

**ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ  
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ**

**РЕНИ СТОЙОВА ЦВЕОВА**

**ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ  
ПРИ СЪРДЕЧНО-СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен  
**“ДОКТОР”**

Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и  
информатика”

Професионално направление: 4.3. „Биологически науки”

Научна специалност „Молекулярна генетика“

### **НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

АКАД. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО МИТЕВ, ДМ, ДБН  
ПРОФ. Д-Р ГЕНЧО НАЧЕВ, ДМ  
ДОЦ. Д-Р РАДКА КЪНЕВА, ДБ

### **ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:**

ДОЦ. Д-Р АРМАН ПОСТАДЖИЯН, ДМ  
ДОЦ. Д-Р. МАРГАРИТА АПОСТОЛОВА, ДБ

**София 2015**

Дисертационният труд съдържа 233 страници и е онагледен със 61 таблици и 55 фигури.  
Библиографията обхваща 495 литературни източника, от които 20 на кирилица и 475 на латиница. Цитирани са 7 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет – София от дата 05.03.2015 год..

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от Съвета за медицинска наука на Медицински Университет – София (Договори №18-Д/17.07.2012, №2-Д/29.07.2013 и № 8/29.07.2013) и от Медицински Университет – Плевен (Договор № D1/2011)

Включените в дисертацията изследвания са извършени в: Център по Молекулна Медицина, Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет – гр. София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.06.2015 год. от 12.30 часа в III-та аудиторията на Предклиничен Университетски Център (ПУЦ), Медицински Университет – София, ул. “Здраве”2, на открито заседание на научно жури в състав:

Председател:

1. Доц. д-р Арман Постаджиян, дм - рецензент

Членове:

2. Акад. проф. д-р. Ваньо Митев, дм, дбн – становище

3. Проф. д-р Витан Влахов, дмн - становище

4. Доц. д-р Елена Тодоровска, дб - становище

5. Доц. д-р. Маргарита Апостолова, дб - рецензент

Материалите по защитата са на разположение в Център по Молекулна Медицина, Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински университет – София, 14-ти етаж, СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. Здраве № 2, 1431 София.

**Автор:** Рени Стойова Цвезова

**Заглавие:** „Фармакогенетични изследвания при сърдечно-съдови заболявания”

**Област на висше образование:** 4. „Природни науки, математика и информатика”

**Професионално направление:** 4.3. „Биологически науки”

**Научна специалност:** „Молекулярна генетика“

## **СПИСЪК НА ПО-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:**

### **Кирилица:**

**АН** – артериално налягане  
**АХ** – артериална хипертония  
**АЦ** – аценокумарол  
**ДАН** - диастоличноно артериално налягане  
**ИБС** – исхемична болест на сърцето  
**КЛП** – клопидогрел  
**МИ** – миокарден инфаркт  
**мин** - минута  
**мкл** - микролитър  
**мл** - милилитър  
**мМ** - милимоларен  
**ОКС** – остър коронарен синдром  
**ПАХ** – първична артериална хипертония  
**САН** – систолно артериално налягане  
**сек.** - секунда  
**ССЗ** – сърдечно-съдови заболявания

### **Латиница:**

**apoE** - аполипопротеин E  
**AUC** – площ под кривата  
**CI** - доверителен интервал  
**CYP**- цитохром P 450 ензими  
**ddH<sub>2</sub>O** – двойно дестилирана вода  
**dNTP** - дезоксирибонуклеозид три фосфати  
**GWASs** - Genome Wide Association Studies  
**HDL** - липопротеини с висока плътност  
**HWE** - равновесие по Харди-Вайнберг  
**INR** – International Normalized Ratio  $\gamma$ -карбокси-Glu -  $\gamma$ -карбоксиглутаминови  
**LD** - неравновесна скаченост  
**LDL** – липопротеини с ниска плътност  
**MAF** - минорна алелна честота  
**OR** - odds ratio  
**PCR** - полимеразна верижна реакция  
**rpm** - оборота в минута  
**SNP** - единични нуклеотидни полиморфизми  
**TBE** – трис – боратен буфер  
**TE** – Tris EDTA буфер  
**VKOR** - витамин K епоксид редуктаза

**СЪДЪРЖАНИЕ:**

<b>1. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	8
2.1. ЦЕЛ.....	8
2.2. ЗАДАЧИ.....	8
<b>3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	9
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	11
4.1. ОПТИМИЗИРАНЕ И ВЪВЕЖДАНЕ НА ДНК-МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ФАРМАГОГЕНЕТИЧНИ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>VKORC1</i> И <i>AROE</i> .....	11
4.2. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>VKORC1</i> И <i>AROE</i> В БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ.....	12
4.3. ВЪВЕЖДАНЕ НА ДНК-МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ, ЗА КОИТО Е УСТАНОВЕНА ВРЪЗКА С РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА ИБС, ИМ И АХ ПРИ ЕВРОПЕЙСКИ ПОПУЛАЦИИ.....	13
4.4. ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С АНТИТРОМБОТИЧНИЯ МЕДИКАМЕНТ КЛОПИДОГРЕЛ.....	14
4.4.1. АНАЛИЗ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕТО И ЧЕСТОТАТА НА ПАНЕЛ ОТ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГРУПИТЕ ПАЦИЕНТИ, ПОКАЗВАЩИ РАЗЛИЧЕН ОТГОВОР КЪМ ТЕРАПИЯТА С КЛОПИДОГРЕЛ.....	15
4.5. ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ НА АНТИКОАГУЛАНТНАТА ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ.....	18
4.5.1. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА АЛЕЛНИТЕ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТИ ЗА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> И <i>AROE</i> В ОБЩАТА ГРУПА ОТ ПАЦИЕНТИ С ПОВИШЕН РИСК ОТ ТРОМБОЗИ.....	18
4.5.2. АНАЛИЗ НА ЗНАЧЕНИЕТО НА КЛИНИЧНИТЕ ФАКТОРИ И ИЗСЛЕДВАНИТЕ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> И <i>AROE</i> ВЪРХУ ОТГОВОРА КЪМ ЛЕКАРСТВЕНА ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ.....	19
4.5.3. СЪЗДАВАНЕ НА ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОПТИМАЛНАТА ДОЗА АЦЕНОКУМАРОЛ.....	23
4.5.4. ВАЛИДИРАНЕ НА СЪЗДАДЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ В НЕЗАВИСИМА ГРУПА ОТ ПАЦИЕНТИ С ПОВИШЕН РИСК ОТ ТРОМБОЗИ.....	25
4.5.5. СРАВНЕНИЕ НА СЪЗДАДЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ С АЛГОРИТМИ ЗА ДРУГИ ПОПУЛАЦИОННИ ГРУПИ.....	25
4.6. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ СЪРДЕЧНО-СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ.....	27
4.6.1. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ.....	28
4.6.2. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ.....	28
4.6.3. АНАЛИЗ НА ЕПИСТАТИЧНИТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ПО ОТНОШЕНИЕ НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА ИБС, ИМ И АХ.....	34
4.6.4. АНАЛИЗ НА ВЛИЯНИЕТО НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ВЪРХУ СТОЙНОСТИТЕ НА СИСТОЛИЧНО И ДИАСТОЛИЧНО АРТЕРИАЛНО НАЛЯГАНЕ И НИВАТА НА ЛИПИДИ.....	35

4.6.5. АНАЛИЗ НА ЕПИСТАТИЧНИТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ПО ОТНОШЕНИЕ НА СТОЙНОСТИТЕ НА СИСТОЛИЧНО И ДИАСТОЛИЧНО АРТЕРИАЛНО НАЛЯГАНЕ И НИВАТА НА ЛИПИДИ В КРЪВТА .....	36
4.6.6. ХАПЛОТИПЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ЛОКУС 9p21 И АСОЦИАЦИЯТА ИМ С ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ .....	36
<b>5. ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>38</b>
5.1. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ, ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ .....	38
5.1.1. СТАТИСТИЧЕСКА ЕПИСТАЗА .....	43
5.2. ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С АЦЕНОКУМАРОЛ .....	44
5.3. ОБОБЩЕНИЕ.....	54
<b>6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ .....</b>	<b>56</b>
6.1. ИЗВОДИ .....	56
6.2. ПРИНОСИ .....	57
6.2.1. ПРИНОСИ С НАУЧНО – ФУНДАМЕНТАЛЕН ХАРАКТЕР.....	57
6.2.2. ПРИНОСИ С НАУЧНО – ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР.....	57
6.2.3. ПРИНОСИ С МЕТОДИЧЕН ХАРАКТЕР .....	57
6.2.4. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР .....	57
<b>7. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА .....</b>	<b>58</b>
<b>СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>63</b>
СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	63
СПРАВКА ЗА УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ..	64
<b>РЕЗЮМЕ .....</b>	<b>67</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>69</b>

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Сърдечно – съдовите заболявания (ССЗ) са основен фактор, предизвикващ временна нетрудоспособност, инвалидизация и висока смъртност в икономически развитите и много от развиващите се страни в световен мащаб, в това число и в България. Те съставляват половината от всички смъртните случаи в Европа (49%) и в Европейския съюз (ЕС) (42%) годишно като причиняват смъртта на повече от 4,35 милиона души в 52 държави – членки на Европейския регион на Световната здравна организация (СЗО) и повече от 1,9 милиона души в държавите от ЕС. Смъртността в резултат на ССЗ е най – ниска в Северна, Южна и Западна Европа, а най – висока в страните от Централна и Източна Европа [1-3]. Статистиката, оповестена от Националния статистически институт (НСИ) сочи, че около 65% от смъртните случаи в България се дължат на ССЗ, т.е. приблизително 60 хиляди смъртни случая годишно.

От сърдечно-съдовите усложнения, тромбоемболизмът е водеща причина за заболяемост и смъртност в следствие на миокарден инфаркт и мозъчен инсулт в световен мащаб. Основните медикаменти, които се използват за профилактика и лечение на тромбози са антикоагулантите и тромболитните антиагреганти. Терапията и с двата типа медикаменти има своите негативи. По отношение на терапията с клопидогрел някои пациенти показват частична или пълна резистентност към лечението, което увеличава риска от последващи сърдечно-съдови инциденти. От своя страна, индиректните антикоагуланти като варфарин и аценокумарол показват широка междуиндивидуална и междуетническа вариабилност, което затруднява ефективното им дозиране.

Към настоящия момент мониторирането на отговора към лечението с аценокумарол в България се извършва на базата на измерване на протромбиновото време веднъж месечно или на няколко месеца, което представлява неудобство и ограничение за пациентите. Тромбоцитната функция при терапия с клопидогрел се оценява с функционални, лабораторни тестове, но все още няма унифициран тест по който да става това. Необходимо е да се разработят и въведат методи, които да позволят оптимизирането на терапията с тези два медикамента. Изключително важно е тези методи да бъдат надеждни, да определят с голяма точност индивидуалния отговор на всеки пациент към съответната терапия и получените резултати да не се променят с времето. От голямо значение е и отчитането на влиянието на генетичните фактори по отношение на отговора към проведеното медикаментозно лечение.

Най-общо тромбоемболизмът представлява запушване на кръвоносен съд от съсирек (тромб), който се откъсва и образува ембол. В зависимост от големината на тромба и мястото на запушване емболията може да е причина за различни усложнения, в това число сърдечна исхемия и миокарден инфаркт. Исхемичната болест на сърцето (ИБС) заема най-голям процентен дял сред сърдечно-съдовите заболявания, последвана от артериалната хипертония (АХ). Известно е, че това са многофакторни заболявания, чието проявление зависи от сложното взаимодействие на влиянието на средата и множество генетични компоненти. Важно е да се отбележи, че освен изясняване на ролята на фармакогенетичните фактори по отношение на отговора към терапия с антиагреганти и антикоагуланти, е необходимо да се установят и тези генетични детерминанти, които имат протективен или рисков ефект по отношение на развитието на тези усложнения.

Исхемичната болест и артериалната хипертония се характеризират с добро познаване на етиологията и епидемиологията, но познанията относно влиянието на генетичните фактори върху развитието на тези заболявания са недостатъчни. През последните няколко години проучванията на много водещи центрове в Европа са насочени към откриване на рискови варианти за тези две заболявания чрез асоциативни проучвания на целия геном при големи групи пациенти и контроли (Genome Wide Association Studies – GWAS). Засега резултатите от многобройните GWASs потвърждават факта, че генетичната предразположеност към заболяванията е комплексна и включва множество хромозомни локуси в различни части на генома. С най-голямо значение са находките за свързаност в и около белтък-кодиращи гени, но има и такива в генетично бедни региони. Това ни дава право да се предположи, че причините за появата на тези заболявания са свързани освен с кодиращата функция на гените, също така и с тяхната регулация.

Репликативните проучвания на полиморфни варианти във водещи кандидат-гени, дали силен позитивен сигнал за асоциация при провеждането на цялостни, геномни изследвания са основен подход при охарактеризиране на взаимовръзката между генотип и фенотип при сърдечно-съдовите заболявания. По – голям дял на проучванията, валидиращи или отхвърлящи асоциацията на новооткрити полиморфни варианти исхемична болест и хипертония са предимно при индивиди от азиатски произход. Данните за репликативни изследвания при европейци са доста оскъдни.

Всичко изброено до тук налага провеждането на обширни генетични и фармакогенетични изследвания при българи и определянето на тези генетични детерминанти, които са специфични за нашата популация. Това би довело до оптимизиране на терапията с антикоагуланти и антиагреганти, както и изясняване на сложната, генетична архитектура на сърдечните заболявания и определяне на онези генетични маркери, които да позволят ранното диагностициране на исхемичната болест, миокардния инфаркт и артериалната хипертония, както и откриването на нови терапевтични мишени.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 2.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е:

Да се проучи ролята на фармакогенетични фактори при оптимизиране на терапията с аценокумарол и клопидогрел и да се определи приноса на генетичните фактори за развитието на сърдечно-съдови заболявания при български пациенти.

### 2.2. Задачи

За постигане на тази цел си поставихме следните основни **задачи**:

2.1.1 Подбор на пациенти с ИБС, ИМ, АХ, повишен риск от тромбози и контролна група от здрави индивиди (популационни контроли) и изолиране на ДНК от венозна кръв.

2.1.2 Оптимизиране и въвеждане на методи за ДНК-типизиране на полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE*, които се асоциират с промяна в отговора към лекарствена терапия с аценокумарол и клопидогрел.

2.1.3 Определяне на разпространението и честотата на изследваните полиморфни варианти в *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE* сред здрави лица от български произход.

2.1.4 Анализ на връзката между клиничните фактори, носителството на полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* и индивидуалните терапевтични дози аценокумарол при пациенти, подложени на антикоагулантна терапия.

2.1.5 Създаване на математически модел за определяне на оптималната първоначална и/или поддържаща дози антикоагулант, основаващ се на клинична информация и данни за носителство на полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE*, и валидирането му в независима група от пациенти с повишен риск от тромбози.

2.1.6 Подбор и анализ на панел от полиморфни варианти в или близост до гените и хромозомни райони *PCSK9*, *APOE*, *TCF7L2*, *ADIPOQ*, *MBL2*, *FTO*, *IRS1*, *CYP2J2*, *CYP2C8*, *PHACTR1*, *ATP2B1*, *ABO*, *MTHFD1L*, *NPR3 – C5orf23*, *GNAS – EDN3*, *CYP2C19*, *CDH13*, *eNOS* и *ATP2B1* и сравнение на разпределението на алелните и генотипни честоти между групите пациенти, показали различен отговор към терапия с клопидогрел.

2.1.7 Определяне на епистатичните взаимодействия между изследваните полиморфни варианти и анализ на връзката им с отговора към лекарствена терапия с клопидогрел.

2.1.8 Асоциативно изследване на панел от полиморфни варианти в групите пациенти с АХ, ИБС и ИМ и контролна група от здрави индивиди.

2.1.9 Анализ на епистатичните взаимодействия между изследваните полиморфни варианти и определяне на връзката им с риска за развитие на АХ, ИБС и ИМ при българи.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Клиничен материал

В дисертационния труд са включени изследвания върху групи лица с исхемична болест на сърцето (ИБС), миокарден инфаркт (МИ), първична артериална хипертония (ПАХ) и с повишен риск от тромбози (подложени на терапия с аценокумарол или клопидогрел).

Основните характеристики на на пациентите, подложени на генетичен анализ в настоящия дисертационен труд са обобщени в Табл. 3.1-3.3.

Табл. 3.1. Основни характеристики на групата пациенти, подложени на терапия с клопидогрел (n=104).

Клиничен показател:	Добър отговор към клопидогрел (600/300 + 75 мг) АДФ тест 22±8 AU (220 ±80AUC)	Недостатъчен отговор към клопидогрел (600/300+ 75 мг) АДФ тест 72±11 AU (720±110AUC)	$\chi^2$	P
Брой (%)	54	50	-	ns
Нестабилна ангина	37 (67%)	34 (68%)	0.00	ns
STEMI	18 (33%)	16 (32%)	0.02	ns
Едноклонова болест	22 (40%)	24 (48%)	0.55	ns
Двуклонова болест	23 (43%)	18 (36%)	0.47	ns
Триклонова болест	9 (17%)	8 (16%)	0.01	ns
Жени	16 (30%)	18 (36%)	0.48	ns
Мъже	38 (70%)	32 (64%)	0.48	ns
Диабет мелитус	16 (30%)	21 (42%)	1.73	ns
Възраст	62 ±10	62±10	-	ns
Брой тромбоцити x 10 <sup>9</sup> /л	278 ± 84	331±10	-	<0.001

Табл. 3.2. Клинични и демографски характеристика на пациентите, включени в тестовата и във валидиращата групи.

