aksu K., Aydin H., Keser G., Cagirgan S. i wsp., The Plasma Levels of Activated Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Thrombomodulin in Behçet Disease and their Association with Thrombosis. *Thromb Res* 2010; 126(3): 207-210.

Donner H., Rau H., Walfish P.G., Braun J., Siegmund T. i wsp., CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(1): 143-146.

Doolittle R.F., McNamara K., Lin K., Correlating structure and function during the evolution of fibrinogen-related domains. *Protein Sci* 2012; 21(12): 1808-1823.

Drożdż K., Grzegorek I., Chmielewska M., Gomułkiewicz A., Jabłońska K. i wsp., Nogo-B expression, in arterial intima, is impeded in the early stages of atherosclerosis in humans. *APMIS* 2014; 122: 742–749.

Du X.Y., Zabel B.A., Myles T., Allen S.J., Handel T.M. i wsp., Regulation of Chemerin Bioactivity by Plasma Carboxypeptidase N, Carboxypeptidase B (Activated Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor), and Platelets. *J Biol Chem* 2009; 284(2): 751-758.

Dubis J., Zuk N., Grendziak R., Zapotoczny N., Pfanhauser M. i wsp., Activity of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in the Plasma of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25(3): 226-231.

Elmore J.R., Obmann M.A., Kuivaniemi H., Tromp G., Gerhard G.S. i wsp., Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg* 2009; 49(6): 1525–1531.

Fichna M., Żurawek M., Januszkiewicz-Lewandowska D., Fichna P., Nowak J., PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes in Polish Patients. *Int J Immunogenet* 2010; 37(5): 367-372.

Filardo G., Powell J.T., Martinez M.A., Ballard D.J., Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 14(3):CD001835.

Forsdahl S.H., Singh K., Solberg S., Jacobsen B.K., Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms. A 7-years Prospective Study: the Tromsø Study, 1994–2001. *Circulation* 2009; 119 (16): 2202–2208.

Fousteri G., Liossis S.N., Battaglia M., Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. *Clin Immunol* 2013; 149(3): 556–565.

Galora S., Saracini C., Palombella A.M., Pratesi G., Pulli R. i wsp., Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene polymorphisms and genetic susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2013; 58(4): 1062–1068.

Giusti B., Saracini C., Bolli P., Magi A., Sestini I. i wsp., Genetic analysis of 56 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Med Genet* 2008; 45(11):721–730.

Golledge J., Kuivaniemi H., Genetics of abdominal aortic aneurysm. *Curr Opin Cardiol* 2013; 28(3): 290–296.

Golledge J., Muller J., Shephard N., Clancy P., Smallwood L. i wsp., Association Between Osteopontin and Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:655–660.

Greenwald R.J., Oosterwegel M.A., van der Woude D., Kubal A. i wsp., CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol* 2002; 32(2): 366-373.

Gregersen P.K., Lee H.S., Batliwalla F., Begovich A.B., PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol* 2006; 18(4): 214–223.

Gresele P., Binetti B.M., Branca G., Clerici C., Ascutti S. i wsp., TAFI Deficiency in Liver Cirrhosis: Relation with Plasma Fibrinolysis and Survival. *Thromb Res* 2008; 121(6): 763-768.

Gretarsdottir S., Baas A.F., Thorleifsson G., Holm H, den Heijer M. i wsp., Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet* 2010; 42(8): 692–697.

Grundmann R., Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture, InTech; 2011.

Han S., Zhang S., Zhang W., Li R., Li Y. i wsp., CTLA4 Polymorphisms and Ophthalmopathy in Graves' Disease Patients: Association Study and Meta-Analysis. *Hum Immunol* 2006; 67(8): 618–626.

Harrison S.C., Kalea A.Z., Holmes M.V., Agu O., Humphries S.E., Genomic Research to Identify Novel Pathways in the Development of Abdominal Aortic Aneurysm. *Cardiol Res Pract* Volume 2012, 1-8.

Haug E.S., Skomsvoll J.F., Jacobsen G., Halvorsen T.B., Saether O.D. i wsp., Inflammatory Aortic Aneurysm is Associated with Increased Incidence of Autoimmune Disease. *J Vasc Surg* 2003;38(3): 492-497.

Helgadottir A., Gretarsdottir S., Thorleifsson G., Holm H., Patel R.S. i wsp., Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60(8): 722–729.

Helgadottir A., Thorleifsson G., Magnusson K.P., Grétarsdottir S., Steinthorsdottir V. i wsp., The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 2008; 40(2): 217–224.

Hellenthal F.A., Buurman W.A., Wodzig W.K., Schurink G.W., Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6(7): 464-474.

Hendriks W.J., Pulido R., Protein tyrosine phosphatase variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(10): 1673–1696.

Henry M., Aubert H., Morange P.E., Nanni I., Alessi M.C. i wsp., Identification of Polymorphisms in the Promoter and the 3' Region of the TAFI Gene: Evidence that Plasma TAFI Antigen Levels are Strongly Genetically Controlled. *Blood* 2001 97(7): 2053-2058.

Hinterseher I., Tromp G., H. Kuivaniemi., Genes and abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg* 2011; 25(3): 388–412.

Huang C.H., Wei J.C., Chen C.C., Chuang C.S., Chou C.H. i wsp., Associations of the PTPN22 and CTLA-4 genetic polymorphisms with Taiwanese ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2014; 34(5): 683-691.

Huang J.J., Qiu Y.R., Li H.X., Sun D.H., Yang J. i wsp., A PTPN22 promoter polymorphism -1123G>C is associated with RA pathogenesis in Chinese. *Rheumatol Int* 2012; 32(3): 767-771.

Humphrey J.D., Holzapfel G.A., Mechanics, mechanobiology, and modeling of human abdominal aorta and aneurysms. *J Biomech* 2012; 45(5): 805-814.

Jagadesham V.P., Scott D.J., Carding S.R., Abdominal aortic aneurysms: an autoimmune disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(12): 522–529.

Johnston K.W., Rutherford R.B., Tilson M.D., Shah D.M., Hollier L. i wsp., Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 1991; 13(3): 452–458.

Jones G.T., Bown M.J., Gretarsdottir S., Romaine S.P., Helgadottir A. i wsp., A sequence variant associated with sortilin-1 (SORT1) on 1p13.3 is independently associated with abdominal aortic aneurysm. *Hum Mol Genet* 2013; 22(14): 2941–2947.

Jones G.T., Thompson A.R., van Bockxmeer F.M., Hafez H., Cooper J.A. i wsp., Angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm in three independent cohorts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(4): 764–770.

Jones G.T., van Rij A.M., Regarding "Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association". *J Vasc Surg* 2009; 50(5): 1246–1247.

Juhan-Vague I., Morange P.E., Aubert H., Henry M., Aillaud M.F. i wsp., Plasma Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Antigen Concentration and Genotype in Relation to Myocardial Infarction in the North and South of Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5): 867-873.

