

Mendelovské randomizační studie: princip a příklady využití v oblasti kardiovaskulární medicíny

Mendelian randomisation studies: principle and selected examples from cardiovascular medicine

Jaroslav A. Hubáček^{1,2}

¹Centrum experimentální medicíny, IKEM, Praha

²III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze

✉ Ing. Jaroslav A. Hubáček, CSc., DSc. | jahb@ikem.cz | www.ikem.cz

Doručeno do redakce | Doručené do redakcie | Received 28. 7. 2020

Přijato po recenzi | Prijaté po recenzii | Accepted 18. 8. 2020

Souhrn

Mendelovské randomizace jsou studie, které v posledních letech zažívají nebývalý boom, ačkoli jejich princip je známý delší dobu. Jejich rozvoj umožnilo popsání sekvence lidského genomu a odhalení stovek variant v genech spojených s hodnotami potenciálních rizikových faktorů (RF) kardiovaskulárních onemocnění (KVO). Mendelovské randomizační studie umožňují rozhodnout, zda daný vztah mezi rizikovým faktorem (RF) a onemocněním je kauzální, nebo zda se jedná pouze o asociaci. Principem je využití funkčních genetických variant spojených s hodnotami sledovaného rizikového faktoru. Pokud se alela spojená s RF vyskytuje častěji i mezi nemocnými, jedná se o kauzální vztah. Pokud je varianta spojena s RF, nikoli však s onemocněním, pak kauzalita „parametr → nemoc“ neplatí. Pomocí MR tak byla např. prokázána kauzalita mezi hladinami triglyceridů a KVO nebo mezi terapií statiny a zvýšeným rizikem onemocnění diabetes mellitus 2. typu (DM2T). Byl tak vyvrácen i mýtus o protektivním účinku konzumace alkoholu na KVO, a naopak potvrzen protektivní vliv omega-6 nenasycených mastných kyselin. Naopak hodnoty HDL-cholesterolu či hladiny CRP nebyly jako kauzální pro rozvoj KVO prokázány. Tato zjištění mohou mít zásadní dopad na léčbu – farmakoterapie nekauzálních faktorů selhává a může být potenciálně i nebezpečná.

Klíčová slova: celogenomová asociační studie (GWAS) – genetika – kardiovaskulární onemocnění (KVO) – mendelovská randomizace – predikce

Summary

Mendelian randomizations (MR) are studies that have been experiencing an unprecedented boom in last decade, although the principle is known for almost half of century. The sequencing of human genome and GWAs studies help us to understand the genetic mosaic of human diseases and has identified a hundreds of variants associated with cardiovascular disease. The fundament of mendelian randomization is to use a genetic marker to investigate, if there is a causal relationship between a biomarker and risk of disease. The principle is that, if genetic marker is associated with level of the biomarker, it needs to be in similar extent associated also with the disease risk and the causal relationship is confirmed. If the biomarker is genotype-associated but not disease-related, then the causality “parameter → disease” does not apply. For example, causality between plasma triglycerides and CVD risk or between statin therapy and an increased risk of T2DM has been proved by MR. In contrast, HDL-cholesterol levels or CRP levels have not been proven causal for CVD development. The myth of the protective effect of alcohol consumption on CVD risk was disproved. These findings may have a major impact on treatment – pharmacotherapy of non-causal factors will fails and can be even dangerous for the patients.

Key words: CVD – genetic – genome wide association studies (GWAS) – mendelian randomization – prediction

Úvod

Ateroslérou podmíněné kardiovaskulární onemocnění (KVO) je v civilizovaných zemích nejčastější příčinou úmrtí [1]. Dosud bylo popsáno několik set „rizikových“ faktorů (RF) ve spojitosti s KVO [2]. Které z RF jsou kauzální, a které jsou s KVO pouze asociovány nebo jsou dokonce následkem existujícího KVO, není snadné odlišit – a pomáhají nám s tím právě mendelovské randomizační studie. Kompletní sekvenci lidského genomu [3] (projekty HUGO a Cellera) známe již více než 15 let a získané informace byly mnohokrát použity k celogenomovým asociačním studiím [4–6], jejichž výsledky našly využití právě pro mendelovské randomizace.

Princip mendelovské randomizace

Mendelovská randomizace (MR) je metodika využívající funkční genetické varianty jako nástroje k prokázání kauzality rizikových faktorů. Její základní princip byl navržen před desetiletími [7], nicméně svůj boom zažívá až v posledním desetiletí.