Характеристика	Тестова група (n=120) (Средна стойност ± стандартно отклонение)	Валидираща група (n=52) (Средна стойност ± стандартно отклонение)	P
Възраст (години) (mean±SD)	58.04 ± 14.13	59.80 ± 14.56	0.41*
<b>Пол</b>			
Мъже [n (%)]	66(55.00%)	22(42.13%)	0.14**
Жени [n (%)]	54(45.00%)	30(57.69%)	0.14**
Етническа принадлежност	българи	българи	-
Височина (см)	172.63 ± 9.74	169.61 ± 9.26	0.22*
Тегло (кг)	80.90 ± 17.08	78.18 ± 16.66	0.15*
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	27.96 ± 5.35	27.70 ± 5.51	0.57*
Средна доза аценокумарол	3.02 ± 1.96	2.36 ± 1.57	0.42*
Прием на амиодарон	12 ( 10.17%)	7 ( 13.73%)	0.60**
<b>Причина за прием на аценокумарол</b>			
Предсърдно мъждене	27 (22.50)	19 (36.54)	0.06**
Белодробен тромбоемболизъм	9 (7.50)	9 (17.31)	0.06**
Дълбока венозна тромбоза	11 (9.17)	6 (11.54)	0.59**
Смяна на сърдечна клапа	54 (45.00)	17 (32.69)	0.18**
Други	13 (15.83)	1 (1.92)	0.07**

\* Mann-Whitney test

\*\* Chi-square test

Табл. 3.3. Основни характеристики на на пациентите с ИБС, ИМ и АХ.

Показател	Пациенти с ИБС	Пациенти с ИМ	Пациенти с АХ
Възраст (години)	66.27±8.81	66.34 ± 10.39	51.91±17.01
Пол (мъже)	60 (55.56)	92 (60.53)	72 (33.49%)
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	29.66 ± 5.72	28.36 ± 4.89	28.31±6.5
Общ холестерол (ммол/л)	5.64±1.04	5.94±0.75	5.24±1.15
Триглицериди (ммол/л)	1.32±0.67	2.07±0.56	1.71±1.35
LDL (ммол/л)	4.23±1.06	4.14±0.79	3.79±1.11
HDL (ммол/л)	1.22±0.37	1.39±0.28	1.16±0.37
Систолично артериално налягане (САН) (ммHg)	147.86±21.83	135.92±10.96	143.40±18.33
Диастолично артериално налягане (ДАН) (ммHg)	87.50±13.64	83.64±6.60	89.09±12.05

### 3.2. Използвани методи

1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез изсолване на белтъци (метод на Miller et al., 1988)

2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по метода на фенолна екстракция

3. Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез полуавтаматизирана система Chemagic Magnetic Separation module I (Chemagen).

4. Генотипиране чрез метода на високорезолютивно топене на ДНК (High Resolution Melting).

5. Генотипиране чрез 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

6. Директно секвениране

7. Статистически методи

За обработка на данните от проведените в дисертационния труд проучвания, беше използвана версията на SPSS – SPSS v20.0 (IBM® SPSS Statistics) и PLINK 1.07.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

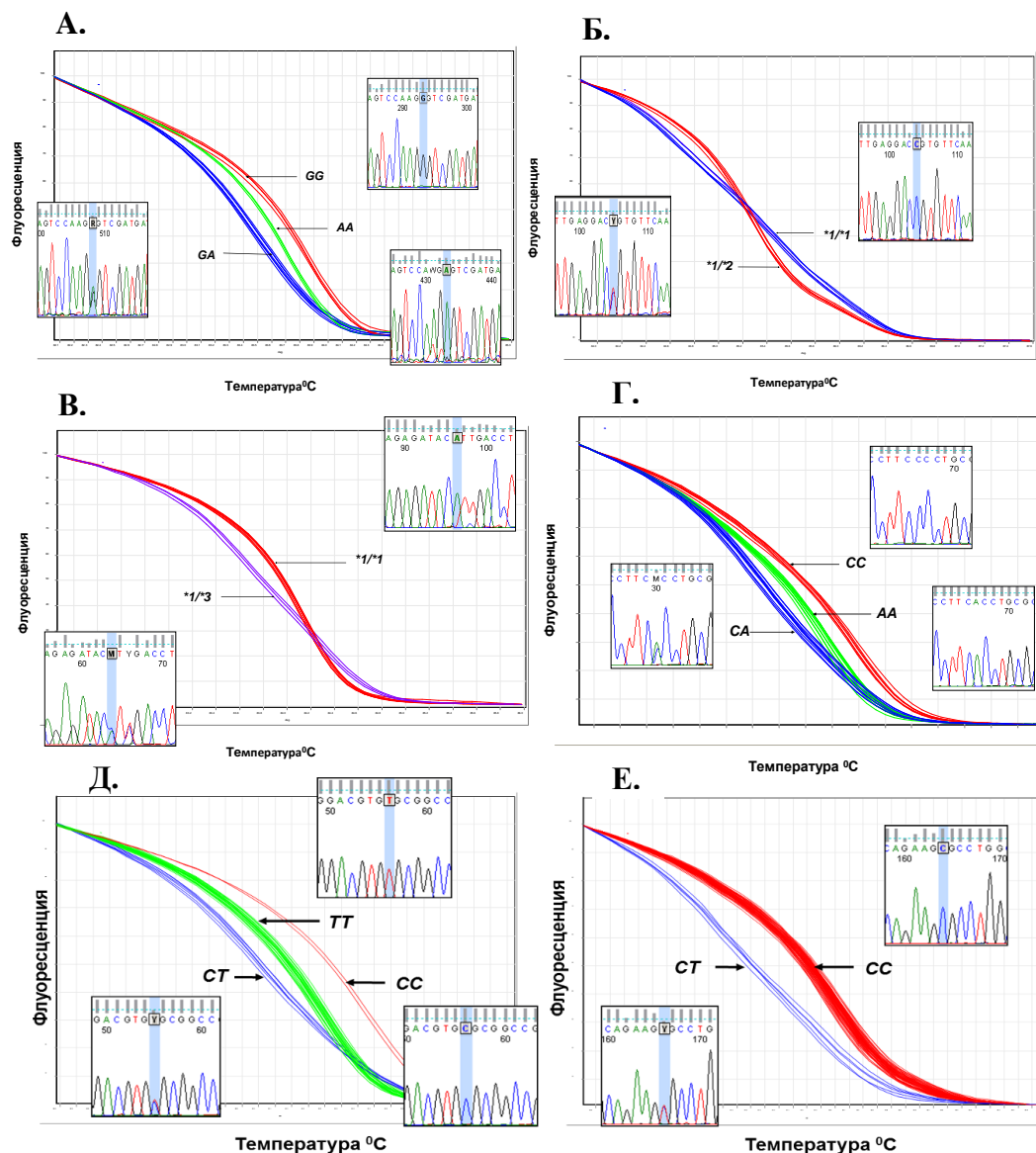
### 4.1. Оптимизиране и въвеждане на ДНК-методи за анализ на фармакогенетични полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE*

Генотипирането на полиморфните варианти в гените *CYP2C9* (*CYP2C9\*2*, 430C>T, rs1799853; и *CYP2C9\*3*, 1075A>C, rs1057910), *CYP2C19* (*CYP2C19\*2*, 681 G>A, rs4244285 и *CYP2C19\*17*, -806 C>T, rs12248560), *CYP3A5* (*CYP3A5\*3*, 6986A>C, rs776746), *VKORC1* (*VKORC1\*2A*, rs9923231, g.3588G>A; rs9934438, g.6399C>T; *VKORC1\*2B*, rs2884737, g.5723T>G; *VKORC1\*3*, rs7294, g.8956G>A; *VKORC1\*4*, rs17708472, g.5924C>T) и *APOE* (g.7903T>C, rs429358; g.8041C>T, rs7412) беше извършено чрез технологията на високорезолуционно топене на двойноверижната структура на ДНК при условия на постоянно повишаване на температурата през равни интервали от време (High Resolution Melting Analysis, HRMA). Разграничаването на отделните генотипи беше извършено на базата на профила на топене на съответните ампликони, съдържащи изследвания полиморфен вариант (Фиг. 4.1). Определен брой проби от всеки генотип бяха потвърдени чрез директно секвениране по Сангер.

Оптимизирането на условията на PCR реакцията осигури получаването на високоспецифичен амплификационен продукт. Беше изследвано влиянието на основните реакционни параметри (температура на хибридизация, време за синтез, концентрация на ДНК, концентрация на MgCl<sub>2</sub>, концентрация на праймери) върху чувствителността и възпроизводимостта на анализа. Избрани бяха оптималните за протичането на реакциите условия (Табл. 4.1).

Табл.4.1. Оптимизирани условия за амплификация на подобрите полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE*

Вариант	Идентиф. номер	Хромозомна локализация	Позиция в транскрипта	Замяна	Белтъчна замяна	Вид на промяната	Темп. на хибридизация (°C)	Време за амплификация (сек.)
<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853	10:94942290	Екзон 3	C>T	Arg144Cys	миссенс	60	15:15:20
<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	10:94981296	Екзон 7	A>C	Iso359Leu	миссенс	60	15:15:20
<i>CYP2C19*2</i>	rs4244285	10:94781859	Екзон 5	G>A	Pro227Pro	синонимен	60	15:15:20
<i>CYP2C19*17</i>	rs12248560	10:96521657	5'UTR	C>T	-	-	58	15:15:20
<i>CYP3A5*3</i>	rs776746	7:99270539	Инtron 3	A>C	-	Сплайс инг дефект (акцептно място)	62	15:15:20
<i>VKORC1*2A</i>	rs9923231	16:31096368	5'UTR/ промотор	G>A	-	-	60	15:15:20
<i>VKORC1*2A</i>	rs9934438	16:31093557	инtron 1	C>T	-	-	58	15:15:20
<i>VKORC1*2B</i>	rs2884737	16:31094233	инtron 1	A>C	-	-	65	15:15:20
<i>VKORC1*3</i>	rs7294	16:31091000	3'UTR	C>T	-	-	59	15:15:20
<i>VKORC1*4</i>	rs17708472	16:31105353	инtron 1	G>A	-	-	66	15:15:20
<i>APOE</i>	rs7412	19:44908822	Екзон 4	C>T	Arg176Cys	миссенс	65	15:15:20
<i>APOE</i>	rs429358	19:44908684	Екзон 4	T>C	Cys130Arg	миссенс	65	15:15:20



**Фиг. 4.1.** Нормализирани графици на топене на част от изследваните участъци, съдържащи базови замени:

**А:** rs9923231 (*VKORC1* g.-1639G>A, *VKORC1*\*2A)

**Б:** rs1799853 (g.8633C>T, *CYP2C9*\*2)

**В:** rs1057310 (g.16052G>A, *CYP2C9*\*3)

**Г:** rs2884737 (g.5723T>G, *VKORC1*\*2B)

**Д:** rs429358 (g.7903T>C, *APOE*).

**Е:** rs7412 (g.8041C>T, *APOE*).

## 4.2. Разпределение на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE* в българската популация

Установените генотипни и алелни честоти на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* и *APOE* в групата на здрави индивиди (популационни контроли) не показват отклонение от очакваните според закона на Харди-Вайнберг (Табл. 4.2 - 4.3).

**Табл. 4.2.** Алелни и генотипни честоти на изследваните полиморфизми в гените *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A5* в група от популационни контролни индивиди с български произход.

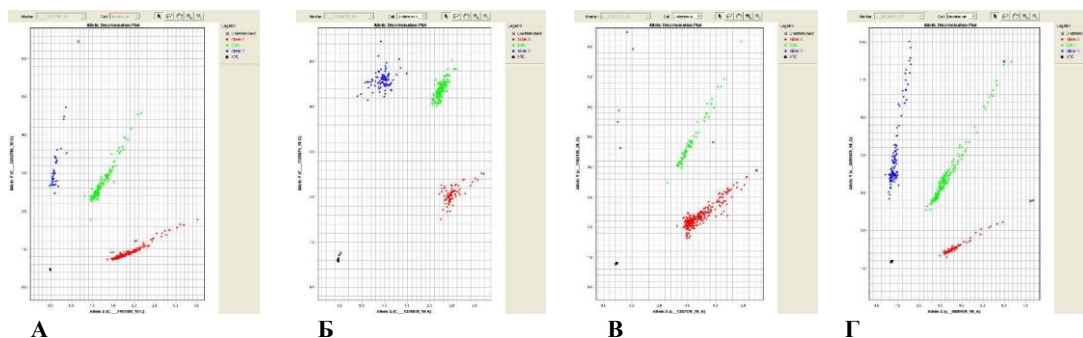
Общо	n=144		n=148		n=152		n=146		n=110	
Вариант	<i>CYP2C9</i> *2 rs1799853 g.8633C>T		<i>CYP2C9</i> *3 rs1057910 g.47639A>C		<i>CYP2C19</i> *2 rs4244285 g.24154G>A		<i>CYP2C19</i> *17 rs12248560 g.4195C>T		<i>CYP3A5</i> *3 rs776746 g.12083A>G	
Генотип	CC	110 (76.39)	AA	136 (91.89)	GG	111 (73.03)	CC	81 (55.00)	AA	97 (88.18)
	CT	34 (23.61)	AC	12 (8.11)	GA	35 (23.03)	CT	56 (38.00)	AC	13 (11.82)
	TT	0 (0.00)	CC	0 (0.00)	AA	6 (3.95)	TT	9 (6.00)	CC	0 (0.00)
Алел	C	254 (88.19)	A	284 (95.95)	G	257 (84.54)	C	218 (74.66)	A	207 (94.09)
	T	34 (11.81)	C	12 (4.05)	A	47 (15.46)	T	74 (25.34)	G	13 (5.90)
HWE $\chi^2$	2.58		0.26		2.16		0.03		0.43	

**Табл. 4.3.** Алелни и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в гените *VKORC1* и *APOE* в група от популационни контролни индивиди с български произход.

Общо	n=154		n=154		n=140		n=141		n=134		n=490		n=496	
Вариант	<i>VKORC1</i> *2A rs9934438 g.6399C>T		<i>VKORC1</i> *2A rs9923231 g.3588G>A		<i>VKORC1</i> *2B rs2884737 g.5723T>G		<i>VKORC1</i> *3 rs7294 g.8956G>A		<i>VKORC1</i> *4 rs17708472 g.5924C>T		<i>APOE</i> rs7412 g.7903T>C		<i>APOE</i> rs429358 g.7903C>T	
Генотип	CC	50 (32.47)	GG	50 (32.47)	GG	16 (11.43)	GG	59 (41.04)	CC	87 (64.93)	CC	420 (85.71)	CC	2 (0.04)
	CT	75 (48.70)	GA	75 (48.70)	GT	62 (44.29)	GA	68 (48.23)	CT	43 (32.09)	CT	66 (13.47)	CT	84 (16.94)
	TT	29 (18.83)	AA	29 (18.83)	TT	62 (44.29)	AA	14 (9.93)	TT	4 (2.99)	TT	4 (0.82)	TT	410 (82.66)
Алел	C	175 (56.82)	G	175 (56.82)	G	94 (33.57)	G	186 (65.96)	C	217 (80.97)	C	906 (92.00)	C	88 (8.87)
	T	133 (43.18)	A	133 (43.18)	T	186 (66.43)	A	96 (34.04)	T	51 (19.03)	T	74 (8.00)	T	904 (91.13)
HWE $\chi^2$	0.01		0.01		0.01		0.77		1.51		0.61		1.12	

### 4.3. Въвеждане на ДНК-методи за анализ на полиморфни варианти, за които е установена връзка с риска за развитие на исхемична болест, миокарден инфаркт и артериална хипертония

Диаграмите от генотипирането на подобрени полиморфизми са представени на **Фиг. 4. 2.**