Kaartinen T., Lappalainen J., Haimila K., Autero M., Partanen J., Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. *Mol Immunol.* 2007; 44(7): 1644-1651.

Kannel W.B., Dawber T.R., Kagan A., Revotskie N., Stokes J. 3rd., Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease – Six Year Follow-up Experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55(1): 33 – 50.

Kaptoge S., White I.R., Thompson S.G., Wood A.M., Lewington S. i wsp., Fibrinogen Studies Collaboration, Associations of Plasma Fibrinogen Levels with Established Cardiovascular Disease Risk Factors, Inflammatory Markers, and Other Characteristics: Individual Participant Meta-Analysis of 154,211 Adults in 31 Prospective Studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am J Epidemiol* 2007; 166(8): 867–879.

Kazi M., Thyberg J., Religa P., Roy J., Eriksson P. i wsp., Influence of Intraluminal Thrombus on Structural and Cellular Composition of Abdominal Aortic Aneurysm Wall. *J Vasc Surg* 2003; 38(6): 1283-1292.

Korta K., Kupczyk P., Skóra J., Pupka A., Zejler P. i wsp., Komórki macierzyste i progenitorowe w biostrukturze ścian naczyń krwionośnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 982-995.

Kuivaniemi H., Ryer E.J., Elmore J.R., Hinterseher I., Smelser D.T. i wsp., Update on Abdominal Aortic Aneurysm Research: From Clinical to Genetic Studies. *Scientifica (Cairo)* 2014; 564734.

Kuivaniemi H., Shibamura H., Arthur C., Berguer R., Cole C.W. i wsp., Familial abdominal aortic aneurysms: collection of 233 multiplex families. *J Vasc Surg* 2003; 37(2): 340-345.

Kuivaniemi H., Tromp G., Carey D.J., Elmore J.R., Homeister i wsp., The molecular biology and genetics of aneurysms, in *Molecular and Translational Vascular Medicine*. Springer Science Business Media 2012; 3-33.

Kyogoku C., Langefeld C.D., Ortmann W.A., Lee A., Selby S. i wsp., Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75(3): 504–507.

Lee H.Y., Oh B.H., Aging and arterial stiffness. *Circ J* 2010; 74(11): 2257-2262.

Lee S.J., Park S.H., Arterial ageing. *Korean Circ J* 2013; 43(2): 73–79.

Lim B.C., Ariëns R.A., Carter A.M., Weisel J.W., Grant P.J., Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003; 361(9367): 1424-1431.

Lin P.H., Chaikof E.L., Embryology, anatomy, and surgical exposure of the great abdominal vessels. *Surg Clin North Am* 2000; 80(1): 417–433.

Lindholt J.S., Shi G.P., Chronic Inflammation, Immune Response, and Infection in Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31(5): 453–463.

Liu F., Liu J., Zheng T.S., Li Q., Wang C. i wsp., The -1123G/C variant of PTPN22 gene promoter is associated with latent autoimmune diabetes in adult Chinese Hans. *Cell Biochem Biophys* 2012; 62(2): 273-279.

Livak K.J., Marmaro J., Todd J.A., Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet* 1995; 9(4): 341–342.

Lo R.C., Lu B., Fokkema M.T., Conrad M., Patel V.I. i wsp., Vascular Study Group of New England, Relative Importance of Aneurysm Diameter and Body Size for Predicting

Abdominal Aortic Aneurysm Rupture in Men and Women. *J Vasc Surg* 2014; 59(5): 1209-1216.

Martini C.H., Brandts A., de Bruijne E.L., van Hylckama Vlieg A., Leebeek F.W. i wsp., The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2006; 134(1): 92-94.

McColgan P., Peck G.E., Greenhalgh R.M., Sharma P., The genetics of abdominal aortic aneurysms: a comprehensive meta-analysis involving eight candidate genes in over 16,700 patients. *Int Surg* 2009; 94(4): 350–358.

Meade T.W., Chakrabarti R., Haines A.P., North W.R., Stirling Y. i wsp., Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet* 1980; 1(8177): 1050–1054.

Menard L., Saadoun D., Isnardi I., Ng Y.S., Meyers G. i wsp., The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *J Clin Invest.* 2011; 121(9): 3635-44.

Michel J.B., Martin-Ventura J.L., Egado J., Sakalihasan N., Treska V. i wsp., Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011; 90(1): 18-27.

Miller F.W., Alfredsson L., Costenbader K.H., Kamen D.L., Nelson L.M. i wsp., Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun* 2012; 39(4): 259-271.

Mitchell G.F., Parise H., Benjamin E.J., Larson M.G., Keyes M.J. i wsp., Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 43(6): 1239-1245.

Moll F.L., Powell J.T., Fraedrich G., Verzini F., Haulon S. i wsp., Management of Abdominal Aortic Aneurysms. *Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery.* *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011; 41(1): 1–58.

Morange P.E., Juhan-Vague I., Scarabin P.Y., Alessi M.C., Luc G. i wsp., Association between TAFI antigen and Ala 147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence: The PRIME Study. *Thromb Haemost* 2003; 89(3): 554-560.

Morris D.R., Biros E., Cronin O., Kuivaniemi H., Golledge J., The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart* 2014; 100(4): 295–302.

Mosnier L.O., Buijtenhuij P., Manc P.F., Meijers J.C., Bouma B.N., Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood* 2003; 101(12): 4844-4846.

Myles T., Nishimura T., Yun T.H., Nagashima M., Morser J. i wsp., Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, a Potential Regulator of Vascular Inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 51059-51067.

Norrgård O., Rais O., Angquist K.A., Familial occurrence of abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 1984; 95(6): 650-656.

Noszczyk W., Tętniak aorty brzusznej. *Chirurgia tętnic i żył obwodowych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007; 463–480.

Ohara N., Miyata T., Sato O., Oshiro H., Shigematsu H., Aortic Aneurysm in Patients with Autoimmune Diseases Treated with Corticosteroids. *Int Angiol* 2000;19(3): 270-275.

Oszajca K., Wroński K., Janiszewska G., Bieńkiewicz M., Panek M. i wsp., Association Analysis of Genetic Polymorphisms of Factor V, Factor VII and Fibrinogen β Chain Genes with Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Exp Ther Med* 2012; 4(3): 514–518.

Pioli C., Gatta L., Ubaldi V., Doria G., Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J Immunol* 2000; 165(10): 5530-5536.

Pola R., Gaetani E., Santoliquido A., Geradino ., Cattani P. i wsp., Abdominal aortic aneurysm in normotensive patients: association with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21: 445–449.

Pretel M., Marquès L., España A., Drug-Induced Lupus Erythematosus. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2014; 105(1): 18-30.