Mendelovská randomizace vychází z mendelovských zákonů [8], konkrétně druhého „zákona o nezávislé segregaci alel“. Konkrétně nám tento zákon říká, že jednotlivé genetické varianty jsou děděny nezávisle na sobě, pokud nejsou ve vazbě. Pod „vazbou“ si musíme představit lokalizaci genetické varianty v DNA – veškeré varianty v genech umístěných na různých chromozomech ve vazbě nejsou, dědí se tedy zcela náhodně – „chaoticky“. Pokud jsou varianty na identickém chromozomu blízko u sebe, šance na jejich provázanost (linkage disequilibrium – stav, kdy se jedna alela vyskytuje přednostně v přítomnosti jiné alely) se zvyšuje. U některých variant (často u těch, které jsou v genech blízko u sebe) pak může tato provázanost být i 100%. Podobně se předpokládá, že vnější faktory/negenetické rizikové faktory jsou v populaci rozloženy také nezávisle na genetických variantách, pokud tedy nejsou důsledkem genetické rozmanitosti (viz např. níže zmíněný gen pro ADH1B1 a konzumace alkoholických nápojů, nebo geny pro nikotinové transportéry a kuřácký status).

Pro využití varianty pro mendelovskou randomizační analýzu dále musí platit, že varianta je spojena s rizikovým faktorem, který sledujeme (např. vyšší hladina cholesterolu je spojena s E4 alelou genu pro APOE či varianty v genu pro APOA5 jsou spojeny s vyšší hladinou triglyceridů), ale již ne s nějakým jiným faktorem, který by mohl vztah k onemocnění nějak ovlivnit, zmást (confound). Na tuto skutečnost je nutné brát obzvláštní zřetel – řada genů je pro MR nevhodná. Dobrým příkladem nevhodného genu je gen pro FTO fat mass and obesity associated gen [9], jehož varianty nezávisle na sobě ovlivňují BMI, diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění či renální selhání, to vše při současném ovlivnění energetického příjmu či bazálního metabolismu. Jakýkoli gen, vykazující takovéto pleiotropní vlivy, je pro MR nevhodný a jeho použití by mohlo vést k falešně negativním/pozitivním výsledkům.

Předpokladem MR pak je, že pokud je zvýšená hodnota RF podmíněna genetickou variantou – existencí rizikové a protektivní alely, musí se riziková alela vyskytovat častěji u nemocných než u zdravých kontrol. Tím je potvrzena kauzalita daného rizikového faktoru [10–13]. Pokud je genetická varianta spojena s RF, ale není častěji nalezena mezi nemocnými, pak není kauzalita prokázána (schéma). Podobně opačně – pokud je určitá varianta častější mezi pacienty a není spojena s analyzovaným R, je mechanismus účinku jiný než prostřednictvím navrženého a analyzovaného faktoru, nebo se dokonce může jednat o tzv. reverse causality [14] tedy stav, v němž naopak onemocnění zvyšuje hladinu analyzovaného faktoru.

Příklady použití mendelovské randomizace v oblasti kardiovaskulárních onemocnění

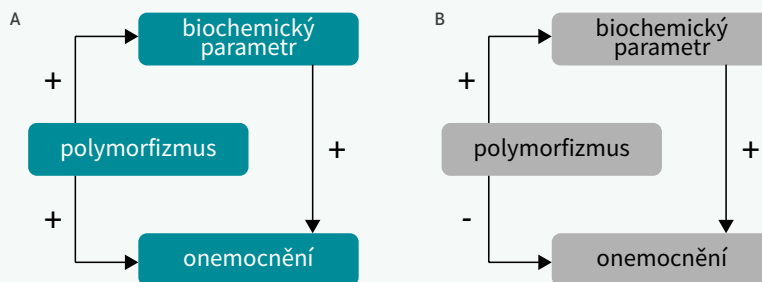
Příklady jsou uvedeny v tab. na s. 178.

Triglyceridy a KVO

Hladiny plazmatických hladin triglyceridů (TG) jako RF KVO byly dlouhou dobu přehlíženy. Pomocí MR bylo jednoznačně

Schéma | Zjednodušené schéma principu mendelovské randomizace.

Kauzalita platí v případě **A** – tedy pokud vybraná genetická varianta je spojena s hodnotami rizikového faktoru a pokud je zároveň výskyt alely spojené s vyšší hodnotou rizikového faktoru častější mezi pacienty než mezi zdravými kontrolami. V případě **B** – není MR trojúhelník uzavřen. Platí sice vztah „genetická varianta–rizikový faktor“, ale riziková alela není spojena s výskytem onemocnění.



prokázáno, že TG jsou kauzálním RF KVO. Jako instrument zde byla použita varianta v genu pro apolipoprotein A5 [15] a autoři studie shromáždili data od více než 400 000 jedinců [16]. Minoritní alela měla vysoce významný vliv na plazmatické TG (o 0,25 mmol/l) i na zvýšení rizika KVO (o 18 %); toto zvýšení nebylo vysvětlitelné malými změnami (asi 3 % HDL-cholesterolu nebo APOB) dalších potenciálních RF KVO.