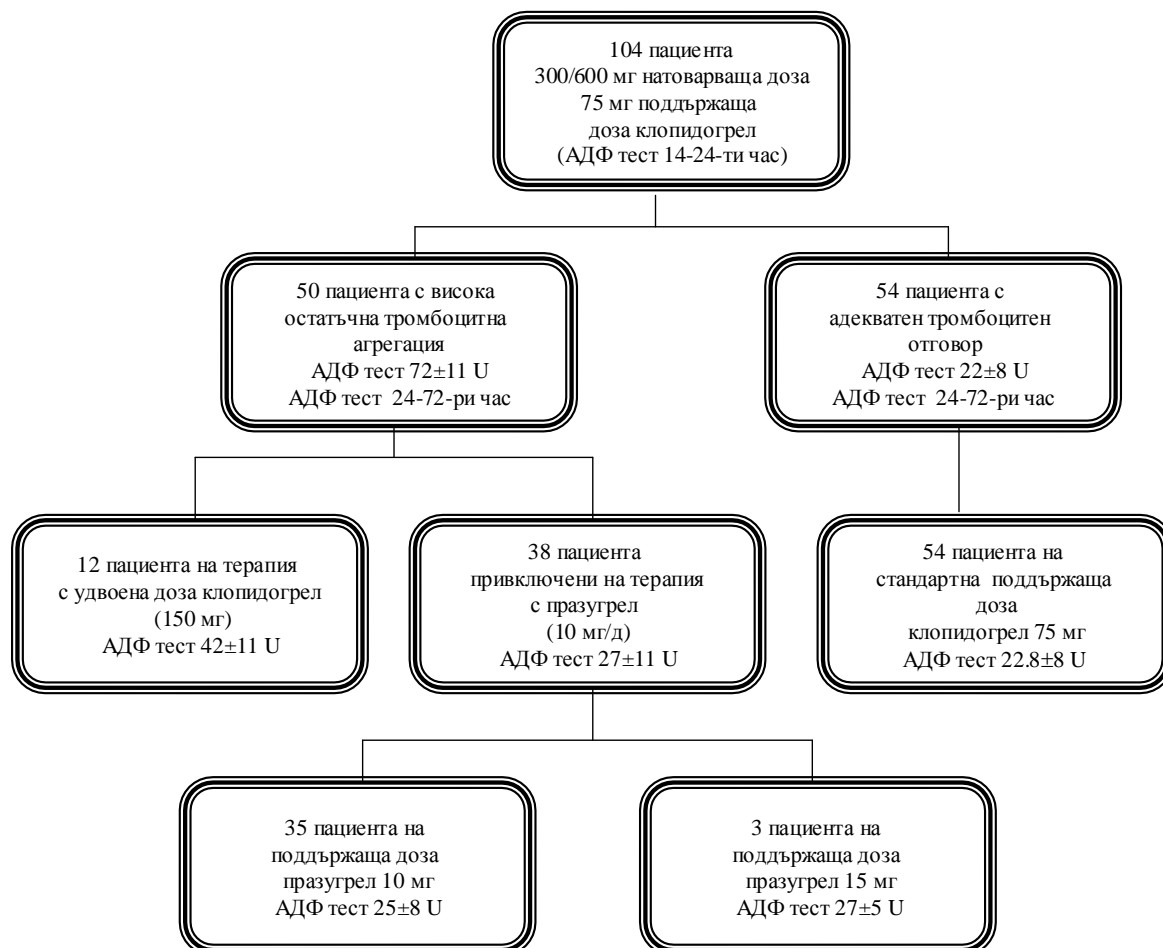
**Фиг. 4.2.** Диаграми от генотипирането на подобрени полиморфни варианти чрез използване на TaqMan сонди:

- А. Полиморфен вариант rs266729 (*ADIPOQ* g.4012C>G).
- Б. Полиморфен вариант rs6015450 (*GNAS-EDN3* g.58436527A>G).
- В. Полиморфен вариант rs7799039 (*LEP* g.2453G>A).
- Г. Полиморфен вариант rs1173771 (*NPR3 - C5orf23* g.32815028A>G).

**Син цвят** – хомозиготи по див тип  
**Зелен цвят** – хетерозиготи  
**Червен цвят** – хомозиготи по полиморфния алел

#### 4.4. Фармакогенетични изследвания за оптимизиране на терапията с антитромботичния медикамент клопидогрел

Общият ход на проведеното проучване е представен нагледно на **Фиг. 4.4**.



**Фиг. 4.4.** Ход на проучването с превключване на лечението от клопидогрел към празугрел въз основа на измерването на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация чрез множествена импедансна агрегометрия[4].

Инхибирането на АДФ P2Y12 рецепторите при лечението с КЛД е определено чрез измерване на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация (АДФ 6.5 мкМ) в пълна кръв – т. нар. АДФ тест. Отговорът към КЛД е определен като „добър” – “good response” при регистриране на стойности на АДФ теста под 45.5U (AU\*мин./10). За недостатъчното инхибиране на АДФ индуцираната агрегация са приети стойности на АДФ тест над 45.5 U – „слаб (недостатъчен) отговор”, „low response” (**Табл. 4.4**).

Групата на пациентите с добър отговор към терапията с КЛД се състои от 54 болни. При пациентите със слаб отговор (n=50) е удвоена натоварващата и поддържаща доза медикамент съответно на 600 мг и 150 мг дневно. При 25 от пациентите (50%) поради ВОТА над прицелната стойност от 45.5U (AU\*мин./10), е приложен по-мощен P2Y12 инхибитор – празугрел в дози 10 мг/д. При всички изследвани пациенти е постигнато потискане на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация в желаните граници.

**Табл. 4.4.** Стойности на АДФ теста при пациентите в различните групи.

Показател	АДФ-тест при “добър отговор” към клопидогрел 300/600 + 75 мг/д	АДФ – тест при “недостатъчен отговор” към клопидогрел 300/600 + 75 мг/д	АДФ–тест празугрел 10/15 мг/д	АДФ–тест клопидогрел 150 мг/д
Брой (n)	54	50	38	12
Средна стойн. (AU*min/10)	22	72	27	42
Станд. откл. (AU*min/10)	8	10	11	11
Минимална (AU*min/10)	5	53	12	27
Максимална (AU*min/10)	44	89	33	56

В групата на пациентите (n=54) с добър отговор измерената агрегация на тромбоцитите с АДФ-тест показва средни стойности 22±8 U (220±80 AU\*min). При 50 пациенти с ВОТА или “слаб отговор” средните стойности на АДФ-теста са 74±11 U (740±110 AU\*min). При 12 от пациентите с ВОТА (66±9 U) удвояването на поддържащата доза клопидогрел 150 мг/д доведе до постигане на гранични стойности на АДФ-теста 42±11 U (420±110 AU\*min) или допълнително намаление с 36% на тромбоцитния отговор. При 38 от пациентите с ВОТА лечението беше превключено от клопидогрел на празугрел (10 мг поддържаща доза) и измерената АДФ-агрегация за групата бе 27±11 U (270±110 AU\*min) като беше постигнато намаление на инхибираната тромбоцитна агрегация с 65%. Трима пациенти от тази група изискаха по-висока поддържаща доза празугрел – 15 мг/д, за достигане на средните за групата стойности.

#### 4.4.1. Анализ на разпределението и честотата на панел от полиморфни варианти в групите пациенти, показващи различен отговор към терапията с клопидогрел

В настоящето проучване е изследвана връзката между наличието на подобрени единични базови замени в или в близост до различни гени и ефикасността от терапията с антитромботичния медикамент КЛД. Както беше споменато по-горе, пациентите бяха разделени в две основни групи – пациенти с добър отговор към терапията и такива с недостатъчен отговор. Разделянето беше извършено на базата на АДФ тест, проведен с апарата Multiplate в Клиничната лаборатория на Национална Кардиологична Болница, гр. София.

Значимите асоциации с отговора към лекарствена терапия с КЛД са представени в **Табл. 4.5.**

В общата група полиморфните варианти, които показват връзка с терапевтичния отговор при лечение с КЛД са тези в или в близост до гените *CYP2C19\*2* rs4244285 (p=0.001), *IL6R* rs2229238 (p=0.036), *ADIPOQ* rs1501299 (p=0.05), *PHACTR1* rs9349379 (p=0.019), *NPR3*, *C5orf23* rs1173771 (p=0.016), *eNOS* rs3918226 p=0.01) и *APOE* rs7412 (p=0.03). По-голяма част от тази тенденция се запазва в групата на мъжете с допълнение на полиморфните варианти *LEP* rs7799039 (p=0.04) и *9p21* rs1537378 (p=0.01), докато в групата на жените се наблюдава засилването на влиянието на полиморфната замяна в гена *IL6R* (p=0.0003).

Беше изследвано и епистатичното взаимодействие на подобрените полиморфизми по отношение на терапевтичния отговор към медикамента КЛД (**Табл. 4.6**).

**Табл. 4. 6.** Епистатични взаимодействия между изследваните полиморфни варианти и влиянието им върху терапевтичния отговор при лечение с клопидогрел.

Хр.	Ген/регион	Вариант 1	Хр.	Ген/регион	Вариант 2	OR взаимодействие	T	P стойност	Коригиран о р по Бонферони
6	<i>PHACTR1</i>	rs9349379	9	<i>9p21</i>	rs7865618	5.62	10.62	0.001	<b>0.032</b>
6	<i>PHACTR1</i>	rs9349379	9	<i>9p21</i>	rs1537378	6.24	10.7	0.002	<b>0.064</b>

Табл. 4.5. Значими асоциации на изследваните варианти с отговора към лекарствена терапия с клопидогрел.

Хр	Ген/ Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				Резистентни пациенти N (%)	Толерантни пациенти N (%)	OR (CI)	P	Резистентни пациенти N (%)	Толерантни пациенти N (%)	OR	P	Резистентни пациенти N (%)	Толерантни пациенти N (%)	OR	P
1	<i>IL6R</i> <i>rs2229238</i> <i>C&gt;T</i>	Геноти пен	ТТ	2 (4.00)	2 (3.70)	0.92 (0.13-6.81)	<b>1</b>	2 (6.25)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.16</b>	0 (0.00)	2 (12.50)	-	<b>0.21</b>
			ТС	11 (22.00)	25 (46.30)	0.33 (0.14-0.77)	<b>0.016</b>	10 (31.25)	17 (44.74)	0.56 (0.21-1.050)	<b>0.33</b>	1 (5.56)	8 (50.00)	0.051 (0.006-0.55)	<b>0.006</b>
			СС	37 (74.00)	27 (50.00)	1.37 (0.66-2.84)	<b>0.45</b>	20 (62.50)	21 (55.26)	1.35 (0.52-3.52)	<b>0.63</b>	17 (94.44)	6 (37.50)	28.33 (2.97-270.58)	<b>0.0006</b>
		Алеле н	Т	15 (15.00)	29 (26.85)	0.48 (0.24-0.96)	<b>0.04</b>	14 (21.88)	17 (22.37)	0.97 (0.44-2.17)	<b>1</b>	1 (2.79)	12 (37.50)	0.05 (0.006-0.39)	<b>0.0003</b>
			С	85 (85.00)	79 (73.15)	2.08 (1.04-4.17)	<b>0.04</b>	50 (78.13)	59 (77.63)	1.02 (0.46-2.29)	<b>1</b>	35 (97.22)	20 (62.50)	21.00 (2.54-173.68)	<b>0.0003</b>
3	<i>ADIPOQ</i> <i>rs1501299</i> <i>G&gt;T</i>	Геноти пен	ТТ	3 (6.25)	12 (22.22)	0.23 (0.06-0.89)	<b>0.027</b>	1 (3.13)	9 (23.68)	0.10 (0.01-0.87)	<b>0.02</b>	2 (12.50)	3 (18.75)	0.62 (0.09-4.32)	<b>1</b>
			ТG	16 (33.33)	14 (25.93)	1.43 (0.61-3.56)	<b>0.51</b>	12 (37.50)	9 (23.68)	1.93 (0.69-5.44)	<b>0.30</b>	4 (25.00)	5 (31.25)	0.73 (0.16-3.45)	<b>1</b>
			GG	29 (60.42)	28 (51.85)	1.42 (0.65-3.11)	<b>0.43</b>	19 (59.38)	20 (52.63)	1.32 (0.51-3.40)	<b>0.63</b>	10 (62.50)	8 (50.00)	1.67 (0.41-6.82)	<b>0.72</b>
		Алеле н	Т	22 (22.92)	38 (35.19)	0.55 (0.3-1.02)	<b>0.05</b>	14 (21.88)	27 (35.53)	0.51 (0.24-1.08)	<b>0.09</b>	8 (25.00)	11 (34.38)	0.63 (0.22-1.88)	<b>0.58</b>
			G	74 (77.08)	70 (64.81)	1.83 (0.98-3.39)	<b>0.05</b>	50 (78.13)	49 (64.47)	1.97 (0.92-4.19)	<b>0.09</b>	24 (75.00)	21 (63.64)	1.57 (0.53-4.64)	<b>0.58</b>
5	<i>NPR3,</i> <i>C5orf23</i> <i>rs1173771</i> <i>G&gt;A</i>	Геноти пен	AA	3 (6.00)	10 (18.52)	0.28 (0.7-1.9)	<b>0.08</b>	1 (3.13)	6 (15.79)	0.12 (0.01-1.05)	<b>0.04</b>	2 (11.11)	4 (25.00)	0.38 (0.06-2.40)	<b>0.39</b>
			AG	25 (50.00)	31 (57.41)	0.74 (0.34-1.61)	<b>0.55</b>	15 (46.88)	22 (57.89)	0.64 (0.25-1.65)	<b>0.47</b>	10 (55.56)	9 (56.25)	0.97 (0.25-3.77)	<b>1</b>
			GG	22 (44.0)	13 (24.07)	2.48 (1.07-5.72)	<b>0.039</b>	16 (50)	10 (26.32)	2.80 (1.03-7.62)	<b>0.05</b>	6 (33.33)	3 (18.75)	2.17 (0.44-10.65)	<b>0.45</b>
		Алеле н	A	31 (31.00)	51 (47.22)	0.40 (0.23-0.71)	<b>0.016</b>	17 (26.56)	34 (44.74)	0.45 (0.22-0.91)	<b>0.026</b>	14 (38.89)	17 (53.13)	0.56 (0.21-1.47)	<b>0.33</b>
			G	69 (69.00)	57 (52.19)	2.49 (1.41-4.39)	<b>0.016</b>	47 (73.44)	42 (55.26)	2.24 (1.09-4.58)	<b>0.026</b>	22 (61.11)	15 (46.88)	1.78 (0.68-4.67)	<b>0.33</b>
6	<i>PHACTRI</i> <i>rs9349379</i> <i>A&gt;G</i>	Геноти пен	GG	5 (10.42)	15 (27.78)	0.30 (0.10-0.91)	<b>0.027</b>	3 (9.68)	12 (31.58)	0.23 (0.06-0.92)	<b>0.04</b>	2 (11.76)	3 (18.75)	0.58 (0.08-4.01)	<b>0.66</b>
			GA	20 (42.67)	21 (38.89)	1.12 (0.51-2.48)	<b>0.84</b>	14 (45.16)	14 (36.84)	1.41 (0.54-3.71)	<b>0.62</b>	6 (35.29)	7 (43.75)	0.70 (0.17-2.85)	<b>0.73</b>
			AA	23 (47.92)	18 (33.33)	1.84 (0.83-4.10)	<b>0.16</b>	14 (45.16)	12 (31.58)	1.78 (0.67-4.77)	<b>0.32</b>	9 (52.94)	6 (37.5)	1.86 (0.47-7.53)	<b>0.49</b>
		Алеле н	G	30 (31.25)	51 (47.22)	0.51 (0.29-0.90)	<b>0.019</b>	20 (32.26)	38 (50.00)	0.47 (0.24-0.96)	<b>0.035</b>	10 (29.41)	13 (40.63)	0.61 (0.22-1.69)	<b>0.44</b>
			A	66 (68.75)	57 (52.78)	1.97 (1.11-3.49)	<b>0.019</b>	42 (67.74)	38 (50.00)	2.10 (1.05-4.22)	<b>0.035</b>	24 (70.59)	19 (59.38)	1.64 (0.59-4.56)	<b>0.44</b>
7	<i>LEP</i> <i>rs7799039</i>	Геноти пен	AA	17 (34.00)	11 (20.37)	2.01 (0.83-4.87)	<b>0.04</b>	13 (40.62)	7 (18.42)	3.03 (1.03-8.94)	<b>0.06</b>	4 (22.22)	4 (25.00)	0.93 (0.19-4.50)	<b>1</b>