Reiner A.P., Diehr P., Browner W.S., Humphries S.E., Jenny N.S. i wsp., Common promoter polymorphisms of inflammation and thrombosis genes and longevity in older adults: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis* 2005; 181(1): 175-183.

Renner W., Cichocki L., Forjanics A., Köppel H., Gasser R. i wsp., G-455A Polymorphism of the Fibrinogen Beta Gene and Deep Vein Thrombosis. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32(10): 755–758.

Romo-Tena J., Gómez-Martín D., Alcocer-Varela J., CTLA-4 and Autoimmunity: New Insights Into the Dual Regulator of Tolerance. *Autoimmunity Reviews* 2013; 12(12): 1171–1176.

Rousseuw P.J. and Croux C., Alternatives to the Median Absolute Deviation. *JASA*. 1993; 88(424); 1273-1283.

Roycroft M., Fichna M., McDonald D., Owen K., Zurawek M. i wsp., The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clin Endocrinol* 2009; 70(3):358-362.

Rubio-Ruiz M.E., Pérez-Torres I., Soto M.E, Pastelín G., Lans V.G., Aging in blood vessels. Medicinal agents FOR systemic arterial hypertension in the elderly. *Ageing Res Rev* 2014; 18: 132–147.

Saibeni S., Bottasso B., Spina L., Bajetta M., Danese S. i wsp., Assessment of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Plasma Levels in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(10): 1966-1970.

Sakalihasan N., Heyeres A., Nusgens B.V., Limet R., Lapiere C.M., Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur J Vasc Surg* 1993; 7: 633–637.

Sallakci N., Bacanli A., Coskun M., Yavuzer U., Alpsoy E. i wsp., CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30(5): 546-550.

Santos I.R., Fernandes A.P., Carvalho M.G., Sousa M.O., Ferreira C.N. i wsp., Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels and its polymorphism rs3742264 are associated with dyslipidemia in a cohort of Brazilian subjects. *Clin Chim Acta* 2014; 433: 76–83.

Saracini C., Bolli P., Sticchi E., Pratesi G., Pulli R. i wsp., Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2012; 55(1): 171–179.

Schwartz J.C., Zhang X., Fedorov A.A., Nathenson S.G., Almo S.C., Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 2001; 410(6828): 604-608.

Shi J., Zhi P., Chen J., Wu P., Tan S., Genetic variations in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor gene and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res* 2014; 134(3): 610–616.

Siegerink B., Rosendaal F.R., Algra A., Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2009; 7(3): 385–390.

Simoni G., Pastorino C., Perrone R., Ardia A., Gianrossi R. i wsp., Screening for Abdominal Aortic Aneurysms and Associated Risk Factors in a General Population. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;10(2): 207–210.

Stamper C.C., Zhang Y., Tobin J.F., Erbe D.V., Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* 2001; 410(6828): 608-11.

Standeven K.F., Grant P.J., Carter A.M., Scheiner T., Weisel J.W. i wsp., Functional analysis of the fibrinogen Aalpha Thr312A la polymorphism: effects on fibrin structure and function. *Circulation* 2003; 107(18): 2326-2330.

Stuart R.W., Racke M.K., Targeting T cell costimulation in autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6(3): 275-289.

Svensjö S., Björck M., Gürtelschmid M., Djavani Gidlund K. i wsp., Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation*. 2011; 124(10): 1118-1123.

Szostek M., Malek A.K., Cierpka L., Glowinski S., Mackiewicz Z. i wsp. Surgical Management of Abdominal Aortic Aneurysms in Poland. A multi-centre study. *Int Angiol.* 1993;12(4): 318-322.

Tang S., Peng W., Wang C., Tang H., Zhang Q., Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 97(3):446-452.

Thomas A.E., Green F.R., Kelleher C.H., Wilkes H.C., Brennan P.J. i wsp., Variation in the promoter region of the beta fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb Haemost* 1991; 65(5): 487-490.

Thompson A.R., Drenos F., Hafez H., Humphries S.E., Candidate Gene Association Studies in Abdominal Aortic Aneurysm Disease: A Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 35(1): 19–30.

Thompson A.R., Golledge J., Cooper J.A., Hafez H., Norman P.E. i wsp., Sequence variant on 9p21 is associated with the presence of abdominal aortic aneurysm disease but does not have an impact on aneurysmal expansion. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(3): 391–394.

Tilson M.D., Aortic aneurysms and atherosclerosis. *Circulation* 1992; 85: 378–379.

Tousoulis D., Papageorgiou N., Androulakis E., Briasoulis A., Antoniadou C. i wsp., Fibrinogen and cardiovascular disease: Genetics and biomarkers. *Blood Rev* 2011; 25(6): 239–245.

Ueda H., Howson J.M., Esposito L., Heward J., Snook H. i wsp., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423(6939): 506-511.

van Tilburg N.H., Rosendaal F.R., Bertina R.M., Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor and the Risk for Deep Vein Thrombosis. *Blood* 2000; 95(9): 2855-2859.

van Vlijmen-van Keulen C.J., Vahl A.C., Hennekam R.C., Rauwerda J.A., Pals G., Genetic linkage of candidate genes in families with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 26(2): 205-210.

Vandiedonck C., Capdevielle C., Giraud M., Krumeich S., Jais J.P. i wsp., Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2006; 59(2): 404–407.

Vang T., Miletic A.V., Bottini N., Mustelin T., Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity* 2007; 40(6): 453-461.

Velaga M.R., Wilson V., Jennings C.E., Owen C.J., Herington S. i wsp., The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11): 5862–5865.

Verhoeven E.L., Kapma M.R., Groen H., Tielliu I.F., Zeebregts C.J. i wsp., Mortality of ruptured abdominal aortic aneurysm treated with open or endovascular repair. *J Vasc Surg* 2008; 48(6): 1396–1400.

Wanhainen A., Bergqvist D., Boman K., Torbjörn K.N., Rutegård J. i wsp., Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: A population-based study with historical and current data. *J Vasc Surg* 2005; 41(3): 390-396.

Witkiewicz W., Gnus J., Drohomirecka A., The Role of Chlamydia Pneumoniae in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 18(105): 346-350.

Xu C., Zarins C.K., Glagov S., Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001; 33: 91–96.

Young B., *Histologia. Podręcznik i atlas*, Wheather. Elsevier Health Sciences Poland, 2011.

Yu Z.Y., Zhang J.A., Maier H.B., Wang Y., Xiao W.X. i wsp., Association of polymorphism of protein tyrosine phosphatase nonreceptor-22 gene with AITD. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2008; 24(8): 804-807.

Zeerleder S., Schroeder V., Hack C.E., Kohler H.P., Wuillemin W.A., TAFI and PAI-1 Levels in Human Sepsis. *Thromb Res* 2006; 118(2): 205-212.

10. SPIS TABEL I RYCIN

Spis Tabel

Tabela I. Częstość występowania tętniaka aorty brzusznej w wybranych badaniach populacyjnych.