HDL-cholesterol a KVO

Otázka kauzality HDL-cholesterolu (HDL-C) koncentrací v KVO úzce navazuje na výše zmíněnou otázku rizikovitosti koncentrací TG – mezi oběma parametry je známá inverzní korelace, tedy jedinci s vyššími TG mají nižší hodnoty HDL-cholesterolu a naopak a dlouho se předpokládalo, že právě HDL-cholesterol je z této dvojice ten důležitější, kauzální. Pro prokázání kauzality HDL-C byly použity varianty v CETP [17] (nevelká studie zahrnující přibližně 50 000 analyzovaných subjektů). Přestože tyto varianty výrazně ovlivnily hodnotu HDL-C, očekávaný vztah k riziku KVO prokázán nebyl. Identický výsledek získala i dánská studie zahrnující 60 000 jedinců, která využila k vyvrácení kauzality varianty v genu pro lecitin-cholesterol acyltransferázu [18].

Alkoholické nápoje a riziko KVO

Konzumace alkoholických nápojů je některými lékaři doporučována jako faktor chránící proti rozvoji KVO [19], nicméně názory na tento vztah nejsou jednotné. Pro potvrzení (ne) kauzálního vztahu byla vybrána funkční varianta (jednotlivé alely řádově mění aktivitu enzymu) v genu pro alkohol dehydrogenázu (*ADH1B*). Ta hraje klíčovou roli v odbourávání alkoholu (metabolizuje etanol na acetaldehyd) a je nejsilnějším známým determinantem konzumace alkoholu. Studie [20] použila data z více než 55 epidemiologických studií, zahrnující více než 260 000 Evropanů, z toho přibližně 30 000 s KVO (10 000 s mozkovou příhodou). Výsledky studie ale překvapivě ukázaly na opačný vztah. Nositelé alespoň jedné alely spojené s nižší konzumací alkoholu měli nejen nižší hodnoty některých rizikových faktorů KVO (především krevního tlaku a BMI), ale i o 10 % nižší riziko KVO, a to ve všech kategoriích vytvořených dle příjmu alkoholu. Studie tak byla uzavřena se závěrem, že bez ohledu na množství konzumovaných alkoholických nápojů by redukce jeho příjmu snižovala riziko KVO.

Příjem omega-6 nenasycených mastných kyselin a KVO

Pravidelná konzumace nenasycených mastných kyselin (MK) je doporučována jako prevence výskytu KVO [21]. Pro analýzu kauzality [22] mezi příjmem omega-6 MK byl požit panel téměř 10 polymorfizmů, mimo jiné např. v jaterní lipáze či ZPR1 transportéru. S využitím dat shromážděných z několika konsorcií (celkem na přibližně 300 000 jedincích) se podařilo protektivní kauzalita prokázat – stejně tak její mechanismus, a to konkrétně pozitivním vlivem na hladiny triglyceridů a celkového a LDL-cholesterolu. Naopak, vliv omega-6 na HDL-C byl nulový – což je dalším potvrzením toho, že HDL-C je pouhým markerem KVO (viz výše).

CRP a riziko KVO

C-reaktivní protein (CRP) jako nespecifický marker infekce a zánětu byl dlouho považován za rizikový faktor KVO [23]. Pro mendelovskou randomizační studii autoři shromáždili data od téměř 195 000 jedinců [24], včetně asi 45 000 nemocných; u všech byly známy koncentrace CRP a 4 genetické varianty v genu pro CRP. Všechny tyto varianty byly samostatně a významně spojeny s koncentracemi CRP, ale s žádným tradičním rizikovým faktorem KVO. Ani jednotlivé genetické varianty, ani analýza jejich kumulativního vlivu neprokázaly byť minimální spojitost se zvýšením rizika KVO – což bylo v přímém rozporu se vztahem plazmatické koncentrace CRP, u níž byl pozorován významně vyšší výskyt onemocnění v každé další podskupině s rostoucí koncentrací CRP. Prokázalo se tak, že CRP není kauzálním RF KVO, ale spíše že jeho zvýšená koncentrace je následkem zánětlivých procesů probíhajících v cévní stěně a vedoucích posléze ke KVO [25].