	<i>G&gt;A</i>		AG	18 (36.00)	23 (42.59)	0.76 (0.34-1.67)	<b>0.55</b>	11 (34.38)	18 (47.37)	0.58 (0.22-1.53)	<b>0.33</b>	7 (38.89)	5 (31.25)	1.40 (0.34-5.79)	<b>0.73</b>
			GG	15 (3.000)	20 (37.03)	0.70 (0.31-1.61)	<b>0.53</b>	8 (25.00)	13 (34.21)	0.64 (0.23-1.82)	<b>0.44</b>	7 (38.89)	7 (43.75)	0.82 (0.21-3.22)	<b>1</b>
		Алелен	A	52 (52.00)	45 (39.81)	1.52 (0.88-2.62)	<b>0.06</b>	37 (57.81)	32 (42.11)	1.88 (0.96-3.69)	<b>0.09</b>	15 (41.67)	13 (40.63)	1.04 (0.40-2.75)	<b>1</b>
			G	48 (48.00)	63 (58.33)	0.66 (0.38-1.14)	<b>0.06</b>	27 (42.19)	44 (57.89)	0.53 (0.27-1.04)	<b>0.09</b>	21 (58.33)	19 (59.37)	0.96 (0.37-2.52)	<b>1</b>
7	<i>eNOS rs3918226 C&gt;T</i>	Генотипен	TT	1 (2.04)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.48</b>	1 (3.23)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.45</b>	0 (0.00)	0 (0.00)	-	<b>1</b>
			TC	11 (22.45)	4 (7.41)	3.62 (1.1-12.25)	<b>0.048</b>	5 (16.13)	2 (5.26)	3.46 (0.62-19.25)	<b>0.23</b>	6 (33.33)	2 (12.5)	3.50 (0.59-20.68)	<b>0.23</b>
			CC	37 (75.51)	50 (92.59)	0.25 (0.07-0.83)	<b>0.027</b>	25 (80.65)	36 (94.74)	0.23 (0.04-1.25)	<b>0.13</b>	12 (66.67)	14 (87.5)	0.29 (0.05-1.69)	<b>0.23</b>
		Алелен	T	13 (13.27)	4 (3.70)	3.98 (1.25-12.6)	<b>0.01</b>	7 (11.29)	2 (2.63)	4.71 (0.94-23.55)	<b>0.08</b>	6 (16.67)	2 (6.25)	3.00 (0.56-16.07)	<b>0.27</b>
			C	85 (86.73)	104 (96.30)	0.25 (0.08-0.80)	<b>0.01</b>	55 (88.71)	74 (97.37)	0.21 (0.04-1.06)	<b>0.08</b>	30 (83.33)	30 (93.75)	0.33 (0.06-1.79)	<b>0.27</b>
9	<i>9p21 rs1537378 C&gt;T</i>	Генотипен	TT	9 (18.00)	5 (9.62)	2.73 (0.84-8.91)	<b>0.14</b>	7 (21.88)	2 (5.56)	4.76 (0.91-24.89)	<b>0.07</b>	2 (11.11)	3 (18.75)	0.54 (0.08-3.74)	<b>0.69</b>
			TC	24 (48.00)	21 (40.38)	1.36 (0.62-2.98)	<b>0.55</b>	16 (50.00)	15 (41.67)	1.40 (0.54-3.65)	<b>0.63</b>	8 (44.44)	6 (37.5)	1.33 (0.34-5.27)	<b>0.74</b>
			CC	17 (34.00)	26 (50)	0.51 (0.23-1.15)	<b>0.05</b>	9 (28.12)	19 (52.78)	0.35 (0.13-0.96)	<b>0.05</b>	8 (44.44)	7 (43.75)	1.03 (0.26-3.99)	<b>1</b>
		Алелен	T	42 (42.00)	31 (29.81)	1.71 (0.96-3.10)	<b>0.01</b>	30 (46.88)	19 (23.39)	2.46 (1.20-5.05)	<b>0.02</b>	12 (33.33)	12 (37.5)	0.83 (0.31-2.26)	<b>0.80</b>
			C	58 (58.00)	73 (70.19)	0.59 (0.33-1.05)	<b>0.01</b>	34 (53.13)	53 (73.61)	0.40 (0.20-0.83)	<b>0.02</b>	24 (66.67)	20 (62.5)	1.20 (0.44-3.25)	<b>0.80</b>
10	<i>CYP2C19* 2 rs4244285 G&gt;A</i>	Генотипен	AA	2 (4.00)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.23</b>	1 (3.12)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.46</b>	1 (3.13)	0 (0.00)	Infinity	<b>1</b>
			AG	33 (66.00)	18 (33.33)	3.88 (1.72-8.76)	<b>0.002</b>	20 (62.50)	14 (36.84)	1.63 (0.66-4.01)	<b>0.36</b>	13 (72.22)	4 (25.00)	7.80 (1.69-36.06)	<b>0.01</b>
			GG	15 (30.00)	36 (66.67)	0.21 (0.09-0.49)	<b>0.0002</b>	11 (34.38)	24 (63.16)	0.31 (0.11-0.82)	<b>0.03</b>	4 (22.28)	12 (75.00)	0.10 (0.02-0.47)	<b>0.005</b>
		Алелен	A	37 (37.00)	18 (16.67)	2.94 (1.53-5.62)	<b>0.001</b>	22 (34.38)	14 (18.42)	2.32 (1.07-5.04)	<b>0.03</b>	7 (19.44)	4 (12.50)	1.69 (0.44-6.41)	<b>0.52</b>
			G	63 (63.00)	90 (83.33)	0.34 (0.18-0.65)	<b>0.001</b>	42 (65.62)	62 (81.58)	0.43 (0.20-0.95)	<b>0.03</b>	29 (80.56)	28 (87.50)	0.59 (0.16-2.25)	<b>0.52</b>
19	<i>APOE rs7412 C&gt;T</i>	Генотипен	TT	0 (0.00)	0 (0.00)	-	<b>1</b>	0 (0.00)	0 (0.00)	-	<b>1</b>	0 (0.00)	0 (0.00)	-	<b>1</b>
			TC	10 (20.00)	3 (5.56)	4.25 (1.1-16.48)	<b>0.037</b>	7 (21.88)	3 (7.89)	3.27 (0.78-13.88)	<b>0.16</b>	3 (16.67)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.23</b>
			CC	40 (80.00)	51 (94.44)	0.24 (0.06-0.91)	<b>0.037</b>	25 (78.12)	35 (92.11)	0.31 (0.07-1.30)	<b>0.16</b>	15 (83.33)	16 (100.00)	-	<b>0.22</b>
		Алелен	T	10 (10.00)	3 (2.78)	3.89 (1.0-14.57)	<b>0.03</b>	7 (10.94)	3 (3.95)	2.99 (0.74-12.07)	<b>0.19</b>	3 (8.33)	0 (0.00)	Infinity	<b>0.24</b>

#### 4.5. Фармакогенетични изследвания за оптимизиране на антикоагулантната терапия с аценокумарол

Основните критерии за включване в проучването бяха: дълбока венозна тромбоза (ДВТ), белодробен тромбоемболизъм (БТЕ), предсърдно мъждене (ПМ), смяна на сърдечна клапа (HVR) или други сърдечно-съдови заболявания, изискващи антикоагулантна терапия. Всички пациенти са лекувани с аценокумарол поне 3 месеца и всички от тях са достигнали стабилна антикоагулация със стойности на INR между 2 и 4.5 в зависимост от показанието за антикоагулация. Пациенти с диагноза заболяване на черния дроб, бъбречна дисфункция, алкохолизъм, както и с по-ниски и по-високи INR стойности са изключени от анализа.

Клиничните и демографски характеристики на изследваната група български пациенти, подложени на терапия с АЦ са представени в Табл. 3. 2. в раздел «Материали и методи».

##### 4.5.1. Разпределение на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* в общата група от пациенти с повишен риск от тромбози

Разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* в общата група от пациенти с повишен риск от тромбози е обобщено в Табл. 4. 8.

Табл. 4. 8. Разпределение на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* в общата група от пациенти с повишен риск от тромбози.

Ген	Полиморфизъм	Генотип	N (%)
<i>CYP2C9</i>		*1/*1	98 (57.65)
	rs1799853	*1/*2	42(24.71)
	rs1057910	*1/*3	22(12.94)
		*2/*2, *2/*3	8(4.71)
HWE	rs1799853 $\chi^2= 4.59$ p=0.03	rs1057910 $\chi^2= 0.06$ p=0.80	170
<i>APOE</i>		*1/*1	130(81.25)
	rs429358	*1/*4	29(18.13)
		*4/*4	1(0.63)
HWE	$\chi^2= 0.21$ p=0.65		160
<i>APOE</i>	rs7412	*1/*1	141(89.81)
		*1/*2	16(10.19)
HWE	$\chi^2= 0.45$ p=0.50		157
<i>VKORC1*2A</i>		*1/*1	59 (34.71)
	rs9934438	*1/*2A	67(39.41)
		*2A/*2A	44(25.88)
HWE	$\chi^2= 7.18$ p=0.007		170
<i>VKORC1*2B</i>		*1/*1	33(19.76)
	rs2884737	*1/*2B	56(33.53)
		*2B/*2B	78(46.71)
HWE	$\chi^2= 12.8$ p=0.0003		167
<i>VKORC1*3</i>		*1/*1	83(49.70)
	rs7294	*1/*3	63(37.72)
		*3/*3	21(12.57)
HWE	$\chi^2= 2.6$ p=1.0		167
<i>VKORC1*4</i>		*1/*1	104(63.03)
	rs17708472	*1/*4	54(32.73)
		*4/*4	7(4.24)
HWE	$\chi^2= 0$ p=1.0		165

Алелните честоти на *CYP2C9\*1* (76.47%), *CYP2C9\*2* (15.29%) и *CYP2C9\*3* (8.24%) са подобни на тези, съобщени за българското население в предишно проучване на Саръева и колектив от 2008 година [5]. Честотата на А алела за полиморфен вариант *VKORC1\*2A* (*VKORC1* -1639 G>A) беше определена на 45.59%.

За полиморфен вариант *CYP2C9\*3* не се наблюдава отклонение по Харди – Вайнберг ( $\chi^2 = 0.06$ ,  $p=0.80$ ). Подобни резултати са получени за вариантите *VKORC1\*3* ( $p=1.0$ ,  $\chi^2=2.60$ ); *VKORC1\*4* ( $p=1.0$ ,  $\chi^2=0.0$ ); *APOE\*2* ( $\chi^2=0.45$ ,  $p=0.50$ ) и *APOE\*4* ( $\chi^2=0.21$ ,  $p=0.65$ ). Наблюдаваното при останалите полиморфни варианти отклонение от равновесното състояние (за *VKORC1\*2A*  $\chi^2=7.18$ ,  $p=0.007$ ; за *VKORC1\*2B*  $\chi^2 = 12.8$ ,  $p=0.0003$ ; за *CYP2C9\*2*  $\chi^2 = 4.59$ ,  $p=0.03$ ) би могло да се дължи на по – големия брой пациенти, нуждаещи се от ниски дози АЦ в изследваната извадка. По този начин равновесието се нарушава, поради по-високия брой полиморфни алели, асоцииращи се със значителна редукция в оптималната поддържаща доза медикамент за пациента. В този случай отклонението от равновесното състояние по Харди - Вайнберг е допустимо. Извършено е генотипиране на 140 здрави контролни индивиди с цел определяне на популационната честота на въпросните варианти в гените *CYP2C9* и *VKORC1* за българската популация, при които не се наблюдава отклонение от закона на Харди-Вайнберг за нито един от изследваните маркери.

#### 4.5.2. Анализ на значението на клиничните фактори и изследваните варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* върху отговора към лекарствена терапия с аценокумарол

Създаването на математически алгоритъм е извършено на базата на клинични и генетични данни за пациентите от т. нар. тестова група (N=120). Точността и отклонението на модела бяха проверени в независима валидираща група от пациенти (N=51). Разпределението на пациентите в двете групи - тестова и валидираща, беше извършено на случаен принцип с помощта на статистически пакет SPSS 20.0 с цел предотвратяване на влиянието на външните фактори или преценката на изследователя върху текущия експеримент.

Резултатите от непараметричния корелационен анализ за определяне на връзката на клиничните, демографски и генетични характеристики с дневната доза аценокумарол са обобщени в Табл. 4. 9.

**Табл. 4. 9.** Корелационен анализ на връзката на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1* и *APOE* и разглежданите клинични показатели със средната оптимална поддържаща доза аценокумарол при изследваната група пациенти с повишен риск от тромбози.

Показател		Kendall's tau_b		Spearman's rho	
		Корелационен коефициент	Р стойност	Корелационен коефициент	Р стойност
Клинични	Диагноза	0.055	0.45	0.063	0.50
	Пол	-0.043	0.58	-0.052	0.58
	Възраст	-0.190	0.003	-0.273	0.003
	Тегло	0.114	0.11	0.170	0.102
	Височина	0.105	0.26	0.150	0.25
	ИТМ	0.192	0.035	0.259	0.46
	Тютюнопушене	0.034	0.69	0.041	0.69
	Амиодарон	0.105	0.20	0.125	0.21
	Статини	0.118	0.20	0.139	0.21
Фармакогенетични	<i>VKORC1*2A</i> rs9923231 (-1639G>A)	-0.446	<0.001	-0.545	<0.001
	<i>VKORC1*2B</i> rs2884737	0.321	<0.001	0.398	<0.001
	<i>VKORC1*3</i> rs7294	0.343	<0.001	0.416	<0.001
	<i>VKORC1*4</i> rs17708472	0.174	0.023	0.208	0.026
	<i>CYP2C9*2</i>	-0.235	0.002	-0.280	0.002
	<i>CYP2C9*3</i>	-0.162	0.037	-0.193	0.036
	<i>APOE</i> rs7412	0.064	0.43	0.076	0.43
	<i>APOE</i> rs429358	-0.057	0.48	-0.068	0.48

Проведеното от нас проучване на полиморфните варианти *VKORC1 -1639G>A* (rs9934438 ) и *VKORC1 1173C>T* (rs9923231), определящи хаплотип *VKORC1\*2A*, при изследваната група от български пациенти с повишен риск от тромбози потвърди тяхната асоциация с необходимостта от ниска доза индиректен антикоагулант, особено когато са в хомозиготно състояние. Също така беше установено, че тези два варианта се намират в пълна неравновесна скаченост, което е в съответствие с резултатите от други проучвания [6, 7]. Поради тази причина в последващите анализи беше включен само един от тези два полиморфизма – в случая *VKORC1 -1639G>A*.

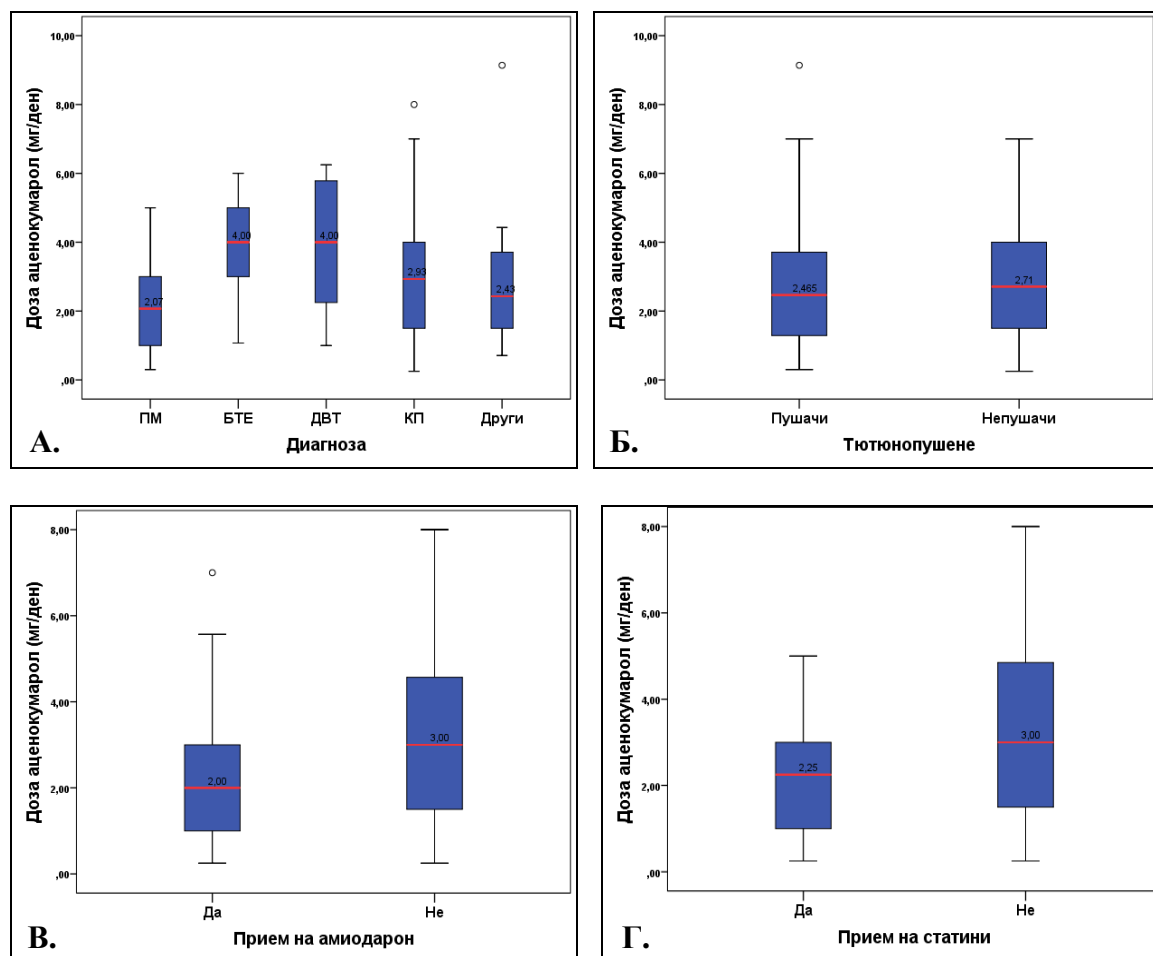
Чрез използване на t-тест бяха сравнени средните дневни поддържащи дози аценокумарол между групите пациенти с различни генотипи в тестовата група за всички изследвани полиморфни варианти. Числените данни са представени като средна стойност ± стандартно отклонение в Табл. 4. 10.