Tabela II. Najważniejsze asocjacje polimorfizmów genetycznych z TAB zidentyfikowane w badaniach genów kandydujących.

Tabela III. Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji PCR do amplifikacji fragmentów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FGB*.

Tabela IV. Skład zastosowanych mieszanin reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FGB*.

Tabela V. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genów *PTPN22*, *CTLA-4* i *FGB*.

Tabela VI. Wiek osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Tabela VII. Masa ciała osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Tabela VIII. Wskaźnik masy ciała (BMI) osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Tabela IX. Powierzchnia ciała (BSA) osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Tabela X. Średnica aorty [mm] osób włączonych do grupy chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250), w podziale na płeć badanych.

Tabela XI. Średnica aorty w stosunku do powierzchni ciała, ASI [cm/m^2], w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej i kontrolnej.

Tabela XII. Średnica aorty w stosunku do BMI [$\text{cm}\times\text{m}^2/\text{kg}$], w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej i kontrolnej.

Tabela XIII. Grubość skrzepliny przyściennej w grupie chorych, u których skrzeplinę stwierdzono (n=258), oraz częstość chorych bez skrzepliny (n=16), w podziale na płeć badanych.

Tabela XIV. Porównanie występowania chorób współistniejących i czynników ryzyka w grupie chorych z tętniakiem aorty brzusznej (n=274) i kontrolnej (n=250).

Tabela XV. Rozkład liczby czynników ryzyka rozwoju tętniaka aorty brzusznej (analizowane czynniki to: płeć męska, palenie tytoniu, wiek powyżej 65 roku życia, otyłość (BMI>30), nadciśnienie tętnicze i dyslipidemia), gdzie „0” oznacza brak czynników ryzyka a „6” występowanie wszystkich sześciu czynników ryzyka rozwoju tętniaka aorty brzusznej.

Tabela XVI. Liczebności i częstości osób stosujących określone leczenie farmakologiczne w obu badanych grupach.

Tabela XVII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *PTPN22* 1858C/T w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela XVIII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *PTPN22* -1123G/C w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela XIX. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *CTLA-4* 49A/G w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela XX. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *FGB* -455G/A w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela XXI. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *TAFI* -438 G/A w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela XXII. Aktywność produktu genu *TAFI*, aTAFI [%], w zależności od genotypu *TAFI* -438G/A w grupie chorych z TAB i kontrolnej oraz łącznie dla całej populacji badanej.

Tabela XXIII. Zależność między aktywnością TAFI a genotypem *TAFI* -438G/A i tętniakiem aorty brzusznej.

Tabela XXIV. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty, d' , a czynnikami klinicznymi i genetycznymi u chorych z TAB. W tabeli podano procentową różnicę w średnicy dla danej składowej d' , tzn. dla ASI i dla BMI_{index}, w stosunku do grupy odniesienia.

Tabela XXV. Zależność pomiędzy średnicą aorty, d' , a czynnikami klinicznymi i genetycznymi w grupie kontrolnej. W tabeli podano procentową różnicę w średnicy dla danej składowej d' , tzn. dla ASI i dla BMI_{index}, w stosunku do grupy odniesienia.

Tabela XXVI. Zależność pomiędzy grubością skrzepliny przyściennej w worku tętniaka a czynnikami klinicznymi i genetycznymi.

Tabela XXVII. Hipotezy różnie opisujące zależność pomiędzy aktywnością TAFI a chorobą i genotypem *TAFI* -438G/A.

Tabela XXVIII. Rozkłady częstości genotypów dla polimorfizmu *FGB* -455G/A w grupie kontrolnej obserwowane w badaniu oraz oczekiwane w sytuacji, gdyby *locus* to znajdowało się w równowadze Hardy'ego-Weinberga.

Tabela XXIX. Łączna analiza genotypów w *locus FGB* -455G/A, zbierająca wyniki uzyskane w pracy Austriaków (Renner i wsp., 2002) oraz w grupach chorych z TAB i kontrolnej.

Spis Rycin

Ryc. 1. Schematyczny obraz workowatego (A) oraz wrzecionowatego (B) tętniaka aorty brzusznej.

Ryc. 2. Schemat budowy prawidłowej ściany brzuszego odcinka aorty.

Ryc. 3. Schemat rozwoju tętniaka aorty brzusznej i towarzyszących mu zmian w ścianie aorty.

Ryc. 4. Przekrój poprzeczny skrzepliny przyściennej tętniaka aorty brzusznej.

Ryc. 5. Schemat przedstawiający organizację genu *TAFI* i mechanizm powstawania aktywnej (TAFIa) i nieaktywnej (TAFIai) formy jego produktu białkowego.

Ryc. 6. Schemat obrazujący zasadę działania sond typu TaqMan w reakcji dyskryminacji allelicznej (zmodyfikowano według Livak i wsp., 1995).

Ryc. 7. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR dla genu *FGB* w obecności bromku etydyny (1.6 % żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.

Ryc. 8. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR o długości 175 pz dla genu *PTPN22* w obecności bromku etydyny (1 % żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.

Ryc. 9. Wynik elektroforezy agarozowej produktu reakcji PCR o długości 166 pz dla genu *CTLA-4* w obecności bromku etydyny (1 % żel agarozowy). Tor 1 – marker wielkości DNA, kolejne tory – amplikony.

Ryc. 10. Wynik analizy SNP -1123C/G genu *PTPN22* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem *SacI*. Produkty rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 3, 4, 5 i 8 – homozygoty GG, tor 6 – heterozygota GC, tor 7 – homozygota CC.

Ryc. 11. Wynik analizy SNP 49A/G genu *CTLA-4* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym *BbvI*. Produkty trawienia rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 4, 5, 6 i 8 – heterozygoty GA, tor 3 – homozygota GG, tor 7 – homozygota AA.

Ryc. 12. Wynik analizy SNP -455 G/A genu *FGB* metodą PCR-RFLP. Trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym *HaeIII*. Produkty trawienia rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości DNA, tor 2, 3, 7, 8, 10, 11 i 12 – homozygoty GG, tory 4, 5, 6, 13 i 14 – heterozygota GA, tor 9 – homozygota AA.

Ryc. 13. Średnica aorty [mm] osób badanych, w podziale na płeć. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB. Na wykresie prawym – w grupie kontrolnej.

Ryc. 14. Średnica aorty w stosunku do powierzchni ciała, ASI [cm/m²]. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB i kontrolnej. Na wykresie prawym – dystrybuanta empiryczna ASI, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że ASI przyjmie wartość nie większą niż zadana.

Ryc. 15. Średnica aorty w stosunku do BMI [cm×m²/kg]. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobne punkty, obserwacje odstające w grupie chorych z TAB i kontrolnej. Na wykresie prawym – dystrybuanta empiryczna wskaźnika, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że przyjmie on wartość nie większą niż zadana.