Statiny a snižování cholesterolu jako potenciální faktor zvyšující rozvoj DM2T

Mezi nežádoucími účinky léčby statiny je diskutováno i potenciální zvýšení rizik výskytu onemocnění diabetes mellitus 2. typu (DM2T) [26]. Dle očekávání, i tento vztah byl analyzován pomocí mendelovské randomizace [27]. Autoři shromáždili data od téměř čtvrt milionu jedinců a jako „proxy“ použili variantu v genu pro HMGCoA reduktázu (enzym, jehož ak-

Tab. | Příklady využití mendelovské randomizace v oblasti KVO

| faktor | gen | parametr | kauzalita |
|---------------------|---|---------------------|-------------------------|
| triglyceridy | <i>APOA5</i> | zvýšené riziko KVO | ano, prokázána |
| HDL-cholesterol | <i>CETP, LCAT</i> | zvýšené riziko KVO | ne, neprokázána |
| C-reaktivní protein | <i>CRP</i> | zvýšené riziko KVO | ne, neprokázána |
| příjem ethanolu | <i>ADH1B</i> | snížené riziko KVO | ano, ale inverzní vztah |
| omega-6 NMK | <i>HL, ZPR1,...</i> | snížené riziko KVO | ano, prokázána |
| statiny | <i>HMGCoAr, LDL-receptor, PCSK9, NPC1L1, ABCG5/G8</i> | zvýšené riziko DM2T | ano, prokázána |

ABCG5/G8 – ATP transportéry G5/G8b APO – apolipoprotein ADH1B – alkohol dehydrogenáza CETP – cholesterol ester transferový protein HL – jaterní lipáza LCAT – lecitin-cholesterolacyltransferáza NPC1L1 – „Niemann-Pick C1-Like 1“ ZPR1 – „zxin related protein“

tivita je statiny blokována). Zjistili, že zvýšené riziko vzniku DM2T je alespoň částečně způsobeno sníženou aktivitou HMGCoA reduktázy, tedy stejným mechanismem, který využívá léčba statiny.

Genů, jejich varianty lze požit jako „proxy“ pro analýzu kauzality mezi snižováním cholesterolu a zvýšeným rizikem DM2T, je několik a k MR byly použity i varianty v PCSK9 (protein řídící degradaci LDL-receptoru), NPC1L1 (inhibitor vstřebávání cholesterolu ve střevě), LDL-receptoru, ABCG5/G8 transportérů sterolů [28]. I tyto studie prokázaly, že geneticky podmíněné nižší hladiny cholesterolu vedou ke zvýšenému riziku rozvoje DM2T. Preskripce léčby statiny by tedy měla být pečlivě zvažována především u jedinců se zvýšeným rizikem rozvoje DM2T, u kterých ale riziko KVO není vysoké, tak, aby rizika rozvoje „civilizačních“ onemocnění byla komplexně minimalizována.

Mendelovské randomizace a ostatní onemocnění

Mendelovské randomizace našly řadu uplatnění i v medicínských oblastech mimo kardiovaskulární onemocnění. Bylo tak např. poukázáno na kauzální vztah mezi nízkými hladinami vitamínu D a zvýšeným rizikem DM2T u obézních jedinců [29], ale nikoli mezi nízkými hladinami vitamínu D a zvýšeným rizikem nádorových onemocnění [30]. Podobně může být zvýšená hladina glykemie příčinou demence [31] podobně, jako je jím i kouření [32], které kauzálně zvyšuje i riziko schizofrenie [32].

Závěr

Mendelovské randomizace jsou velice užitečným nástrojem umožňujícím rozlišit kauzální vztahy mezi biochemickými nebo antropometrickými parametry a rizikem rozvoje onemocnění. Jejich potenciál by měl být využíván především ve farmakoterapii – pouze léčba kauzálních rizikových faktorů je smysluplná.

Autor je podporován projektem MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“) a grantem programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV18-01-00046. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Literatura

- Roth GA, Huffman MD, Moran AE et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation* 2015; 132(17): 1667–1678. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720>>.
- Hopkins PN, Williams RR. A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis* 1981; 40(1): 1–52. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150\(81\)90122-2](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150(81)90122-2)>.
- Rogers J. The finished genome sequence of Homo sapiens. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003; 68: 1–11. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1101/sqb.2003.68.1>>.
- Hubáček JA. Genetické testování pro včasnou predikci kardiovaskulárních onemocnění. *Celogenomové asociační studie a polygenní skóre*. *AtheroRev* 2020; 5(2): 88–92.