**Табл. 4. 10.** Ефект на носителството на съответните генотипи на изследваните полиморфни варианти върху средната дневна поддържаща доза аценокумарол при изследваната тестова група български пациенти с повишен риск от тромбози.

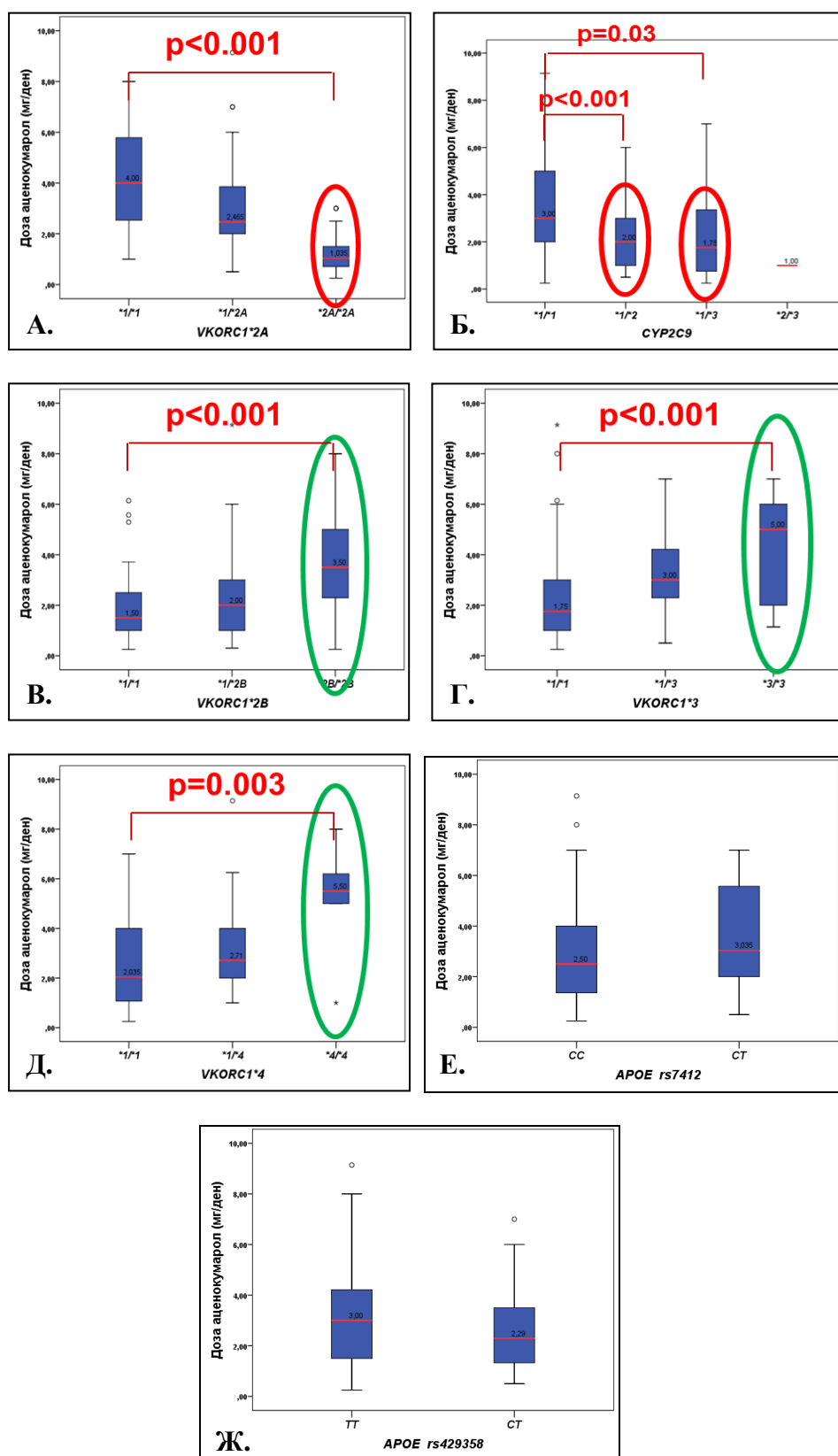
Ген	Полиморфизъм	Генотип	N (%)	Средна доза ± стандартно отклонение	% редукция/увеличаване в дозата спрямо дивия тип
<i>CYP2C9</i>		*1/*1	76 (64.41)	3.51±2.00	-
	rs1799853	*1/*2	25(21.19)	2.10±1.40	-40.17
	rs1057910	*1/*3	16(13.56)	2.28±1.90	-35.04
		*2/*3	1(0.85)	1.00±0.00	-71.51
HWE	rs1799853 $\chi^2= 1.81$ p=0.18	rs1057910 $\chi^2= 0.71$ p=0.39	<b>118</b>		
<i>APOE</i>		*1/*1	87(79.09)	3.05±2.02	-
	rs429358	*1/*4	23(20.91)	2.66±1.76	-11.11
		*4/*4	0(0.00)	0±0.00	-
HWE	$\chi^2= 1.5$ p=0.22		<b>110</b>		
<i>APOE</i>	rs7412	*1/*1	99(90.83)	2.92±1.94	-
		*1/*2	10(9.17)	3.53±2.28	17.38
HWE	$\chi^2= 0.25$ p=0.62		<b>109</b>		
<i>VKORC1*2A</i>		*1/*1	48(40.68)	4.01±1.89	-
	rs9934438	*1/*2A	44(37.29)	2.96±1.83	-29.91
		*2A/*2A	26(22.03)	1.30±0.84	-77.21
HWE	$\chi^2= 6.1$ p=0.01		<b>118</b>		
<i>VKORC1*2B</i>		*1/*1	21(18.26)	2.14±1.68	-
	rs2884737	*1/*2B	37(32.17)	2.29±1.74	4.27
		*2B/*2B	57(49.57)	3.72±1.91	45.01
HWE	$\chi^2= 9.45$ p=0.002		<b>115</b>		
<i>VKORC1*3</i>		*1/*1	54(46.96)	2.28±1.95	-
	rs7294	*1/*3	48(41.74)	3.41±1.61	32.19
		*3/*3	13(11.30)	4.15±2.16	53.28
HWE	$\chi^2= 0.22$ p=0.64		<b>115</b>		
<i>VKORC1*4</i>		*1/*1	70(60.87)	2.69±1.87	-
	rs17708472	*1/*4	39(33.91)	3.12±1.84	12.25
		*4/*4	6(5.22)	5.20±2.33	71.51
HWE	$\chi^2= 0.03$ p=0.85		<b>115</b>		

Средната дневна поддържаща доза аценокумарол в групата пациенти, носители на полиморфен вариант дори за един от изследваните полиморфизми е значително по-ниска от

средната поддържаща доза антикоагулант при пациентите с референтния алел. Носителите на референтен генотип за *CYP2C9* и *VKORC1* изискват близки дневни, поддържащи дози аценокумарол ( $3.51 \pm 2.00$  (SD) мг за *CYP2C9* \*1\*1 и  $4.01 \pm 1.89$  (SD) мг за *VKORC1*\*1/\*1). Наличието на *CYP2C9*\*1\*2 генотип води до 40.17% редукция в дозата, докато носителството на *CYP2C9*\*1\*3 води до -35.04% редукция спрямо носителите на референтни алели за съответните полиморфизми в гена *CYP2C9*. Влиянието на едновременното носителство на два вариантни алели в гена *CYP2C9* (*CYP2C9*\*2\*2 или *CYP2C9*\*2\*3) не може да се определи, поради наличието на един единствен пациент с такъв генотип. Носителите на *VKORC1*\*1/\*2A изискват 29.91% по-ниска доза, докато *VKORC1*\*2A/\*2A носителите изискват 77.21% по-ниска доза в сравнение с носителите на референтния генотип.



**Фиг. 4. 5.** Влияние на основните клинични фактори върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група (не са наблюдавани значими разлики).



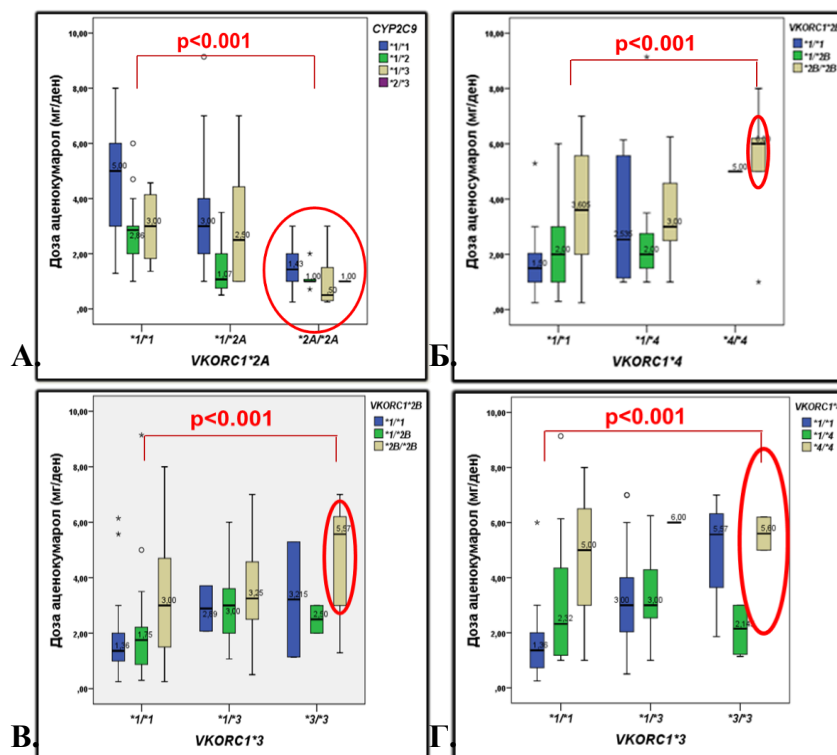
**Фиг. 4. 6.** Влияние на носителството на полиморфни варианти в гените *VKORC1*, *CYP2C9* и *APOE* върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група (отбелязани са само статистически значимите асоциации).

Ефектът от комбинираното носителство на полиморфни варианти и за двата гена върху дневната поддържаща доза АЦ е сравнен с референтния генотип (Табл. 4.11, Фиг.4.7). Пациентите, които имат един мутантен алел в гена *CYP2C9* и два в *VKORC1* изискват значително по-ниски дози в сравнение с носителите на други групи генотипи в същите гени.

Носители на референтен генотип в двата гена води до по-високо дозово изискване ( $4.66 \pm 1.28$  мг/ден) в сравнение с пациентите с различни комбинации от полиморфни варианти.

**Табл. 4. 11.** Ефект на комбинираното носителство на генотипи за *CYP2C9* и *VKORC1* върху средната, дневна, поддържаща доза аценокумарол при изследваната група български пациенти.

<i>VKORC1</i>	<i>CYP2C9</i>	N (%)	Средна доза $\pm$ стандартно отклонение	% редукция в дозата спрямо <i>VKORC1</i> *1*1/ <i>CYP2C9</i> *1*1
*1/*1	*1/*1	31 (26.27%)	4.66 $\pm$ 1.28	-
	*1/*2	12 (10.17%)	2.61 $\pm$ 1.43	-43.99
	*1/*3	4 (3.39%)	2.98 $\pm$ 1.43	-36.05
	*2/*3	0 (0.00%)	-	-
*1/*2A	*1/*1	33 (27.97%)	3.27 $\pm$ 1.73	-29.83
	*1/*2	6 (5.08%)	1.43 $\pm$ 1.15	-69.31
	*1/*3	6 (5.08%)	3.07 $\pm$ 2.32	-34.12
	*2/*3	0 (0.00%)	-	-
*2A/*2A	*1/*1	14 (11.86%)	1.50 $\pm$ 0.86	-67.81
	*1/*2	5 (4.24%)	1.15 $\pm$ 0.49	-75.32
	*1/*3	6 (5.08%)	1.10 $\pm$ 1.08	-78.33
	*2/*3	1 (0.85*)	1.00 $\pm$ 0.00	-78.54



**Фиг. 4. 7.** Ефект на комбинираното носителство на полиморфни варианти в гените *VKORC1* и *CYP2C9* върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група.

### 4.5.3. Създаване на фармакогенетичен модел за определяне на оптималната доза аценокумарол

Методите на еднокомпонентна и многокомпонентна линейна регресия бяха приложени за оценка на основните генетични и клинични фактори и тяхното влияние върху поддържащата дневна доза аценокумарол в тестовата група от пациенти, подложени на терапия с кумаринов антикоагулант. Резултатите от еднокомпонентният анализ са представени в **Табл. 4. 12.**

**Табл. 4. 12.** Генетични и клинични фактори, оказващи влияние върху дневната оптимална поддържаща доза аценокумарол при изследваната група от пациенти със сърдечно-съдови заболявания. С R<sup>2</sup> е означен процентът вариабилност в дозата индиректен антикоагулант, дължащ се на съответния фактор.

Фактори:	R <sup>2</sup> (%)	Коригирано R <sup>2</sup> (%)	Р стойност
Възраст	6.4	5.6	0.006
Пол	0.4	<0.1	0.47
ИТМ	3.3	1.6	0.17
Височина	1.9	0.2	0.30
Тегло	1.6	0.5	0.22
Пушене	<0.1	<0.1	0.91
Амиодарон	1.1	0.1	0.29
Статини	2.5	1.4	0.15
Диагноза	1.8	<0.1	0.16
VKORC1*2A	26.8	26.1	<0.001
VKORC1*2B	12.4	11.7	<0.001
VKORC1*3	12.2	11.4	<0.001
VKORC1*4	6.1	5.3	0.008
CYP2C9*2	7.2	6.4	0.003
CYP2C9*3	2.9	2.1	0.063
APOE rs429358	0.7	<0.1	0.40
APOE rs7412	0.8	<0.1	0.35

За създаване на фармакогенетичен алгоритъм променливи като възраст, пол, диагноза, тегло, прием на амиодарон и статини, както и генотипите на CYP2C9, CYP4F2, APOE и VKORC1 бяха включени едновременно при създаването на многокомпонентния модел. В-коэффициентите представляват относителната сила на влияние върху медикаментозното дозиране на всяка независима променлива, включена в модела. R<sup>2</sup> представлява процента вариабилност в дозата, който се обяснява от съответния фактор или модел. Достоверността на определените коефициенти бе оценена след десетократно повторение на процеса на случайно разпределение на пациентите в основната и валидиращата групи.

Многокомпонентният анализ показва, че възрастта и носителството на CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, VKORC1\*2A, VKORC1\*3 алели допринасят за 43.8% от промяната в средната дневна поддържаща доза аценокумарол (Табл. 4. 13).

**Табл. 4. 13.** Независими генетични и клинични фактори, оказващи влияние върху дневната оптимална поддържаща доза аценокумарол след прилагане на множествен регресионен анализ.

Независими променливи	Нестандартизирани коефициенти		t	Р стойност
	В.	Станд. грешка		
Константа	5.939	0.685	8.664	4.97*10 <sup>-14</sup>
Възраст (год)	-0.033	0.010	-3.186	0.002
VKORC1*2A	-1.149	0.194	-5.931	3.67*10 <sup>-8</sup>
VKORC1*3	0.433	0.220	1.972	0.05
CYP2C9*2	-1.425	0.334	-4.265	4.30*10 <sup>-5</sup>
CYP2C9*3	-0.486	0.400	-1.213	0.228

Създаден е следният математически алгоритъм:

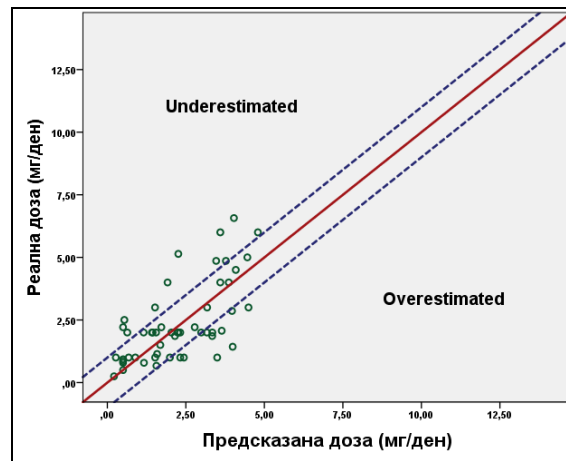
<p><b>Оптимална дневна поддържаща доза аценокумарол (мг/ден) = 5.939 – 0.033*(възраст в години) – 1.149* (брой VKORC1*2A алели) + 0.433*(брой VKORC1*3 алели) – 1.425*( брой CYP2C9*2 алели) – 0.486*(брой CYP2C9*3 алели)</b></p>
--

#### 4.5.4. Валидиране на създадения фармакогенетичен модел в независима група от пациенти с повишен риск от тромбози

Използвайки непараметричен корелационен анализ, изчислените на базата на създадения математически модел дневни дози аценокумарол за пациентите от валидиращата група (N = 52) бяха сравнени с реалните такива, за да се провери степента на съвпадение.

