DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(3)-02

УДК: 616.12-008.331.1:575.113(477.44)

ФЕНОТИПОВА РЕАЛІЗАЦІЯ СИНГЛНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ RS950880 ГЕНА IL1RL1 У ЗДОРОВИХ МЕШКАНЦІВ ВІННИЧЧНИ

Багрий Д. А., Старжинська О. Л., Жебель В. М.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: dmitriybagriy@ukr.net

Статтю отримано 05 липня 2021 р.; прийнято до друку 06 серпня 2021 р.

Анотація. Розчинний стимулюючий фактор росту (sST2) - новий біомаркер, який віднедавна досить успішно застосовується у кардіології, проте, без урахування можливої генетичної складової його продукції. Метою дослідження була оцінка плазматичного рівня sST2 та інших аспектів фенотипової реалізації синглнуклеотидного поліморфізму (SNP) rs950880 гена IL1RL1 у чоловіків без ознак серцево-судинних захворювань, мешканців Подільського регіону України. Обстежено 70 чоловіків, які відповідали критеріям включення/не включення у дослідження, застосовані загально-клінічні, лабораторні та інструментальні методи. Генотипування варіантів SNP rs950880 гена IL1RL1 проводили з використанням алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції, концентрацію sST2 у плазмі крові досліджували з використанням методу імуноферментного аналізу. Математичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням стандартного статистичного пакету Statistica 12.0. Середня концентрація sST2 у плазмі крові чоловіків без ознак серцево-судинних захворювань становить $22,14 \pm 0,86$ нг/мл. Встановлено, що серед чоловіків без серцево-судинних захворювань, мешканців Поділля, найбільш поширені носії алелю С та варіантів CC та CA SNP rs950880 гена IL1RL1, носії варіанту AA зустрічаються учетверо рідше ($p < 0,05$). Визначено, що основною фенотиповою особливістю SNP rs950880 гена IL1RL1 є вищий плазматичний рівень sST2 у гомозигот CC ($23,34 \pm 1,22$ нг/мл) у порівнянні з гетерозиготами AA ($18,13 \pm 0,85$ нг/мл, $p < 0,01$). Отримані результати стануть підґрунтям для подальших досліджень фенотипової реалізації SNP rs950880 гена IL1RL1 у хворих з серцево-судинною патологією, зокрема, з есенціальною гіпертензією різної тяжкості.

Ключові слова: розчинний ST2, SNP rs950880 гена IL1RL1, чоловіки без серцево-судинних захворювань.

Вступ

Серцево-судинна патологія впевнено лідирує у рейтингах захворюваності та смертності як в Україні, так і у більшості країн світу [9]. Найбільша частка кардіоваскулярних смертей є, у тій чи іншій мірі, результатом ускладненого перебігу артеріальної гіпертензії (АГ). Актуальним напрямком сучасної кардіології є розробка біомаркерних стратегій діагностики та прогнозування перебігу різних кардіоваскулярних захворювань. Очевидно, що застосування біомаркерів спрощує та здешевлює обстеження, особливо скринінгові. Проте, розробити ефективні стратегії використання біомаркерів можливо за певних умов. Однією з перших умов є чітко визначена задіяність біомаркера у ланцюгу патологічного процесу. Цій умові беззаперечно відповідає пептид з сімейства рецепторів до інтерлейкіну 1 - стимулюючий фактор росту ST2 (sST2). У складі системи IL-33/ST2, яка розташована на мембранах кардіоміоцитів, фібробластів та ендотеліальних клітин, пептид задіяний у процеси відповіді міокарда на пошкодження [11]. Отже, з точки зору патогенетичної обумовленості, sST2 може бути ефективно використаний маркер пошкодження серця при серцево-судинних захворюваннях, зокрема, його ремоделювання при АГ. Така гіпотеза була підтверджена у низці експериментальних та клінічних досліджень. В експерименті довели, що концентрація sST2 суттєво зростає у крові тварин із змодельованим інфарктом міокарда, при переважанні тиском лівого шлуночка (ЛШ) [7, 11]. У ході клінічних досліджень показа-