Ryc. 16. Grubość skrzepliny przyściennej [mm] w grupie chorych, u których stwierdzono skrzeplinę. Na wykresie A – mediana, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne nieodstające, oraz jako osobny punkt, obserwacja odstająca. Na wykresie B – histogram grubości skrzepliny. Na wykresie C – dystrybuanta empiryczna, pokazująca prawdopodobieństwo tego, że grubość skrzepliny przyjmie wartość nie większą niż zadana.

Ryc. 17. Aktywność produktu genu *TAFI* [%], w zależności od genotypu *TAFI* -438G/A i grupy badanej. Na wykresie lewym mediany, kwartyle pierwszy i trzeci, obserwacje minimalne i maksymalne w grupie chorych z TAB. Na wykresie prawym – w grupie kontrolnej.

Ryc. 18. Średnie poziomy aktywności *TAFI* w zależności od genotypu *TAFI* -438G/A, w obu badanych grupach.

Ryc. 19. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty w grupie chorych oraz średnicą tętnicy prawidłowej, wyrażonych jako ASI [cm/m^2], a genotypem w polimorfizmie -455G/C genu *FGB*.

Ryc. 20. Zależność pomiędzy średnicą tętniaka aorty w grupie chorych oraz średnicą tętnicy prawidłowej, wyrażonych jako BMI_{index} [$\text{cm} \times \text{m}^2/\text{kg}$], a genotypem w polimorfizmie -455G/C genu *FGB*.

Ryc. 21. Prawdopodobieństwo (linia niebieska) tego, że osoba z populacji kontrolnej będzie homozygotą AA w miejscu polimorficznym -455G/C genu *FGB*, w zależności od jej wskaźnika ASI. Linia czerwoną zaznaczono to samo prawdopodobieństwo przy nieznanym ASI u tej osoby.

Ryc. 22. Prawdopodobieństwo, że grubość skrzepliny przyściennej będzie nie mniejsza niż 20 mm, w zależności od wskaźnika ASI, u kobiet i mężczyzn.

11. ZAŁĄCZNIKI

Spis załączników

Załącznik 1

Ankieta pacjenta operowanego z powodu tętniaka aorty brzusznej.

Załącznik 2

Informacja dla osób uczestniczących w badaniu naukowym.

Załącznik 3

Oświadczenie badanego. Zgoda na udział w badaniu.

Załącznik 4

Wczesne wykrywanie tętniaka aorty brzusznej – ankieta uczestnika badania.

Załącznik 5

Informacja dla uczestnika badania i formularz pisemnej świadomej zgody.

Załącznik 6

Formularz świadomej zgody na wykonanie molekularnych badań genetycznych.



Załącznik 1

**Ankieta pacjenta
 operowanego z powodu tętniaka aorty brzusznej**

Informacje ogólne							
Nazwisko i imię							
PESEL							
Płeć	mężczyzna <input type="checkbox"/>	kobieta <input type="checkbox"/>					
Waga [kg]							
Wzrost [cm]							
Tętniak aorty brzusznej	Średnica max	tętniak rozwarstwiający		tętniak pęknięty		tętniak zapalny	
[mm]	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
	Powierzchnia przekroju poprzecznego tętnika..... [mm ²]						
	Grubość skrzepliny przyściennej.....[mm]						
Leki stale przyjmowane	1. 2. 3. 4. 5.						
Czynniki ryzyka i choroby współistniejące							
Czy pali Pan/Pani papierosy?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	obecnie w przeszłości				
Czy pije Pan/Pani alkohol?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	rodzaj alkoholu			objętość /tydzień	
Czy choruje Pan/Pani na cukrzycę?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	jak długo: lat			
Czy choruje Pan/Pani na choroby układu krążenia?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	nadciśnienie tętnicze niskie ciśnienie inne			
Czy wystąpiła/ występuje u Pana/Pani choroba (operacja) serca?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zawał choroba niedokrwienna choroba wieńcowa dławica piersiowa dusznica bolesna rozrusznik by-passy			

Czy choruje Pan/Pani na miażdżycę tętnic?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Leriche`a mrowienie, drętwienie kończyn, ból ud/łydek/pośladków przychodzeniu ból ud/łydek/pośladków w spoczynku (w nocy), owrzodzenia, martwica kończyn, ból i „mdlenie” rąk zaburzenia przepływu krwi w tętnicach szyjnych, mózgowych, udar mózgu
Czy występują u Pani/Pana choroby nerek?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	niewydolność nerek, marskość, torbiele inne:
Czy występują u Pani/Pana choroby oczu?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zwichnięcie soczewki, jaskra, zaćma inne
Czy choruje Pan/Pani na osteoporozę?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	czas trwania choroby lat
Czy występują u Pani/Pana choroby genetyczne?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Marfana , hemofilia inne:.....
Czy wystąpiły choroby genetyczne w Pani/Pana rodzinie?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Marfana, hemofilia inne:.....
Czy występują u Pani/Pana choroby autoimmunologiczne?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	łuszczyca, choroba Leśniewskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stwardnienie rozsiane, zapalenie tarczycy Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, inne:.....
Czy wystąpiły choroby autoimmunologiczne w Pani/Pana rodzinie?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	łuszczyca, choroba Leśniewskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stwardnienie rozsiane, zapalenie tarczycy Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, inne:.....
Czy wystąpiła/występuje u Pani/Pana przepuklina?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	pachwinowa, udowa, pępkowa, kresy białej
Czy wystąpiła/występuje u Pani/Pana choroba tkanki łącznej (kolagenoza)	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, układowe zapalenia naczyń, twardzina, zespół Ehlersa i Danlosa, zespół Scharpa, zespół Sjögrena, inne:.....
Czy wystąpiła/występuje choroba tkanki łącznej (kolagenoza) w Pani/Pana rodzinie	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, układowe zapalenia naczyń, twardzina, zespół Ehlersa i Danlosa, zespół Scharpa, zespół Sjögrena, inne:.....