Въз основа на разликата между прогнозираните и наблюдаваните дози аценокумарол е изчислена средната грешка (ME), средната абсолютна грешка (MAE) и %ME и %MAE изразени в проценти. Стандартно отклонение (SD) и 95% доверителен интервал (95% CI) са изчислени за всички параметри. Стойността на ME показва отклонението в предсказването на доза аценокумарол за съответния модел и MAE оценява точността на този модел.

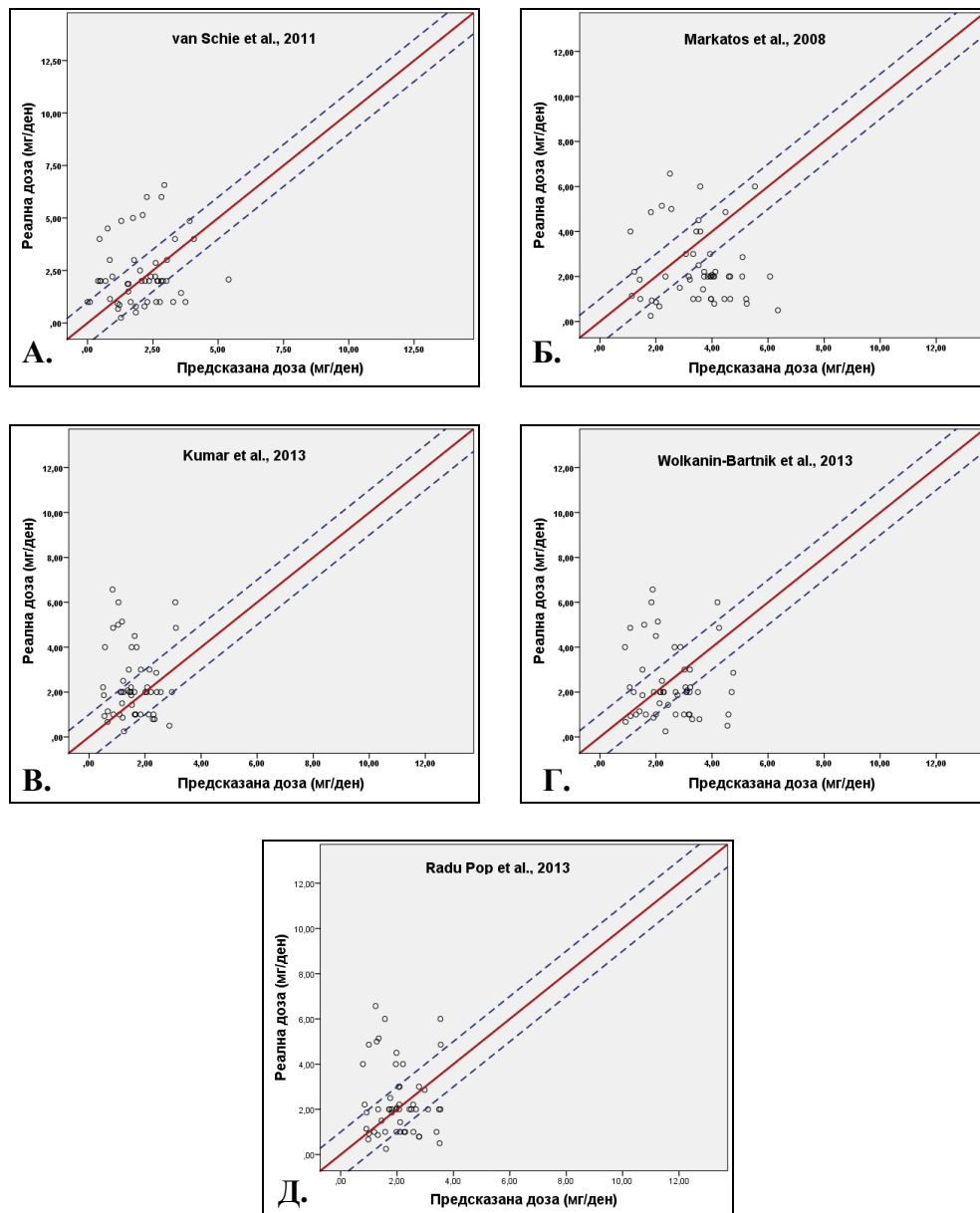
Беше установена статистически значима, умерена корелация между предсказаната на базата на фармакогенетичния модел доза и действителната дневна доза аценокумарол във валидиращата група (Спиърмън  $R = 0.637$ ,  $p < 0.001$ ), което означава, че 40.58% от дисперсията на реално предписаната доза е свързана с тази на предсказаната такава ( $r^2 = 40.58\%$ ). Въпреки това, средните стойности на действителните и прогнозираните дневни дози медикамент се различават значително (Wilcoxon Rank Test,  $p = 0.0006$ ). Средната предсказана доза аценокумарол е  $2.36 \pm 1.57$ , докато тази, с която са лекувани пациентите е по-ниска:  $2.12 \pm 1.57$ .



**Фиг 4.8.** Валидиране на създадения математически алгоритъм в независима група от 50 пациенти с повишен риск от тромбози. Червената непрекъсната линия показва перфектната прогноза на фармакогенетичния модел. Сините прекъснати линии заграждат площта, в която са разположени предсказаните дози, при които се наблюдава отклонение от  $\pm 1$  мг/ден спрямо реалната доза антикоагулант.

#### 4.5.5. Сравнение на създадения фармакогенетичен модел с алгоритми за други популационни групи

Към настоящия момент в научната периодика се откриват осем фармакогенетични алгоритъма за предсказване на оптималните начална и поддържаща дози аценокумарол за различни популационни групи [8]. При всички тях е използвана множествена линейна регресия като статистически метод за генериране на основните коефициенти на влияние за всеки параметър, включен в съответния модел. Всички модели включват както клинични променливи (възраст, пол, ИТМ, комедияция, прием на витамин К), така и генетични фактори като полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *VKORC1*, *APOE* и *CYP4F2*. Осемте математически алгоритъма, които бяха открити в медицинската литература, са разработени от следните изследователски групи: Markatos и съавт., Ван Schie и съавт., Vorobia и съавт., Rathore и съавт., Cerezo-Manchado и съавт., Kumar и съавт., Radu Pop и съавт. и Wolkanin-Bartnik J. и съавт. [8-15].



**Фиг. 4. 9.** Диаграми на разсейване на стойностите на реалната и предсказаната чрез математически алгоритъм дози аценокумарол за различни популационно-специфични модели.

Въпреки немалкия брой публикувани прогностични регресионни модели, само този на Vorobia et al. [10] е интегриран в стандартната клинична практика. Това отчасти се дължи на факта, че повечето от тези алгоритми не са външно валидирани в независима група от пациенти с повишен риск от тромбози [8] или ако е осъществена такава, то получените резултати от репликацията са незадоволителни. Поради тази причина ние си поставихме задача да сравним тези от вече публикуваните математически модели, за които имаме налични данни и да проверим техните възможности за предсказване на оптималната доза медикамент в нашата валидираща група от пациенти.

Тъй като ние не разполагаме с информация за генотипите на полиморфния вариант в гена *GGCX*, беше невъзможно да се приложим уравнението на Rathore и др. за изчисляване на оптималната доза аценокумарол за нашите пациенти. За уравненията на Vorobia и съавт. и Crezo-Manchado и съавт. липсва информация за стойностите на независимите коефициенти, което също прави прилагането на тези уравнения върху нашата валидираща група невъзможно. Само уравненията на Markatos и съавт. (2008 г.), van Schie и съавт. (2011 г.), Radu Pop и съавт. (2013 г.), Kumar и съавт. (2013 г.) и Wolkanin-Bartnik и съавт. (2013 г.), съдържащи цялата необходима информация за прилагането на моделите за нашите 52 пациенти с повишен риск от тромбози.

**Табл. 4. 15.** Обобщение на резултатите от сравнението на пет алгоритъма за дозиране на аценокумарол при независима група от български пациенти с повишен риск от тромбози (валидираща група, N=52).

Модел	Средна доза ± станд. откл.	ME	%ME	MAE	%MAE	P
Markatos et al., 2008	3.50±1.27	1.15±1.32	96.32±108.52	1.46±0.94	103.06±101.03	0.58
Kumar et al., 2013	1.60±0.68	-0.76±1.21	-11.93±54.67	1.01±0.99	42.10±36.08	0.68
Wolkanin-Bartnik et al., 2013	2.56±1.03	0.15±1.31	40.52±89.44	1.02±0.82	64.35±73.19	0.56
van Schie et al., 2011	2.05±1.13	-0.34±1.76	27.54±106.69	1.36±1.18	78.24±80.23	0.50
Radu Pop et al., 2013	2.36±0.79	-0.31±1.20	15.31±72.44	0.87±0.86	45.32±57.68	0.67
Tzveova et al., 2015?	2.12±1.57	-0.23±1.35	-5.50±99.35	1.09±0.81	66.94±72.37	0.63

Моделът на Markatos et al. показва най-високи стойности на MAE от 1,46 мг/ден. Въпреки това, този модел среща трудности при предсказването на дози под 2мг/ден, което го прави неприложим при пациенти с повишена чувствителност към антикоагулантната терапия.

Всички останали модели показват близки стойности за ME и MAE, като при всеки се наблюдава трудности за предсказване на високи дози аценокумарол, вероятно поради включването в математическите модели основно на фактори, определящи повишена чувствителност към терапията с аценокумарол.

Процентът дисперсия в стойностите на реално предписаната доза аценокумарол, която се обясняват от дисперсията на предсказаната такава, се различава при петте алгоритъма ( $r^2$  25-46.24%), което потвърждава необходимостта от използването на популационно – специфични модели за различните етнически групи. При всички модели беше наблюдавана умерена корелация между предсказаните и реалните дози антикоагулант (Табл. 4.15).

#### 4.6. Асоциативни изследвания на водещи кандидат - гени и риска от сърдечно-съдови заболявания

Всички участници в изследването бяха генотипизирани за генетични полиморфизми, подбрани от геномни, асоциативни проучвания при европейски популации или за такива, показали асоциация със заболяванията при други популационни групи.

**Табл. 4.16.** Основни характеристики на на пациентите с ИБС, ИМ и АХ.

Показател	Пациенти с ИБС	Пациенти с ИМ	Пациенти с АХ
Възраст (години)	66.27±8.81	66.34 ± 10.39	51.91±17.01
Пол (мъже)	60 (55.56)	92 (60.53)	72 (33.49%)
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	29.66 ± 5.72	28.36 ± 4.89	28.31±6.5
Общ холестерол (ммол/л)	5.64±1.04	5.94±0.75	5.24±1.15
Триглицериди (ммол/л)	1.32±0.67	2.07±0.56	1.71±1.35
LDL (ммол/л)	4.23±1.06	4.14±0.79	3.79±1.11
HDL (ммол/л)	1.22±0.37	1.39±0.28	1.16±0.37
Систолечно артериално налягане (САН) (ммHg)	147.86±21.83	135.92±10.96	143.40±18.33
Диастолично артериално налягане (ДАН) (ммHg)	87.50±13.64	83.64±6.60	89.09±12.05

Първият етап от нашето проучване включваше подбор на кандидат гени и полиморфизми, за които да бъде проведено асоциативно изследване и определяне на връзката им с развитието на ИБС, МИ и АХ. При избора на полиморфни варианти бяха съблюдавани следните условия:

1. Варианти в гени с установена положителна асоциация със заболяването в минимум едно проучване;

2. Варианти в гени, неизследвани до момента за асоциация със заболяванията в българска популация.

Като краен резултат, за анализа бяха избрани 29 полиморфизма в или близост до 20 известни гени. За установяване на асоциация с ИБС, ИМ и АХ, върху получените данни от генотипираните маркери, беше приложен двустранния точен тест на Фишер. Информацията за всички кандидат гени и полиморфизми, показали значима връзка с изследваните заболявания, тяхната локализация, разпределението за всеки полиморфизъм сред случаи и контроли, както и оценката за значимостта на асоциацията със заболяването изразена като P-value, са представени в Табл. 4. 17 - 21.

#### **4.6.1. Асоциативни изследвания на водещи кандидат - гени и риска от артериална хипертония**

В групата на пациентите с АХ беше извършено асоциативно изследване за 14 полиморфни варианта в 13 кандидат гена и хромозомни локуса, като беше установена положителна асоциация със заболяването при четири от тях (Табл. 4. 17).

Не беше установена статистически значима разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти в групите на контролите и пациентите с АХ по отношение на останалите полиморфни варианти. Вероятно това се дължи на недостатъчно голямата по обем извадка от хипертоници и здрави индивиди, която сме изследвали (Табл. 8. 2 в раздел „Приложения“ на дисертационния труд). Положителните данни за асоциация показват, че става дума за полиморфизми с изключително малък ефект върху риска за развитие на заболяването.

#### **4.6.2. Асоциативни изследвания на водещи кандидат - гени и риска от исхемична болест на сърцето и миокарден инфаркт**

В общата група от пациенти с ИБС и/или ИМ беше извършено асоциативно изследване за 29 полиморфни варианта в 19 кандидат гена и хромозомни локуса, като беше установена положителна асоциация със заболяването при девет от тях (Табл. 4. 18).

Не беше установена статистически значима разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти в групите на контролите и пациентите с ИБС и/или ИМ по отношение на останалите полиморфни варианти (Табл. 8. 3 в раздел „Приложения“ на дисертационния труд). Вероятно това също се дължи на слабия ефект, който оказват подбраните полиморфизми по отношение на изучаваното заболяване, както и на недостатъчно голямата по обем извадка от пациенти и здрави индивиди с български произход.

**Табл. 4. 17.** Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с АХ и популационната група от индивиди с български произход. Показани са само статистически значимите асоциации с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Хр.	Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P
15	<i>CYP2C8</i> rs1050968 T>C	Генотип ен	CC	5 (1.55)	6 (1.25)	-	0.56	4 (4.89)	2 (0.85)	-	0.11	1 (0.48)	4 (1.63)	-	0.75
			CT	62 (19.25)	89 (18.54)			19 (23.17)	39 (16.59)			43 (20.48)	50 (20.41)		
			TT	225 (69.88)	385 (80.21)			59 (71.95)	194 (82.55)			166 (79.05)	191 (77.96)		
		Алелен	C	72 (12.33)	101 (10.52)	1.20 (0.87-1.65)	0.27	27 (16.46)	43 (9.15)	1.96 (1.17-3.29)	0.01	45 (10.71)	58 (11.84)	0.89 (0.59-1.35)	0.60
			T	512 (87.67)	859 (89.48)			137 (83.54)	427 (90.85)			375 (89.29)	432 (88.16)		
16	<i>CDH13</i> rs11646213 A>T	Генотип ен	TT	46 (15.59)	83 (16.80)	-	0.10	8 (9.52)	40 (16.67)	-	0.27	38 (17.84)	43 (16.93)	-	0.01
			TA	129 (43.43)	245 (49.60)			44 (52.38)	111 (46.25)			85 (39.91)	134 (52.76)		
			AA	122 (41.08)	166 (33.60)			32 (38.10)	89 (37.08)			90 (42.25)	77 (30.32)		
		Алелен	T	221 (37.21)	411 (41.60)	0.83 (0.67-1.03)	0.08	60 (35.71)	191 (39.79)	0.84 (0.58-1.21)	0.35	161 (37.79)	220 (43.31)	0.80 (0.61-1.03)	0.09
			A	373 (62.79)	577 (58.40)			108 (64.29)	289 (60.21)			265 (62.21)	288 (56.69)		
19	<i>APOE</i> rs429358 C>T	Генотип ен	CC	3 (1.06)	2 (0.40)	-	0.71	2 (2.5)	1 (0.41)	-	0.15	1 (0.50)	1 (0.39)	-	0.34
			CT	48 (17.02)	84 (16.94)			18 (22.5)	32 (13.28)			30 (14.85)	52 (20.39)		
			TT	231 (81.92)	410 (82.66)			60 (75)	208 (86.31)			171 (84.65)	202 (79.22)		
		Алелен	C	54 (9.57)	88 (8.87)	1.09 (0.76-1.55)	0.65	22 (13.75)	34 (7.05)	2.10 (1.19-3.71)	0.01	32 (7.92)	54 (10.59)	0.73 (0.46-1.15)	0.17
			T	510 (90.43)	904 (91.13)			138 (86.25)	448 (92.95)			372 (92.08)	456 (89.41)		
19	<i>APOE</i> rs7412 C>T	Генотип ен	TT	0 (0.00)	4 (0.82)	-	0.09	0 (0.00)	2 (0.83)	-	0.96	0 (0.00)	2 (0.80)	-	0.15
			TC	27 (9.54)	66 (13.47)			8 (9.88)	29 (12.03)			19 (9.41)	37 (14.86)		
			CC	256 (90.46)	420 (85.71)			73 (90.12)	210 (87.14)			183 (90.59)	210 (84.34)		
		Алелен	T	27 (4.77)	74 (7.55)	0.61 (0.39-0.97)	0.03	8 (4.94)	33 (6.85)	0.71 (0.32-1.56)	0.39	19 (4.70)	41 (8.23)	0.55 (0.31- 0.96)	0.03
			C	539 (95.23)	906 (92.45)			154 (95.06)	449 (93.15)			385 (95.30)	457 (91.76)		