ли, що рівень sST2 можна успішно використовувати для прогнозування перебігу інфаркту міокарді, гострої та хронічної серцевої недостатності [1, 5, 12, 14]. Низка робіт присвячена детальному вивченню концентрації пептиду у зв'язку з процесами ремоделювання міокарда при АГ, проте, їх результати досить неоднозначні, а питання межового рівня для діагностики ступеня гіпертензивного пошкодження серця залишається відкритим [2, 4, 10, 13]. Пропонований біомаркер повинен надавати конкретну, точну, добре відтворювану інформацію, а це неможливо без чіткого уявлення про рівень пептиду у крові здорових осіб та можливі сторонні фактори, які на нього впливають: стать, вік, стан функції нирок тощо. Даних про концентрацію sST2 у крові осіб без серцево-судинних захворювань, з урахуванням різних особливостей, небагато. Також, необхідно врахувати і генетичну складову продукції sST2 за найбільш перспективним SNP rs950880 гена IL1RL1, з експресією якого пов'язують майже 40% варіабельність рівня пептиду у плазмі крові [6]. Фенотипова реалізація SNP rs950880 гена IL1RL1, у тому числі, за концентрацією sST2, у когорті здорових майже не досліджена.

Метою дослідження була оцінка плазматичного рівня sST2 та інших аспектів фенотипової реалізації SNP rs950880 гена IL1RL1 у чоловіків без ознак серцево-судинних захворювань мешканців Подільського регіону України.

Матеріали та методи

Для досягнення поставленої мети обстежено 70 чоловіків без серцево-судинних захворювань. Будь-які процедури дослідження починали лише після підписання учасниками Інформованої згоди про участь у науковому дослідженні та про обробку персональних даних, документи були затверджені локальною етичною комісією. Враховували наступні критерії включення: вік від 40 до 60 років; чоловіча стать; проживання на території Вінницької області у третьому поколінні (для дотримання правил генетичного дослідження залучали етнічно однорідних учасників, які проживають на відстані понад 5 км одне від одного та не є родичами, визначали за допомогою відповідного анкетування). Критеріями виключення з дослідження були: вік молодше 40 або старше 60 років; родинні зв'язки з будь-яким іншим учасником дослідження; ознаки будь-яких захворювань серцево-судинної системи; заздалегідь відомі ендокринні захворювання, хвороби системи крові, хронічне обструктивне захворювання легень, бронхіальна астма, системні захворювання сполучної тканини; порушення функцій нирок, печінки. Усі учасники дослідження підлягали загально-клінічному обстеженню з визначенням антропометричних параметрів, вимірюванням артеріального тиску, визначенням основних лабораторних показників, реєстрацією електрокардіограми. Також усім було проведено ехокардіографічне обстеження за стандартним протоколом.

Поширеність варіантів SNP rs950880 гена IL1RL1 визначали з використанням алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Концентрацію sST2 у плазмі крові досліджували з використанням методу імуноферментного аналізу за допомогою набору реактивів фірми "RayBiotech, Inc" (США) та апарату для проведення ІФА "Humareader single" (Німеччина).

Математичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням стандартного статистичного пакету Statistica 12.0. Кількісні показники подавали у вигляді середнього арифметичного (М) з похибкою середнього арифметичного значення (m). Для показників, які розподілялися за законом нормального розподілу, використовували параметричні методи для незв'язаних вимірювань, для оцінки показників, розподілення яких не відповідало закону нормального розподілу, застосовували непараметричні методи.