Czy wystąpiły/występują Choroby o podłożu immunologicznym	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	alergie niedobory immunologiczne.....
Czy występuje u Pani/Pana choroba nowotworowa?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	rodzaj:
Czy u Pani/Pana przeprowadzane były zabiegi operacyjne w obrębie jamy brzusznej?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	jakie:
Wywiad w kierunku zaburzeń hemostazy				
Czy występują u Pani/Pana krwawienia z nosa?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy występują u Pani/Pana krwiaki, wybroczyny lub siniaki?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy zaobserwował Pan/Pani długie krwawienia z rany ciętej lub otarć?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy w przeszłości doszło u Pana/Pani do intensywnego krwawienia po operacji?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy rany źle się goją?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy w przeszłości występowały lub występują u Pana/Pani choroby naczyń krwionośnych	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	żylaki, zapalenie żył powierzchniowych, głębokich, złe ukrwienie kończyn, bóle łydek przy chodzeniu
Czy w ostatnim czasie przyjmował Pan/Pani leki rozrzedzające krew?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	Acenokumarol Sintrom Warfin Inne
Czy w ostatnim czasie przyjmował Pan/Pani przeciwzakrzepowe i/lub przeciwagregacyjne?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	Polocard Acard Aspiryna Polopiryna Bestpiryn Ticlo Ifapidin Plavix Areplex Inne

Ankieta okołoperacyjna			
Data operacji:	Rodzaj operacji:		otwarta <input type="checkbox"/> wewnątrznaczyniowa <input type="checkbox"/>
Rodzaj protezy:			
Czas trwania operacji: h			
Leki podane przed zabiegiem	1. 2. 3.		
Leki podane po zabiegu	1. 2. 3.		
Powikłania śródoperacyjne			
Poziom utraty krwi podczas operacji: ml			
Czy zastosowano transfuzję?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	Przetoczono osocze: [jedn.] koncentrat krwinek czerwonych:[jedn.]
Inne:			
Powikłania pooperacyjne			
Czy wystąpiło nadmierne krwawienie (przez dren)	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/> ml/doba
Czy pacjent wymagał ponownej operacji? (np. pojawił się skrzep blokujący przepływ krwi w stentgrafcie/protezie naczyniowej/naczyniu krwionośnym, niedokrwienie kończyny, czy po operacji wystąpił przeciek do tętniaka lub objawy krwawienia do jamy brzusznej?..):	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	Opis:
Zalecenia pooperacyjne:			

.....
(Pieczętka i podpis lekarza)



**Informacja
dla osób uczestniczących w badaniu naukowym**

Ośrodek naukowy:

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy.
ul. Kamińskiego 73A, 51-124 Wrocław

Temat badania:

„Badania nad patomechanizmem rozwoju tętniaka aorty brzusznej z uwzględnieniem analizy klinicznej stanu pacjentów oraz stosowanych procedur medycznych w okresie okołooperacyjnym”

Projekt badawczy prowadzony przez zespół naukowy Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego ma na celu uzyskanie pełnej wiedzy na temat patogenezę i rozwoju tętniaka aorty brzusznej.

Tętniak aorty brzusznej jest chorobą przewlekłą, której jedyną metodą leczenia jest chirurgiczne wycięcie zmienionej tkanki naczynia lub interwencja endowaskularna. Przeprowadzane operacje często obarczone są ryzykiem wystąpienia powikłań, ze względu na podeszły wiek i choroby współistniejące pacjentów. Zespół składający się z lekarzy specjalistów w dziedzinie chirurgii naczyniowej oraz naukowców doświadczonych w badaniach klinicznych planuje włączenie do badań około 200 osób z tętniakiem aorty brzusznej.

Materiałem do badań będzie krew obwodowa pobrana od Pana/Pani w objętości ok. 20 ml równocześnie z pobraniem krwi do rutynowych badań diagnostycznych. Dodatkowo wykonane zostaną u Pana/Pani badania analityczne w zakresie oznaczeń krzepnięcia krwi takie jak: aPTT, INR, fibrynogen, aktywność antytrombiny III. Ponadto, okołooperacyjnie będą u Pana/Pani monitorowane funkcje płytek krwi z użyciem nowoczesnych metod diagnostycznych (aparat PFA-100, trombelastograf). Wyniki przeprowadzonych badań oraz informacje z przeprowadzonej z Panem/Panią ankiety pozwolą zespołowi lekarzy i naukowców na ocenę ryzyka wystąpienia krwawień okołooperacyjnych, które zagrażają życiu operowanych pacjentów. W pobranej od Pana/Pani krwi oznaczone zostanie także stężenie osoczowych parametrów związanych z procesami krzepnięcia, które prawdopodobnie biorą udział w powstawaniu i rozwoju tętniaka aorty brzusznej. U osób, które zostaną zakwalifikowane do operacji, krew do oznaczeń pobrana będzie przed zabiegiem, bezpośrednio po zabiegu oraz dwie doby po operacji.

Głównym celem realizowanego projektu jest podjęcie badań uzupełniających wobec aktualnego stanu wiedzy w zakresie poznania patomechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tętniaków aorty brzusznej. Efektem końcowym będzie ocena na poziomie biochemicznym i genetycznym wpływu nie przebadanych do tej pory czynników genetycznych i hemostatycznych na patofizjologię tętniaka aorty brzusznej. Równocześnie przeprowadzona zostanie analiza kliniczna stanu pacjentów poddanych zabiegom operacyjnym w celu modyfikacji standardowych procedur medycznych, stosowanych w okresie okołooperacyjnym.

Zaplanowane badania pozwolą na wdrożenie nowych metod leczenia tętniaka aorty brzusznej oraz opracowanie skutecznych procedur diagnostycznych umożliwiających wczesne wykrywanie tej choroby.

Osoba włączona do badania (Imię i Nazwisko) (podpis)
Lekarz prowadzący (Imię i Nazwisko) (podpis)





Załącznik 3

OŚWIADCZENIE BADANEGO
Zgoda na udział w badaniu

Osoba badana: (Nazwisko i imię)	
Wiek:	Adres:
Lekarz prowadzący badanie: (Pieczętka i podpis lekarza prowadzącego badanie)	
Temat badania: „Badania nad patomechanizmem rozwoju tętniaka aorty brzusznej z uwzględnieniem analizy klinicznej stanu pacjentów oraz stosowanych procedur medycznych w okresie okołoperacyjnym”	

W obecności świadka wyrażam pełną i świadomą zgodę na udział w/w badaniu i oświadczam, że zostałem poinformowany/poinformowana o celu zamierzonych badań oraz sposobie ich przeprowadzania.

Niniejszym oświadczam, że:

1. Rozumiem na czym badanie będzie polegać, do czego potrzebna jest moja zgoda i mam świadomość, że mogę odmówić zgody na udział lub cofnąć zgodę na każdym etapie realizacji projektu badawczego, co w żaden sposób nie wpłynie na dalsze moje leczenie.
2. Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych w zakresie niezbędnym do realizacji projektu badawczego, w którym biorę udział, z zastrzeżeniem poufności uniemożliwiającej identyfikację mojej osoby przez inne osoby prawne i fizyczne nie wymienione w protokole jako prowadzące badanie.
3. Zostałem/am szczegółowo poinformowany/na o warunkach ubezpieczenia mojego udziału w badaniach i przyjmuję te warunki.
4. Wyrażam zgodę na izolację i przechowywanie DNA, które zostanie wyizolowane z 5 ml pobranej ode mnie krwi.
5. Prowadzący badanie udzielił mi odpowiedzi na wszystkie zadane przeze mnie pytania.
6. Otrzymałem 1 egz. „Informacji dla osób uczestniczących w badaniu naukowym” i zapoznałem się z jego treścią.