**Табл. 4. 18.** Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с ИБС (със или без прекаран миокарден инфаркт) и популационната група от индивиди с български произход. Показани са само статистически значимите асоциации с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Хр.	Ген/ вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P
1	CYP2J2 rs890293 C>A	Генотипен	AA	5 (1.97)	2 (0.43)	-	0.09	4 (2.67)	0 (0)	-	0.05	1 (0.96)	2 (0.84)	-	0.78
			AC	32 (12.59)	50 (10.62)			18 (12)	23 (9.91)			14 (13.46)	27 (11.30)		
			CC	217 (85.43)	419 (88.96)			128 (85.33)	209 (90.09)			89 (85.58)	210 (87.87)		
		Алелен	A	42 (8.26)	54 (5.73)	1.48 (0.92-2.25)	0.06	26 (8.67)	23 (4.96)	1.81 (1.02-3.25)	0.04	16 (7.69)	31 (6.49)	1.20 (0.64-.25)	0.62
C	466 (91.73)		888 (94.26)	274 (91.33)	441 (95.04)			192 (92.31)	447 (93.51)						
6	PHACTR1 rs9349379 A>G	Генотипен	GG	60 (18.93)	76 (15.54)	-	0.43	42 (20.69)	36 (15.06)	-	0.14	18 (15.79)	40 (15.94)	-	0.64
			GA	143 (45.11)	225 (46.01)			94 (46.31)	105 (43.93)			49 (42.98)	120 (47.81)		
			AA	114 (35.96)	189 (38.65)			67 (33.01)	98 (41.00)			47 (51.23)	91 (36.25)		
		Алелен	G	263 (41.48)	377 (38.47)	1.13 (0.92-1.39)	0.23	178 (43.84)	177 (37.03)	1.33 (1.01-1.74)	0.046	85 (37.28)	200 (39.84)	0.90 (0.65-1.24)	0.51
A	371 (58.52)		603 (61.53)	228 (56.16)	301 (62.97)			143 (62.72)	302 (60.16)						
9	9p21 rs7865618 A>G	Генотипен	GG	42	84	-	0.04	21	32	-	0.24	21	52	-	0.13
			GA	147	245			104	130			43	115		
			AA	135	166			82	78			53	88		
		Алелен	G	231 (36.65)	413 (41.72)	0.77 (0.63-0.95)	0.01	146 (35.27)	194 (40.42)	0.80 (0.61-1.05)	0.13	85 (36.33)	219 (42.94)	0.76 (0.55-1.04)	0.09
A	417 (64.35)		577 (58.28)	268 (64.73)	286 (59.58)			149 (63.68)	291 (57.06)						
9	ABO rs579459 C>T	Генотипен	CC	37 (11.42)	34 (6.89)	-	0.04	24 (11.59)	16 (6.69)	-	0.24	13 (11.11)	18 (7.09)	-	0.25
			CT	144 (44.44)	209 (42.39)			90 (43.48)	101 (42.26)			54 (46.15)	108 (42.52)		
			TT	143 (44.14)	250 (50.71)			93 (44.93)	122 (51.05)			50 (42.74)	128 (50.39)		
		Алелен	C	218 (33.64)	277 (28.09)	1.30 (1.04-1.61)	0.02	138 (33.33)	133 (27.82)	1.30 (0.97-1.73)	0.08	80 (34.19)	144 (28.35)	1.31 (0.94-1.83)	0.12
T	430 (66.36)		709 (71.91)	276 (66.67)	345 (72.18)			154 (65.81)	364 (71.65)						
10	TCF7L2 rs290481 C>T	Генотипен	TT	12 (3.74)	32 (6.48)	-	0.20	5 (2.44)	17 (7.11)	-	0.03	7 (6.03)	15 (5.88)	-	0.88
			TC	100 (31.15)	159 (32.19)			62 (30.24)	82 (34.31)			38 (32.76)	77 (30.20)		
			CC	209 (65.11)	303 (61.33)			138 (67.32)	140 (58.57)			71 (61.21)	163 (63.92)		
		Алелен	T	124 (19.32)	223 (22.57)	1.29 (1.05-1.61)	0.017	72 (15.56)	116 (24.27)	0.66 (0.47-0.92)	0.01	52 (22.41)	107 (20.98)	1.09 (0.75-1.58)	0.70
C	518 (80.69)		765 (77.43)	338 (82.44)	362 (75.73)			180 (77.59)	403 (79.02)						
12	ATP2B1 rs2681472 A>G	Генотипен	GG	14 (4.33)	8 (1.62)	-	0.02	11 (5.34)	3 (1.25)	-	0.03	3 (2.56)	5 (1.97)	-	0.92
			GA	105 (32.51)	138 (27.94)			72 (34.95)	69 (28.75)			33 (28.21)	69 (27.17)		
			AA	204 (63.16)	348 (70.45)			123 (59.71)	168 (70)			81 (69.23)	180 (70.87)		
		Алелен	G	133 (20.59)	154 (15.59)	1.40 (1.09-1.82)	0.01	94 (22.82)	75 (15.63)	1.60 (1.14-2.24)	0.01	39 (16.67)	79 (15.55)	1.09 (0.71-1.65)	0.75
A	513 (79.41)		834 (84.41)	318 (77.18)	405 (84.38)			195 (83.33)	429 (84.45)						
19	APOE rs429358 C>T	Генотипен	CC	5 (1.55)	2 (0.40)	-	0.13	2 (0.97)	1 (0.42)	-	0.03	3 (2.56)	1 (0.39)	-	0.42
			CT	71 (21.98)	84 (16.94)			47 (18.08)	32 (13.28)			24 (20.51)	52 (20.39)		
			TT	247 (76.47)	410 (82.66)			157 (76.21)	208 (86.31)			90 (76.92)	202 (79.22)		
		Алелен	C	81 (12.54)	88 (8.87)	1.47 (1.07-2.03)	0.02	51 (12.38)	34 (7.05)	1.86 (1.18-2.94)	0.02	30 (12.82)	54 (10.59)	1.24 (0.77-2.00)	0.38
T	565 (87.46)		904 (91.13)	361 (87.62)	448 (92.95)			204 (87.18)	456 (89.41)						
20	GNAS, EDN3 rs6015450 G>A	Генотипен	GG	5 (1.54)	9 (1.82)	-	0.21	3 (1.45)	7 (2.93)	-	0.01	2 (1.71)	2 (0.78)	-	0.43
			GA	49 (15.12)	98 (19.84)			25 (12.08)	52 (21.76)			24 (20.51)	46 (18.04)		
			AA	270 (83.33)	387 (78.34)			179 (86.47)	180 (75.31)			91 (77.78)	207 (81.18)		
		Алелен	G	59 (9.11)	116 (11.74)	0.75 (0.54-1.05)	0.09	31 (7.49)	66 (13.81)	0.51 (0.32-0.79)	0.002	28 (11.97)	50 (9.80)	1.25 (0.77-2.04)	0.44
A	589 (90.90)		872 (88.26)	383 (92.52)	412 (86.19)			206 (88.03)	460 (90.20)						

**Табл. 4. 19.** Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и популационната група от индивиди с български произход. Показани са само статистически значимите асоциации с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Хр	Ген/ Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИБС (без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P
1	<i>PCSK9</i> rs11206510 C>T	Генотип ен	CC	8 (2.49)	15 (3.02)	-	0.11	4 (1.85)	5 (2.07)	-	0.03	4 (3.45)	10 (3.93)	-	0.76
			CT	87 (27.10)	125 (25.20)			59 (28.78)	54 (22.41)			28 (24.38)	71 (27.84)		
			TT	226 (70.40)	356 (71.77)			142 (69.27)	182 (75.52)			84 (72.41)	174 (68.24)		
		Алелен	C	52 (20.97)	155 (16.63)	1.43 (1.01-2.03)	0.04	32 (21.33)	64 (13.28)	1.77 (1.11-2.84)	0.02	20 (20.41)	91 (17.84)	1.18 (0.69-2.028)	0.57
			T	196 (79.03)	837 (84.38)			118 (78.67)	418 (86.72)			78 (79.59)	419 (82.16)		
1	<i>CYP2J2</i> rs890283 C>A	Генотип ен	AA	3 (2.86)	2 (0.42)	-	0.36	3 (3.61)	0 (0)	-	0.04	0 (0)	2 (0.84)	-	0.89
			AC	12 (11.43)	50 (10.62)			60 (72.29)	23 (9.91)			6 (13.04)	27 (11.29)		
			CC	90 (85.71)	419 (88.96)			20 (24.09)	209 (90.09)			40 (86.96)	210 (87.87)		
		Алелен	A	18 (8.57)	54 (5.73)	1.54 (0.88-2.68)	0.12	12 (10.17)	23 (4.96)	2.17 (1.05-4.50)	0.03	6 (6.52)	31 (6.49)	1.01 (0.41-2.48)	1
			C	192 (91.43)	888 (94.27)			106 (89.83)	441 (95.04)			86 (93.48)	447 (93.52)		
9	<i>ABO</i> rs579459 C>T	Генотип ен	CC	17 (13.6)	34 (6.90)	-	0.05	10 (13.16)	16 (6.69)	-	0.20	7 (14.29)	18 (7.09)	-	0.18
			CT	52 (41.6)	209 (42.39)			30 (39.47)	101 (42.26)			22 (44.89)	108 (41.69)		
			TT	56 (44.8)	250 (50.71)			36 (47.37)	122 (51.05)			20 (40.82)	128 (49.42)		
		Алелен	C	86 (34.4)	277 (28.09)	1.34 (1.00-1.80)	0.05	50 (32.89)	133 (29.69)	1.16 (0.78-1.72)	0.45	36 (37.5)	144 (28.35)	1.52 (0.96-2.39)	0.09
			T	164 (65.6)	709 (71.91)			102 (67.11)	315 (70.31)			60 (62.5)	364 (71.65)		
10	<i>TCF7L2</i> rs290481 C>T	Генотип ен	TT	5 (4.03)	5 (4.03)	-	0.47	0 (0)	17 (7.11)	-	0.009	5 (10.20)	15 (5.88)	-	0.38
			TC	37 (29.84)	37 (29.84)			20 (26.67)	82 (34.31)			17 (34.69)	77 (30.19)		
			CC	82 (66.13)	303 (61.33)			55 (73.33)	140 (58.57)			27 (55.10)	163 (63.92)		
		Алелен	T	47 (18.95)	223 (22.57)	0.80 (0.56-1.14)	0.22	20 (13.33)	116 (24.27)	0.48 (0.29-0.80)	0.0045	27 (27.55)	107 (20.98)	1.43 (0.88-2.34)	0.18
			C	201 (81.05)	765 (77.43)			130 (86.67)	362 (75.73)			71 (72.45)	403 (79.02)		
19	<i>APOE</i> rs429358 C>T	Генотип ен	CC	3 (2.4)	2 (0.40)	-	0.025	1 (1.32)	1 (0.41)	-	0.1	2 (4.08)	1 (0.39)	-	0.08
			CT	30 (24)	84 (16.94)			16 (21.05)	32 (13.28)			14 (28.57)	52 (20.39)		
			TT	92 (73.6)	410 (82.66)			59 (77.63)	208 (86.31)			33 (67.35)	202 (79.22)		
		Алелен	C	36 (14.4)	88 (8.87)	1.73 (1.14-2.62)	0.01	18 (11.84)	34 (7.05)	1.77 (0.97-3.23)	0.06	18 (18.37)	54 (10.59)	1.90 (1.06- 3.41)	0.03
			T	214 (85.6)	904 (91.13)			134 (73.63)	448 (92.95)			80 (81.63)	456 (89.41)		
20	<i>GNAS, EDN3</i> rs6015450 G>A	Генотип ен	GG	1 (0.8)	9 (1.82)	-	0.13	0 (0)	7 (2.93)	-	0.0009	1 (2.05)	2 (0.78)	-	0.11
			GA	19 (15.2)	98 (19.84)			6 (7.89)	52 (21.76)			13 (26.53)	46 (18.04)		
			AA	105 (84)	387 (78.34)			70 (92.11)	180 (75.31)			35 (71.43)	207 (81.18)		
		Алелен	G	21 (8.4)	116 (11.74)	0.69 (0.42-1.12)	0.13	6 (3.95)	66 (13.81)	0.26 (0.11-0.60)	0.0009	15 (15.06)	50 (9.80)	1.66 (0.89-3.09)	0.11
			A	229 (91.6)	872 (88.26)			146 (96.05)	412 (86.19)			83 (84.69)	460 (90.19)		

**Табл. 4. 20.** Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с прекаран миокарден инфаркт и популационната група от индивиди с български произход. Показани са само статистически значимите асоциации с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Хр.	Ген/ вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P
6	<i>PHACTR1</i> rs9349379 A>G	Генотипен	GG	40 (20.62)	76 (15.51)	-	0.12	28 (21.88)	36 (15.06)	-	0.07	12 (18.18)	40 (15.93)	-	0.91
			GA	93 (47.94)	225 (45.92)			62 (48.44)	105 (43.93)			31 (46.97)	120 (47.81)		
			AA	61 (31.44)	189 (38.57)			38 (29.69)	98 (41.00)			23 (34.85)	91 (36.25)		
		Алелен	G	173 (44.59)	377 (38.57)	1.28 (G) (1.01-1.63)	0.037	118(46.09)	177 (37.03)	1.45 (1.07-1.97)	0.017	55 (41.67)	200 (39.84)	1.08 (0.73-1.59)	0.70
			A	215 (74.65)	603 (61.53)			138(53.90)	301 (62.97)			77 (58.33)	302 (60.16)		
9	<i>9p21</i> rs7865618 G>A	Генотипен	GG	24 (12.06)	84 (17.32)	-	0.06	13 (9.92)	32 (13.33)	-	0.32	11 (16.18)	52 (20.39)	-	0.16
			GA	91 (45.83)	245 (50.52)			66 (50.38)	130 (54.17)			25 (36.78)	115 (60.78)		
			AA	84 (42.21)	166 (34.23)			52 (39.69)	78 (32.5)			32 (47.05)	88 (34.51)		
		Алелен	G	139 (34.92)	413 (41.92)	0.75 (G) (0.59-0.95)	0.019	92 (35.11)	194 (40.42)	0.79 (0.59-1.09)	0.16	47 (34.56)	219 (42.94)	0.70 (0.47-1.04)	0.08
			A	259 (65.08)	577 (58.28)			170 (64.89)	286 (59.58)			89 (47.85)	291 (57.06)		
9	<i>9p21</i> rs7857345 T>C	Генотипен	TT	12 (6.09)	39 (8.35)	-	0.37	7 (5.43)	13 (5.42)	-	1	5 (7.35)	26 (10.24)	-	0.08
			TC	69 (35.03)	192 (41.11)			52 (40.31)	97 (40.42)			17 (25)	95 (37.40)		
			CC	116 (58.88)	236 (50.54)			70 (54.23)	130 (54.17)			46 (67.65)	133 (52.36)		
		Алелен	T	93 (23.60)	270 (27.33)	0.82 (0.62-1.08)	0.16	66 (25.58)	123 (25.63)	1.00 (0.71-1.41)	0.99	27 (19.85)	147 (28.94)	0.61 (0.38-0.97)	0.03
			C	301 (76.39)	718 (72.67)			192 (74.42)	357 (74.38)			109 (80.15)	361 (71.06)		
12	<i>ATP2B1</i> rs2681472 A>G	Генотипен	GG	10 (5.05)	8 (1.62)	-	0.01	9 (6.92)	3 (1.25)	-	0.01	1 (1.47)	5 (1.97)	-	0.75
			GA	65 (32.83)	138 (27.94)			49 (37.69)	69 (28.75)			16 (23.53)	69 (27.17)		
			AA	123 (62.12)	348 (70.45)			72 (55.39)	168 (70)			51 (75)	180 (70.87)		
		Алелен	G	85 (21.57)	154 (15.59)	1.48 (0.10-1.99)	0.009	67 (25.77)	75 (15.63)	1.87 (1.29-2.72)	0.001	18 (13.24)	79 (15.55)	0.83 (0.48-1.44)	0.50
			A	311 (78.54)	834 (84.41)			193 (74.23)	405 (84.38)			118 (86.77)	429 (84.45)		
16	<i>FTO</i> rs9939609 A>T	Генотипен	AA	29 (14.72)	99 (20.12)	-	0.25	21 (16.15)	42 (17.57)	-	0.89	8 (11.94)	57 (22.27)	-	0.094
			AT	99 (50.25)	235 (47.76)			69 (53.08)	121 (50.63)			30 (44.77)	114 (44.53)		
			TT	69 (35.03)	158 (32.11)			40 (30.77)	76 (31.79)			29 (43.28)	82 (32.03)		
		Алелен	A	157 (39.09)	433 (44.00)	0.84 (0.66-1.07)	0.16	111 (42.69)	205 (42.89)	0.99 (0.73-1.35)	1	46 (34.33)	228 (45.06)	0.64 (0.43-0.95)	0.026
			T	237 (60.15)	551 (55.99)			149 (57.31)	273 (57.11)			88 (65.67)	278 (54.94)		
16	<i>CDH13</i> rs11646213 A>T	Генотипен	TT	25 (12.56)	83 (16.80)	-	0.29	16 (12.21)	40 (28.57)	-	0.12	9 (13.24)	43 (16.93)	-	0.002
			TA	98 (49.25)	245 (49.6)			75 (57.25)	111 (32.46)			23 (33.82)	134 (52.76)		
			AA	76 (38.19)	166 (33.60)			40 (30.53)	89 (26.02)			36 (52.94)	77 (30.31)		
		Алелен	A	148 (37.19)	411 (41.6)	0.83 (0.65-1.06)	0.13	107 (40.84)	191 (39.79)	1.04 (0.77-1.42)	0.78	41 (30.15)	220 (43.31)	0.56 (0.38-0.85)	0.005
			T	250 (62.81)	577 (58.4)			155 (59.16)	289 (60.21)			95 (69.85)	288 (56.69)		
19	<i>APOE</i> rs429358 C>T	Генотипен	CC	2 (1.01)	2 (0.40)	-	0.36	1 (0.77)	1 (0.41)	-	0.20	1 (1.47)	1 (0.39)	-	0.73
			CT	41 (20.07)	84 (16.13)			31 (2.38)	32 (13.28)			10 (14.71)	52 (20.39)		
			TT	155 (78.28)	410 (82.66)			98 (75.38)	208 (86.31)			57 (83.82)	202 (79.22)		
		Алелен	C	45 (11.36)	88 (8.87)	1.32 (0.90-1.93)	0.15	33 (12.69)	34 (7.05)	1.92 (1.16-3.17)	0.01	12 (8.82)	54 (10.59)	0.82 (0.42-1.58)	0.55
			T	351 (88.64)	904 (92.06)			227 (87.31)	448 (92.95)			124 (91.18)	456 (89.41)		