- Dehghan A. Genome-wide association studies. *Methods Mol Biol* 2018; 1793: 37–49. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7868-7_4>.
- Nikpay M, Goel A, Won HH et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet* 2015; 47(10): 1121–1130. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3396>>.
- Katan MB. Apolipoprotein E isoforms, serum cholesterol, and cancer. *Lancet* 1986; 1(8479): 507–508. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)92972-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(86)92972-7)>.
- Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn*. IV. Band. Abhandlungen 1865, Brünn, 1866. Im Verlage des Vere ins, S. 3–47.
- Dlouhá D, Hubáček JA. Gen pro FTO a jeho role v genetické determinaci obezity. *Vnitř Lék* 2012; 58(3): 208–215.
- Novotný L, Bencko V. Asociace genotypu s nemocí a odhalování jejich prostředím ovlivnitelných příčin: využití principu mendelovské randomizace. *Čas Lék Česk* 2007; 146(4): 343–350.
- Holmes MV, Ala-Korpela M, Smith GD. Mendelian randomization in cardiometabolic disease: challenges in evaluating causality. *Nat Rev Cardio* 2017; 14(10): 577–590. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.78>>.
- Nikpay M, Goel A, Won HH et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet* 2015; 47(10): 1121–1130. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3396>>.
- Davies NM, Holmes MV, Davey Smith G. Reading mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians. *BMJ* 2018; 362: k601. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.k601>>.
- Sattar N, Preiss D. Reverse causality in cardiovascular epidemiological research: more common than imagined? *Circulation* 2017; 135(24): 2369–2372. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028307>>.
- Hubáček JA. Apolipoprotein AV a triglyceridémie. *Čas Lék Česk* 2004; 143(12): 799–803.
- Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL et al. [Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium and Emerging Risk Factors Collaboration]. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* 2010; 375(9726): 1634–1639. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60545-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60545-4)>. Erratum in: *Lancet* 2010; 376(9735): 90.
- Wu Z, Lou Y, Qiu X et al. Association of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene polymorphism, high density lipoprotein cholesterol and risk of coronary artery disease: a meta-analysis using a Mendelian randomization approach. *BMC Med Genet* 2014; 15: 118. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12881-014-0118-1>>.
- Haase CL, Tybjaerg-Hansen A, Qayyum AA et al. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(2): E248–E256. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-1846>>.
- Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM et al. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcoholism* 2013; 48(3): 270–277. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agt007>>.
- Holmes MV, Dale CE, Zuccolo L et al. Association between alcohol and cardiovascular disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ* 2014; 349: g4164. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.g4164>>.
- Hooper L, Al-Khudairy L, Abdelhamid AS et al. Omega-6 fats for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 7(7): CD011094. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD011094.pub3>>.
- Liao LZ, Li WD, Liu Y et al. Exploring the causal pathway from omega-6 levels to coronary heart disease: A network Mendelian randomization study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020; 30(2): 233–240. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2019.09.013>>.
- Li Y, Zhong X, Cheng X et al. Hs-CRP and all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: A meta-analysis. *Atherosclerosis*

- sis 2017; 259: 75–82. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.02.003>>.
24. Wensley F, Gao P, Burgess S et al. [C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration (CCGC)]. Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ* 2011; 342: d548. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.d548>>.
25. Nordestgaard BG, Zacho J. Lipids, atherosclerosis and CVD risk: Is CRP an innocent bystander? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 521–524. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2009.07.005>>.
26. Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A et al. Statins and type 2 diabetes mellitus: an update after 1 year. *Curr Pharm Des* 2016; 22(18): 2723–2725. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666160125114626>>.
27. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet* 2015; 385(9965): 351–61. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61183-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61183-1)>.
28. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S et al. Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: A Meta-analysis. *JAMA* 2016; 316(13): 1383–1391. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.14568>>.
29. Afzal S, Brøndum-Jacobsen P, Bojesen SE et al. Vitamin D concentration, obesity, and risk of diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(4): 298–306. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70200-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70200-6)>.
30. Ong JS, Gharahkhani P, An J et al. Vitamin D and overall cancer risk and cancer mortality: a Mendelian randomization study. *Hum Mol Genet* 2018; 27(24): 4315–4322. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddy307>>.
31. Benn M, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A et al. Impact of glucose on risk of dementia: Mendelian randomisation studies in 115,875 individuals. *Diabetologia* 2020; 63(6): 1151–1161. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-020-05124-5>>.
32. Wootton RE, Richmond RC, Stuijzand BG et al. Evidence for causal effects of lifetime smoking on risk for depression and schizophrenia: a Mendelian randomisation study. *Psychol Med* 2019; 1–9. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0033291719002678>>.