Результати. Обговорення

При аналізі основних клінічних характеристик досліджуваної групи встановили, що середній вік учасників складає $48,81 \pm 0,78$ років. Серед обстежуваних переважали особи без ожиріння: з нормальною масою тіла 29 чоловіків (41,43%), з надмірною масою - 33 (47,14%), з ожирінням І ст. - 8 (11,43%). Абдомінальне ожиріння виявили у 25 чоловіків (35,71%). Обтяжену щодо кардіоваскулярних захворювань спадковість мали 22 особи

(31,43%). У ході аналізу показників АТ визначили, що 19 осіб (27,14%) мали оптимальний рівень АТ, 31 чоловік (44,29%) - нормальний рівень АТ, 20 осіб (28,57%) - високий нормальний рівень АТ. Загалом цифри АТ, ехокардіографічні параметри, показники системної та внутрішньосерцевої гемодинаміки у обстежуваних не виходили за межі загальноновизначених нормативних показників для чоловіків даної вікової групи.

На першому етапі вивчали поширеність SNP rs950880 гена IL1RL1 у досліджуваній групі. За частотним розподілом варіантів SNP rs950880 досліджувана вибірка знаходиться у рівновазі Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 0,06$, $p = 0,81$). Аналіз поширеності поліморфізму SNP rs950880 гена IL1RL1 показав, що серед чоловіків без серцево-судинних захворювань достовірно частіше зустрічається алель С - 67,14% ($p < 0,05$), носіїв алелю А удвічі менше - 32,86% (рис. 1). За частотним розподілом варіантів SNP rs950880, гомозиготний варіант CC зустрічається у 45,72% осіб, гетерозиготний варіант CA - у 42,86% чоловіків, гомозиготний варіант AA визначають у 4 рази рідше - у 11,42% випадків ($p < 0,05$) (див. рис. 1).

Отже, серед чоловіків без ознак серцево-судинних захворювань, мешканців Поділля, домінують носії алелю С.

Рис. 1. Поширеність SNP rs950880 гена IL1RL1 серед чоловіків без серцево-судинних захворювань, мешканців Вінницької області, (%).

Примітка: * - відмінність достовірна, $p < 0,05$.

Наступним кроком проаналізували поширеність одонуклеотидного поліморфізму rs950880 гена IL1RL1 у зв'язку з обтяженою щодо серцево-судинних захворювань спадковістю. Встановили, що серед чоловіків з обтяженою спадковістю гомозигот CC удвічі більше (50,00%), ніж серед гомозигот AA (22,00% $p < 0,05$). Таким чином, носійство варіанту CC може асоціюватися з обтяженою щодо серцево-судинних захворювань спадковістю.

Досліджень поширеності SNP rs950880 гена IL1RL1 одиниці, для порівняльного аналізу доступні результати, отримані тайванськими дослідниками [8]. Варто відзначити, що науковці вивчали частотний розподіл SNP rs950880 у досить гетерогенній групі різної статі, включили і практично здорових осіб, і пацієнтів з клінічними ознаками коронарного та периферійного атеросклерозу. Разом з тим, дослідження було досить масштабним - обстежено 1219 жителів Тайваню. За його результатами встановили, що 30,52% осіб мають гомозиготний варіант CC, 50,62% - варіант CA та 18,46% мають гомозиготний варіант AA SNP rs950880. Отже, як серед мешканців Вінницької області, так і серед тайванців, переважають носії алелю C, а гомозиготи AA зустрічаються найрідше.