Osoba włączona do badania	Dnia..... (podpis) (Telefon do kontaktu w sprawach medycznych)
Świadek	Dnia..... (podpis)	



Identyfikator

**Wczesne wykrywanie tętniaka aorty brzusznej
 – ankieta uczestnika badania**

Informacje ogólne			
Nazwisko i imię			
PESEL			
Płeć	mężczyzna <input type="checkbox"/>	kobieta <input type="checkbox"/>	
Waga [kg]			
Wzrost [cm]			
Leki stale przyjmowane	1. 2. 3. 4. 5. 6.		
Czynniki ryzyka i choroby współistniejące			
Czy pali Pan/Pani papierosy?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	obecnie w przeszłości
Czy pije Pan/Pani alkohol?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	rodzaj alkoholu objętość /tydzień
Czy choruje Pan/Pani na cukrzycę?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/> jak długo: lat
Czy choruje Pan/Pani na choroby układu krążenia?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/> nadciśnienie tętnicze niskie ciśnienie inne
Czy wystąpiła/występuje u Pana/Pani choroba (operacja) serca?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/> zawał choroba niedokrwienna choroba wieńcowa dławica piersiowa dusznica bolesna rozrusznik by-passy



Czy choruje Pan/Pani na miażdżycę tętnic?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Leriche`a mrowienie, drętwienie kończyn, ból ud/łydek/pośladków przy chodzeniu ból ud/łydek/pośladków w spoczynku (w nocy), owrzodzenia, martwica kończyn, ból i „mdlenie” rąk zaburzenia przepływu krwi w tętnicach szyjnych, mózgowych, udar mózgu
Czy występują u Pani/Pana choroby nerek?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	niewydolność nerek, marskość, torbiele inne:
Czy występują u Pani/Pana choroby oczu?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zwichnięcie soczewki, jaskra, zaćma inne
Czy choruje Pan/Pani na osteoporozę?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	czas trwania choroby lat
Czy występują u Pani/Pana choroby genetyczne?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Marfana , hemofilia inne:.....
Czy wystąpiły choroby genetyczne w Pani/Pana rodzinie?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	zespół Marfana, hemofilia inne:.....
Czy występują u Pani/Pana choroby autoimmunologiczne?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	łuszczyca, choroba Leśniewskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stwardnienie rozsiane, zapalenie tarczycy Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, inne:.....
Czy wystąpiły choroby autoimmunologiczne w Pani/Pana rodzinie?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	łuszczyca, choroba Leśniewskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, stwardnienie rozsiane, zapalenie tarczycy Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, inne:.....
Czy wystąpiła/występuje u Pani/Pana przepuklina?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	pachwinowa, udowa, pępkowa, kresy białej
Czy wystąpiła/występuje u Pani/Pana choroba tkanki łącznej (kolagenoza)	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, układowe zapalenia naczyń, twardzina, zespół Ehlersa i Danlosa, zespół Scharpa, zespół Sjögrena, inne:.....
Czy wystąpiła/występuje choroba tkanki łącznej (kolagenoza) w Pani/Pana rodzinie	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, układowe zapalenia naczyń, twardzina, zespół Ehlersa i Danlosa, zespół Scharpa, zespół Sjögrena, inne:.....

Czy wystąpiły/występują Choroby o podłożu immunologicznym	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	alergie niedobory immunologiczne.....
Czy występuje u Pani/Pana choroba nowotworowa?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	rodzaj:
Czy u Pani/Pana przeprowadzane były zabiegi operacyjne w obrębie jamy brzusznej?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	jakie:
Wywiad w kierunku zaburzeń hemostazy				
Czy występują u Pani/Pana krwawienia z nosa?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy występują u Pani/Pana krwiaki, wybroczyny lub siniaki?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy zaobserwował Pan/Pani długie krwawienia z rany ciętej lub otarć?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy w przeszłości doszło u Pana/Pani do intensywnego krwawienia po operacji?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy rany źle się goją?	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>		
Czy w przeszłości występowały lub występują u Pana/Pani choroby naczyń krwionośnych	TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>	NIE WIEM <input type="checkbox"/>	żylaki, zapalenie żył powierzchniowych, głębokich, złe ukrwienie kończyn, bóle łydek przy chodzeniu
Uwagi lekarza, choroby współistniejące oraz przebyte zabiegi i operacje nie ujęte w ankiecie				

.....
(Pieczętka i podpis lekarza)

Załącznik 5

INFORMACJA DLA UCZESTNIKA BADANIA I FORMULARZ PISEMNEJ ŚWIADOMEJ ZGODY

Tytuł badania

„Badania nad patomechanizmem rozwoju tętniaka aorty brzusznej z uwzględnieniem analizy klinicznej stanu pacjentów oraz stosowanych procedur medycznych w okresie okołoperacyjnym”

Ośrodek prowadzący badanie

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo – Rozwojowy
ul. H. Kamieńskiego 73a
51-124 Wrocław

Kierownik badania

Prof. dr hab. n. med. Wojciech Witkiewicz
Dyrektor Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo –
Rozwojowego

Może się zdarzyć, że w treści niniejszego formularza napotka Pan/Pani słowa, których znaczenie nie będzie Panu/Pani znane. Proszę poprosić lekarza prowadzącego badanie lub personel badania o wyjaśnienie wszystkich niezrozumiałych słów lub zdań.

Wprowadzenie

Został Pan/Pani poproszony/a o dobrowolne wzięcie udziału w badaniu naukowym dotyczącym poszukiwania przyczyn powstawania tętniaka aorty brzusznej. Proponujemy Panu/Pani udział w badaniu, ponieważ ukończył/a Pan/Pani 60 lat i dotąd nie stwierdzono u Pana/Pani występowania tętniaka aorty brzusznej. Badanie zostało zorganizowane i jest współfinansowane przez projekt WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie wyjaśniają, na czym będzie polegał Pana/Pani udział w badaniu. Po przeczytaniu informacji i wyrażeniu zgody na udział w badaniu zostanie Pan/Pani poproszony/a o podpisanie formularza świadomej zgody.

Otrzyma Pan na własność egzemplarz niniejszej informacji dla pacjenta i formularza świadomej zgody.

Cel badania

Projekt badawczy prowadzony przez zespół naukowy Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowego ma na celu uzyskanie pełnej wiedzy na temat patogenezy i rozwoju tętniaka aorty brzusznej. Tętniak aorty brzusznej jest nadmiernym poszerzeniem naczynia leżącego w obrębie jamy brzusznej i występuje najczęściej u mężczyzn powyżej 60 roku życia. Jest to choroba przewlekła, której jedyną metodą leczenia jest chirurgiczne wycięcie zmienionej tkanki aorty lub interwencja endowaskularna. Głównym celem realizowanego projektu jest podjęcie badań uzupełniających wobec aktualnego stanu wiedzy w zakresie poznania patomechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tętniaków aorty brzusznej. Efektem końcowym będzie ocena na poziomie biochemicznym i genetycznym wpływu nieprzebadanych do tej pory czynników genetycznych i hemostatycznych na patofizjologię tętniaka aorty brzusznej. Równocześnie przeprowadzona zostanie analiza kliniczna stanu osób włączonych do badania. Zaplanowane badania pozwolą na wdrożenie nowych metod leczenia tętniaka aorty brzusznej oraz opracowanie skutecznych procedur diagnostycznych umożliwiających wczesne wykrywanie tej choroby.