За даними літератури фенотипові реалізація SNP rs950880 гена IL1RL1 у першу чергу стосується рівня sST2, хоча подібних робіт вкрай мало [6, 8]. Спочатку проаналізували плазмову концентрацію пептиду загалом у досліджуваній групі та встановили, що середній рівень пептиду у чоловіків без серцево-судинних захворювань складає $22,14 \pm 0,86$ нг/мл. Схожі результати для здорових осіб отримали й інші дослідники. Разом з тим, у низці робіт повідомляється про статеві відмінності у продукції пептиду: багатьма авторами встановлено, що концентрація sST2 у плазмі крові чоловіків вища, ніж у жінок. Так, E. E. Coglianese et al. (2013), наприклад, повідомляє, що концентрація sST2 у плазмі крові практично здорових чоловіків становить 23,5 нг/мл, а у жінок - 19,5 нг/мл [3]. Українські ж науковці щодо когорти нормотензивних жінок отримали середній рівень 25,4 нг/мл - показник близький до результатів, отриманих нами у групі чоловіків [13]. Звичайно, можливі статеві відмінності у продукції пептиду необхідно враховувати, застосовуючи sST2 як кардіомаркер, це питання потребує подальшого вивчення. Взагалі вважається, що sST2 є найкраще відтворюваним біомаркером у порівнянні з іншими, які використовують у кардіології. За нашими результатами плазмовий рівень пептиду у чоловіків без серцево-судинних захворювань не корелює з віком ($R = -0,09$, $p = 0,30$), не модифікується станом функції нирок ($R = -0,05$, $p = 0,54$), не залежить від маси тіла ($R = +0,03$, $p = 0,71$) чи інших антропометричних параметрів. Рівень sST2 у крові чоловіків з ожирінням ($21,95 \pm 2,25$ нг/мл) достовірно не відрізняється від показника у загальній групі ($p \geq 0,05$). Отже, рівень пептиду у плазмі крові дійсно має невисоку мінливість як у однієї людини, так і у однорідних, наприклад, за статтю чи станом здоров'я, групах. Також встановлено, що у чоловіків без серцево-судинних захворювань, плазмова

Таблиця 1. Рівень sST2 у плазмі крові чоловіків без ознак серцево-судинних захворювань, носіїв різних варіантів SNP rs950880 гена IL1RL1, ($M \pm m$).

Групи	Рівень sST2, нг/мл ($M \pm m$)
1. Гомозиготи CC (n=32)	$23,34 \pm 1,22$
2. Гетерозиготи CA (n=30)	$21,94 \pm 1,47$
3. Гомозиготи AA (n=8)	$18,13 \pm 0,85$
$p < 0,05$ або $*p < 0,01$	p_{3-1}

концентрація sST2 не корелює з цифрами АТ ($R = +0,13$, $p = 0,29$) чи ехокардіографічними параметрами структури та функції серця.

У ході подальшого аналізу рівня пептиду у носіїв різних варіантів SNP rs950880 встановили, що чоловіки без серцево-судинних захворювань гомозиготи CC мають достовірно вищий плазмовий рівень sST2, ніж гомозиготи AA (табл. 1). Ймовірно, особливістю фенотипової реалізації SNP rs950880 є різний рівень продукції sST2: вищий у гомозигот CC та нижчий у гомозигот AA.

Наші дані відповідають літературним та є подібними до результатів, отриманих у інших популяціях. J-F. Lin et al. (2017), також показали, що носії гомозиготного варіанту AA мають достовірно нижчий рівень sST2 у крові практично здорових осіб у тайській популяції [8]. J.E. Ho et al. (2013) продемонстрували, що плазмова концентрація пептиду у гомозигот CC на 43% вища, ніж у гомозигот AA для мешканців північної та західної Європи [6].

За експериментальними даними пептид працює як своєрідна пастка для системи кардіопротекції IL-33/ST2 на мембранах кардіоміоцитів [11], і підвищення його концентрації у носіїв CC варіанту SNP rs950880 може асоціюватися з певними змінами структури чи функції серця.

Отже, на наступному етапі проаналізували ехокардіографічні параметри структури та функції серця у носіїв різних варіантів SNP rs950880 гена IL1RL1. Встановили, що наявність алельного поліморфізму досліджуваного гена ніяким чином не асоційована з структурно-функціональними параметрами серця у чоловіків без серцево-судинних захворювань. Усі показники знаходяться у межах норми та не відрізняються достовірно у носіїв різних варіантів генотипу.

Таким чином, SNP rs950880 гена IL1RL1 обмежують-ся варіабельністю плазмової концентрації sST2 у носіїв різних варіантів і не реалізуються у будь-які зміни структури чи функції серця у здорових чоловіків.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У частотному розподілі SNP rs950880 гена IL1RL1 серед чоловіків без серцево-судинних захворювань, мешканців Поділля, домінують носії алелю C. Причому, носійство гомозиготного варіанту CC асоціюється з обтяженою щодо серцево-судинних захворювань спадковістю.

2. Рівень sST2 у чоловіків без серцево-судинних захворювань не корелює з віком, антропометричними па-

раметрами чи станом функції нирок.

3. Фенотиповим проявом різних варіантів SNP rs950880 гена IL1RL1 є достовірно вищий плазмовий рівнем sST2 у гомозигот CC у порівнянні з гомозиготами AA. При цьому, будь-які зміни структури чи функції серця у здорових чоловіків не спостерігаються.

Отримані результати стануть підґрунтям для подальших досліджень фенотипової реалізації SNP rs950880 гена IL1RL1 у хворих з серцево-судинною патологією, зокрема, з есенціальною гіпертензією різної тяжкості.

Список посилань - References

- [1] Aimo, A., Maisel, A. S., Castiglione, V. J., & Emdin, M. (2019). sST2 for outcome prediction in acute heart failure: which is the best cutoff? *J Am Coll Cardiol*, 74(3), 478-479. doi: 0.1016/j.jacc.2019.03.527
- [2] Barnett, O., Polyetayeva, K., Halkevych, M., Lutsiv, N., Hrytsak, R., Blazhivska, I., ... & Kumurzhii, S. (2018). Novel marker of myocardial remodeling ST2 and the influence of aldosterone antagonist in patients with heart failure caused by hypertension and ischemic heart disease. *Journal of Hypertension*, 36, e163. DOI: 10.1097/01.hjh.0000539442.96104.62
- [3] Coglianese, E. E., Larson, M. G., Vasan, R. S., Ho, J. E., Ghorbani, A., McCabe, E. L., ... & Januzzi, J. L. (2012). Distribution and clinical correlates of the interleukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study. *Clinical Chemistry*, 58(12), 1673-1681. doi: 10.1373/clinchem.2012.192153
- [4] Denfeld, Q. E., Faulkner, K. M., Davis, M. R., Habecker, B. A., Chien, C. V., Gelow, J. M., ... & Lee, Ch. S. (2021). Exploring gender differences in trajectories of clinical markers and symptoms after left ventricular assist device implantation. *Eur J Cardiovasc Nurs*, Jun 3, zvab032. doi: 10.1093/eurjcn/zvab032
- [5] Grakova, E. V., Teplyakov, A. T., Kopyeva, K. V., Akhmedov, Sh. D., Ogurkova, O. N., & Soldatenko, M. V. (2018). Прогностическая роль нового биомаркера ST2 в оценке риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной и промежуточной фракцией выброса, перенесших реваскуляризацию миокарда [Prognostic role of the new ST2 biomarker in assessing the risk of adverse cardiovascular events in patients with chronic heart failure with preserved and intermediate ejection fraction, who underwent myocardial revascularization]. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика - Cardiovascular Therapy and Prevention*, 17(5), 40-46. <http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2018-5-40-46>
- [6] Ho, J. E., Chen, W.-Y., Chen, M.-H., Larson, M. G., McCabe, E. L., Cheng, S., ... & Wang, Th. J. (2013). Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J Clin Invest*, 123(10), 4208-4218. doi:10.1172/JCI67119
- [7] Kakkar, R., & Lee, R. T. (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 827-840. DOI: 10.1038/NRD2660
- [8] Lin, J.-F., Wu, S., Juang, J.-M. J., Chiang, F.-T., Hsu, L.-A., Teng, M.-Sh., Cheng, Sh.-T., ... & Ko, Y.-L. (2017). IL1RL1 single nucleotide polymorphism predicts sST2 level and mortality in coronary and peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, 257(2), 71-77. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.12.020
- [9] Murray, Ch. J. L., Aravkin, A. Y., Zheng, P., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari M., ... & Lim, S. S. (2020). Global Burden of Disease 2019 Risk Factor Collaborators. *Lancet*, 396, 1135-59. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2)
- [10] Ojji, D. B., Lecour, S., Adeyemi, O. M., & Sliwa, K. (2017). Soluble ST2 correlates with some indicators of right ventricular function in hypertensive heart failure. *Vasc Health Risk Manag.*, 13, 311-316. doi: 10.2147/VHRM.S127430
- [11] Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., ... & Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23, 479-90. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015
- [12] Shlevkov, N. B., Gasparyan, A. Zh., Zhambeev, A. A., Salami, Kh. F., Guseva, E. V., Tarasovsky, G. S., ... & Golitsyn, S. P. (2021). Растворимый рецептор подавления туморогенности второго типа (sST2) - новый потенциальный биомаркер положительных результатов применения сердечной ресинхронизирующей терапии и модуляции сердечной сократимости у больных хронической сердечной недостаточностью [Soluble receptor for suppressing tumorigenicity of the second type (sST2) is a new potential biomarker of positive results of cardiac resynchronization therapy and modulation of cardiac contractility in patients with chronic heart failure]. *Альманах клинической медицины - Almanac of Clinical Medicine*, 49(2), 99-112. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-025
- [13] Sokolova, M. V. (2019). Динаміка показників деформації лівого шлуночка та маркерів кардіального ремоделювання ST-2 і кардіотрофіну-1 у жінок із гіпертонічною хворобою в постменопаузі під впливом комбінованої антигіпертензивної терапії [Dynamics of left ventricular deformities and markers of cardiac remodeling ST-2 and cardiotrophin-1 in postmenopausal women with hypertension under the influence of combination antihypertensive therapy]. *Клінічна та експериментальна патологія - Clinical and experimental pathology*, 3(69), 70-77. http://nbuv.gov.ua/UJRN/kep_2019_18_3_14
- [14] Thøgersen, M., Frydland, M., Lerche Helgestad, O. K., Okkels, J. L., Josiassen, J., Goetze, J. P., ... & Hassager, Ch. (2021). Admission biomarkers among patients with acute myocardial-infarction related cardiogenic shock with or without out-of-hospital cardiac arrest An exploratory study. *Biomarkers*, 7(14), 1-21. doi: 10.1080/1354750X.2021.1955975