Procedury badania

Całkowity czas badania powinien zająć Panu/Pani od około 30 min do 1 godziny.

Jeśli spełnia Pan/Pani kryteria, wyrazi chęć udziału w badaniu i własnoręcznie podpisze i datuje formularz zgody, zostanie przeprowadzona ocena ogólnego stanu Pani/Pana zdrowia. Ocena będzie obejmować wywiad medyczny oraz badanie USG brzuszego odcinka aorty. Zostaną również od Pana/Pani pobrane próbki krwi.

Wywiad lekarski

Zostanie Pan/Pani zapytany/a o wszelkie dolegliwości medyczne, które u Pani/Pana występują, czynniki ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, leki które Pan/Pani przyjmuje.

Jest bardzo ważne, aby udzielił/a Pan/Pani lekarzowi całkowicie szczyrych informacji na temat swojego stanu zdrowia. Wszelkie uzyskane od Pana/Pani informacje będą traktowane jako poufne zgodnie z obowiązującym prawem. Żadne osoby trzecie nie będą mogły dokonać identyfikacji Pana/Pani danych medycznych.

Pobranie krwi

Następnie zostanie Pan/Pani poproszona/y o oddanie próbek krwi do badań naukowych. Z żyły Pana/Pani ramienia zostanie pobrana krew o objętości około 15 ml (około 3 łyżeczki od herbaty). W przypadku większości osób wkłucie igły w celu pobrania krwi nie wiąże się z żadnymi poważnymi problemami zdrowotnymi. Po pobraniu krwi może u Pana/Pani wystąpić niewielki ból, zaczerwienienie lub zasinienie. W rzadkich przypadkach może nastąpić zamroczenie, omdlenie lub dojść do infekcji w miejscu wkłucia.

Jeśli podpisze Pan/Pani oddzielną świadomą zgodę na badania DNA, wówczas pobrane zostaną około 2 łyżeczki od herbaty krwi (10 ml).

Pobrane od Pana/Pani próbki krwi pozostaną w tutejszym ośrodku badawczym i będą przetwarzane i przechowywane w sposób uniemożliwiający ustalenie Pana/Pani tożsamości.

Badanie ultrasonograficzne (USG)

W trakcie wizyty zostanie Panu/Pani wykonane badanie ultrasonograficzne (USG) brzuszego odcinka aorty. Jest to nieszkodliwa i bezbolesna metoda uwidaczniania aorty brzusznej i pomiaru średnicy aorty. Podczas badania USG zostanie Pan/Pani poproszony/a o położenie się i odsłonięcie brzucha, następnie po nałożeniu niewielkiej ilości żelu, lekarz przesuując głowicą aparatu oceni i zmierzy średnicę Pana/Pani aorty brzusznej. Bezpośrednio po wykonaniu badania otrzyma Pan/Pani wynik pomiaru.

Najprawdopodobniej wynik pomiaru będzie prawidłowy i nie zostanie u Pana/Pani wykryty tętniak aorty brzusznej. Jeśli jednak okaże się, że Pana/Pani aorta jest poszerzona, to w zależności od rozmiarów poszerzenia zostanie Pan/Pani skierowany na okresowe kontrole USG (w przypadku niewielkiego tętniaka) lub na powtórne badanie w Poradni Chirurgii Naczyniowej, w celu potwierdzenia wyniku i ustalenia dalszego postępowania leczniczego.

FORMULARZ PISEMNEJ ŚWIADOMEJ ZGODY

Tytuł badania

„Badania nad patomechanizmem rozwoju tętniaka aorty brzusznej z uwzględnieniem analizy klinicznej stanu pacjentów oraz stosowanych procedur medycznych w okresie okołoperacyjnym”

Podpisując niniejszy formularz świadomej zgody potwierdzam, że:

- przeczytałem informację dla pacjenta – wersja z dnia 27 czerwca 2014 roku i zrozumiałem jej treść,
- otrzymałem egzemplarz informacji dla pacjenta i formularza zgody dotyczący tego badania,
- udzielono mi zadowalającej odpowiedzi na wszystkie zadane przeze mnie pytania,
- dobrowolnie wyrażam zgodę na wzięcie udziału w badaniu, przestrzeganie procedury badania i udzielenie wszelkich wymaganych informacji lekarzowi, pielęgniarkom lub innym członkom zespołu przeprowadzającego badanie oraz gromadzenie i elektroniczne przetwarzanie moich danych osobowych, jak również na archiwizację moich zakodowanych danych osobowych,
- rozumiem, że niektóre z pobranych ode mnie próbek krwi będą służyły do zbadania mojej krwi pod kątem zawartości składników, które mogą być związane z występowaniem tętniaka aorty brzusznej,
- zezwalam na wykorzystanie próbek krwi pozostałych pod koniec badania w późniejszym terminie, do dalszych analiz, które mogą pomóc w lepszym zrozumieniu przyczyn powstawania chorób sercowo-naczyniowych.

Imię i nazwisko uczestnika <i>(drukowanymi literami)</i>	Podpis	Data
Imię i nazwisko badacza uzyskującego świadomą zgodę	Podpis	Data

Załącznik 6

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA WYKONANIE MOLEKULARNYCH BADAŃ GENETYCZNYCH

Dane uczestnika badania

Imię	
Nazwisko	
PESEL	

OŚWIADCZENIE

Niniejszym wyrażam zgodę na pobranie ode mnie krwi w celu izolacji DNA, zabezpieczenie materiału genetycznego i wykonanie molekularnych badań, mających na celu identyfikację zmian w DNA, które mogą wpływać na powstawanie i rozwój tętniaka aorty brzusznej.

Wyrażam zgodę na przechowywanie, z zachowaniem warunków anonimowości, izolowanego DNA po zakończeniu projektu badawczego i wykorzystanie mojego DNA do badań naukowych, mających na celu rozszerzenie wiedzy na temat molekularnego podłoża chorób genetycznych.

Zgadzam się na informowanie mnie w przyszłości o wynikach badań naukowych wtedy, gdy mogłyby one stanowić podstawę do rozpoznania choroby genetycznej, zwiększonego ryzyka jej rozwoju lub udzielenia porady genetycznej.

.....
Data

.....
Czytelny podpis (imię i nazwisko)

.....
(Pieczętka i podpis lekarza kierującego)