PHENOTYPIC REALIZATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM RS950880 OF IL1RL1 GENE IN HEALTHY INHABITANTS OF VINNYTSIA REGION.

Bahrij D. A., Starzhyn'ska O. L., Zhebel' V. M.

Annotation. Soluble growth stimulating factor (sST2) is a new biomarker that has recently been used quite successfully in cardiology. However, the possible genetic component of peptide production has not been sufficiently studied. The aim of the study was to assess the plasma level of sST2 and other aspects of the phenotypic implementation of single nucleotide polymorphism (SNP) rs950880 of the IL1RL1 gene in men without cardiovascular disease in the Podillia region, Ukraine. 70 men who met the criteria for inclusion/non-

inclusion in the study were examined, general clinical, laboratory and instrumental methods were used. Genotyping of SNP rs950880 variants of the IL1RL1 gene was performed using an allele-specific polymerase chain reaction, the concentration of sST2 in blood was investigated using the method of enzyme-linked immunosorbent assay. Mathematical processing of the obtained results was performed using the standard statistical package Statistica 12.0. The mean concentration of sST2 in the plasma of men without signs of cardiovascular disease is 22.14 ± 0.86 ng/ml. It was found that among men without cardiovascular diseases, residents of Podillia, the most common carriers of the C allele and variants of CC and CA SNP rs950880 of the IL1RL1 gene, carriers of variant AA are four times less common ($p < 0.05$). It was determined that the main phenotypic feature of SNP rs950880 of the IL1RL1 gene is a higher plasma level of sST2 in CC homozygotes (23.34 ± 1.22 ng/ml) compared with AA homozygotes (18.13 ± 0.85 ng/ml, $p < 0.01$). The obtained results will be the basis for further studies of the phenotypic implementation of the SNP rs950880 gene of the IL1RL1 gene in patients with cardiovascular pathology, in particular, with essential hypertension.

Keywords: soluble ST2, SNP rs950880 of the IL1RL1 gene, men without cardiovascular diseases.