**Табл. 4. 21.** Разлики в алелните и генотипни честоти между групите на пациентите с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и ИБС (със прекаран миокарден инфаркт). Показани са само резултати с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Хр.	Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИБС N (%)	ИМ N (%)	OR	P	ИБС N (%)	ИМ	OR	P	ИБС N (%)	ИМ N (%)	OR	P
1	<i>PCSK9</i> rs11206510 C>T	Генотипен	CC	3 (1.52)	5 (4.03)	-	0.01	1 (0.76)	3 (4.00)	-	0.08	2 (2.89)	2 (4.08)	-	0.21
			CT	45 (22.84)	42 (33.87)			33 (25.39)	26 (34.67)			12 (17.39)	16 (32.65)		
			TT	149 (75.64)	77 (62.10)			96 (73.85)	46 (61.33)			53 (76.81)	31 (63.27)		
		Алелен	C	51 (12.94)	52 (20.97)	1.78 (1.17-2.73)	0.007	35 (9.72)	32 (21.33)	1.74 (1.02-2.96)	0.038	16 (11.94)	20 (20.41)	1.89 (0.92-33.87)	0.08
			T	343 (87.01)	196 (79.03)			225 (62.5)	118 (47.2)			118 (88.06)	78 (79.59)		
2	<i>IRS1</i> rs1801278 C>T	Генотипен	TT	0 (0.00)	0 (0.00)	-	0.26	0 (0.00)	0 (0.00)	-	0.09	0 (0.00)	0 (0.00)	-	1
			TC	18 (9.18)	19 (15.45)			10 (7.69)	13 (17.33)			8 (12.12)	6 (12.5)		
			CC	178 (90.82)	104 (84.55)			120 (92.31)	62 (82.67)			58 (87.88)	42 (87.5)		
		Алелен	T	18 (4.59)	19 (7.72)	1.74 (0.89-3.38)	0.10	10 (3.85)	13 (8.67)	2.37 (1.01-5.55)	0.04	8 (6.06)	6 (6.25)	1.03 (0.35-3.08)	0.95
			C	374 (95.41)	227 (92.28)			250 (96.15)	137 (91.33)			124 (93.94)	90 (93.75)		
6	<i>PHACTRI</i> rs9349379 A>G	Генотипен	GG	40 (20.62)	20 (16.26)	-	0.11	28 (21.88)	14 (18.67)	-	0.42	12 (18.18)	6 (12.5)	-	0.26
			GA	93 (47.94)	50 (40.65)			62 (48.44)	32 (42.67)			31 (46.97)	18 (37.5)		
			AA	61 (31.44)	53 (43.09)			38 (29.69)	29 (38.67)			23 (34.85)	24 (50)		
		Алелен	G	173 (44.59)	90 (36.58)	0.71 (0.52-0.99)	0.046	118 (46.09)	60 (40)	0.78 (0.52-1.17)	0.23	55 (41.67)	30 (50)	1.40 (0.76-2.58)	0.11
			A	215 (55.41)	156 (63.41)			138 (53.91)	90 (60)			77 (58.33)	30 (50)		
16	<i>CDH13</i> rs11646213 A>T	Генотипен	TT	25 (12.56)	28 (22.95)	-	0.03	16 (12.21)	17 (22.97)	-	0.10	9 (13.24)	11 (22.92)	-	0.01
			TA	98 (49.25)	59 (48.36)			75 (57.25)	34 (45.95)			23 (33.83)	25 (52.08)		
			AA	76 (38.19)	35 (28.69)			40 (30.53)	23 (31.08)			36 (52.94)	12 (25)		
		Алелен	T	148 (37.19)	115 (47.13)	1.51 (1.09-2.08)	0.01	107 (40.84)	68 (45.95)	1.23 (0.82-1.84)	0.32	41 (30.15)	47 (48.96)	2.22 (1.29-3.82)	0.004
			A	250 (62.81)	129 (52.87)			155 (59.16)	80 (54.05)			95 (69.85)	49 (51.04)		
19	<i>APOE</i> rs429358 C>T	Генотипен	CC	2 (1.01)	3 (2.4)	-	0.36	1 (0.77)	1 (1.32)	-	1	1 (1.47)	2 (4.08)	-	0.10
			CT	41 (20.71)	30 (24)			31 (23.85)	16 (21.05)			10 (14.71)	14 (28.57)		
			TT	155 (78.28)	92 (73.6)			98 (75.39)	59 (77.63)			57 (83.82)	33 (67.35)		
		Алелен	C	45 (11.36)	36 (14.4)	1.31 (0.82-2.10)	0.26	33 (12.69)	18 (11.84)	0.92 (0.50-1.71)	0.80	12 (8.82)	18 (18.37)	2.33 (0.06-5.09)	0.03
			T	351 (88.64)	214 (85.6)			227 (87.31)	134 (88.16)			124 (91.18)	80 (81.63)		
20	<i>GNAS, EDN3</i> rs6015450 G>A	Генотипен	GG	4 (2.01)	1 (0.8)	-	0.83	3 (2.29)	0 (0.00)	-	0.09	1 (1.47)	1 (2.04)	-	0.34
			GA	30 (15.08)	19 (15.2)			19 (14.50)	6 (7.89)			11 (16.18)	13 (26.53)		
			AA	165 (82.91)	105 (84.00)			109 (83.21)	70 (92.11)			56 (86.76)	35 (71.43)		
		Алелен	G	38 (9.55)	21 (8.40)	1.15 (0.69-2.01)	0.62	25 (9.54)	6 (3.95)	2.57 (1.03-6.4)	0.037	13 (9.56)	15 (15.31)	1.71 (0.77-3.78)	0.18
			A	360 (90.45)	229 (91.60)			237 (90.46)	146 (96.05)			123 (90.44)	83 (84.69)		

След прилагане на множествена логистична регресия и коригиране по основните рискови за сърдечните заболявания фактори – възраст, пол и индекс на телесна маса (ИТМ), бяха получени следните резултати за позитивна асоциация с ИБС в групата пациенти с и без МИ:

**Табл. 4. 22.** Варианти, показали статистически значима връзка с риска за развитие на ИБС и/или МИ след прилагане на множествено тестване и корекция по възраст, пол и ИТМ.

Ген	Вариант	X <sup>2</sup>	P стойност
<i>APOE</i>	rs429358	9.20	0.01
<i>CYP2J2</i>	rs890283	9.98	0.0067
<i>9p21</i>	rs7865618	15.48	0.0004
<i>9p21</i>	rs7857345	12.02	0.002
<i>9p21</i>	rs2383206	8.27	0.004
<i>TCF7L2</i>	rs290481	11.37	0.003
<i>CDH13</i>	rs11646213	15.56	0.0004

За останалите групи не бяха установени положителни асоциации след множественото тестване, което вероятно се дължи на малкия брой изследвани пациенти в контекста на генетиката на сърдечните заболявания, за които е установено, че полиморфните варианти оказват изключително слаб ефект по отношение на риска за развитие на този тип заболявания.

#### 4.6.3. Анализ на епистатичните взаимодействия между изследваните полиморфни варианти по отношение на риска за развитие на исхемична болест, миокарден инфаркт и артериална хипертония

ИБС и АХ представлява сложни, многофакторни заболявания, при които множество генетични детерминанти и фактори на околната среда си взаимодействат и имат съществено отношение към етиологията на повишените стойности на артериалното налягане и исхемичната болест. Посредством метода на множествената дименсионална редукция (МДР) става възможно откриването на взаимодействащи си локуси, които увеличават риска от тези заболявания. Това може да включва епистатичните взаимодействия между гените, при които комбинираният им ефект е по-голям (или по-малък) от очаквания въз основа на техните индивидуални ефекти.

Резултатите за всички значими епистатични взаимодействия, които бяха наблюдавани при анализ на пациентите с ИБС, МИ и АХ, и тяхната посока на влияние са представени в **Табл. 4. 23.**

**Табл. 4. 23.** Епистатични взаимодействия между изследваните полиморфни варианти и влиянието им по отношение на риска от развитие на АХ, ИБС и ИМ.

Хр.	Ген/регион	Вариант 1	Хр.	Ген/регион	Вариант 2	OR взаимодействие	T	P стойност	P по Бонферони
<b>ИБС</b>									
5	<i>NPR3, C5orf23</i>	rs1173771	6	<i>PHACTR1</i>	rs9349379	2.339	15.16	0.0001	0.0029
<b>ИБС (жени)</b>									
5	<i>NPR3, C5orf23</i>	rs1173771	6	<i>PHACTR1</i>	rs9349379	3.11	10.32	0.0013	0.037
<b>ИМ / ИБС (мъже)</b>									
9	<i>9p21</i>	rs10757274	10	<i>MBL2</i>	rs1800450	2.258	7.464	0.006	0.017
<b>ИМ / ИБС (жени)</b>									
6	<i>MTHFD1L</i>	rs6922269	16	<i>FTO</i>	rs9939609	0.4752	7.642	0.006	0.017
<b>ИМ</b>									
1	<i>IL6R</i>	rs2229238	3	<i>ADIPOQ</i>	rs1501299	1.974	10.42	0.001	0.029

#### 4.6.4. Анализ на влиянието на изследваните полиморфни варианти върху стойностите на систолично и диастолично артериално налягане и нива на липиди

В следващата таблица Табл. 4. 24. са обобщени значимите резултати от провежданите анализи за определяне на влиянието на изследваните полиморфни варианти по отношение на стойностите на АН и нивата на липиди при българи.

Табл. 4. 24. Статистически значими асоциации на изследваните полиморфни варианти (при ниво на значимост  $p < 0.05$ ) със стойностите на основните клинични показатели, свързани с етиологията на ИБС, ИМ и АХ.

Хромозома	Ген	Вариант	Позиция	ВЕТА регресионен коэффициент	SE	R <sup>2</sup>	P	Коригирано P по Бонферони
<b>Общ холестерол</b>								
<b>Общо</b>								
16	<i>CDH13</i>	rs11646213	82642651	-0.16	0.07	1.03%	0.03	0.87
1	<i>PCSK9</i>	rs11206510	55496039	-0.23	0.10	1.01%	0.03	0.87
<b>Мъже</b>								
7	<i>eNOS3</i>	rs3918226	150690176	-0.41	0.20	2.12%	0.04	1
<b>Жени</b>								
16	<i>CDH13</i>	rs11646213	82642651	-0.25	0.09	2.80%	0.0068	0.19
9	<i>ABO</i>	rs579459	136154168	0.23	0.11	1.72%	0.03	0.87
9	<i>9p21</i>	rs10757274	22096056	0.26	0.12	2.83%	0.04	1
<b>Триглицериди</b>								
<b>Общо</b>								
9	<i>9p21</i>	rs2383206	22115027	-0.21	0.07	3.15%	0.003	0.087
16	<i>CDH13</i>	rs11646213	82642651	-0.20	0.09	1.01%	0.03	0.87
<b>Мъже</b>								
9	<i>9p21</i>	rs2383206	22115027	-0.23	0.11	3.22%	0.04	1
<b>Жени</b>								
1	<i>CYP2J2</i>	rs890283	60392494	0.41	0.16	3.00%	0.01	0.29
9	<i>9p21</i>	rs2383206	22115027	-0.18	0.08	3.47%	0.02	0.58
<b>HDL</b>								
<b>Мъже</b>								
15	<i>CYP2C8</i>	rs1050968	28018434	0.63	0.28	3.01%	0.02	0.58
3	<i>ADIPOQ</i>	rs266729	186841685	0.08	0.04	3.01%	0.04	1
<b>LDL</b>								
<b>Общо</b>								
9	<i>9p21</i>	rs2383206	22115027	-0.34	0.11	3.33%	0.002	0.058
19	<i>APOE</i>	rs7412	44908822	-0.53	0.23	1.16%	0.02	0.58
<b>Мъже</b>								
15	<i>CYP2C8</i>	rs1050968	28018434	0.68	0.23	4.89%	0.0032	0.09
9	<i>9p21</i>	rs2383206	22115027	-0.43	0.16	5.00%	0.01	0.29
9	<i>9p21</i>	rs10757274	22096056	-0.40	0.16	4.06%	0.02	0.58
<b>Диастолично артериално налягане (ДАН)</b>								
<b>Жени</b>								
5	<i>NPR3, C5orf23</i>	rs1173771	32815028	-4.50	1.98	3.02%	0.0019	0.055
<b>Систолично артериално налягане (САН)</b>								
<b>Общо</b>								
5	<i>NPR3, C5orf23</i>	rs1173771	32815028	-2.61	1.02	2.54%	0.01	0.29
16	<i>CDH13</i>	rs11646213	82642651	2.49	1.05	2.21%	0.02	0.58
10	<i>TCF7L2</i>	rs7903146	112998590	-6.19	2.91	12.41%	0.04	1
<b>Жени</b>								
5	<i>NPR3, C5orf23</i>	rs1173771	32815028	-4.00	1.27	5.67%	0.0019	0.055
16	<i>CDH13</i>	rs11646213	82642651	2.56	1.27	2.42%	0.05	1

Стойностите на регресионния коефициент показват с колко единици се повишават или понижават стойностите на съответния показател (LDL-нива, HDL-нива, нива на триглицериди, стойности на САН и ДАН) при носителството на даден полиморфен вариант. Стойността на  $R^2$  показва за какъв процент от вариабилността на съответния клиничен показател е отговорен всеки един от тестваните генетични маркери.

#### 4.6.5. Анализ на епистатичните взаимодействия между изследваните полиморфни варианти по отношение на стойностите на систолично и диастолично артериално налягане и нивата на липиди в кръвта

Резултатите от всички значими епистатични взаимодействия след корекция за множествени тествания по Бонферони по отношение на нивата на триглицериди в кръвта и стойностите на САН и тяхната посока на влияние са представени в Табл. 4. 25. – 4. 26.

Табл 4. 25. Резултати от анализа за статистическа епистаза по отношение на нивата на триглицериди в кръвта при жени.

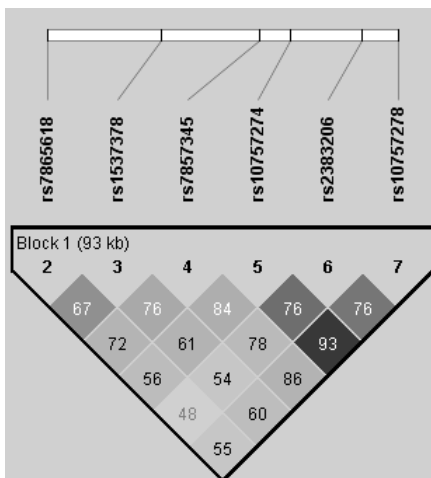
Хромозома	Ген	Вариант	Хромозома	Ген	Вариант	БЕТА взаимодействие	F	P	P Bonferroni
<b>Триглицериди (жени)</b>									
1	<i>CYP2J2</i>	rs890283	6	<i>MTHFD1L</i>	rs6922269	-0.742	9.806	0.0017	0.049
5	<i>NPR3</i> , <i>C5orf23</i>	rs1173771	20	<i>GNAS</i> , <i>EDN3</i>	rs6015450	1.407	17.58	0.00001	0.0003

Табл 4. 26. Резултати от анализа за статистическа епистаза по отношение на стойностите на САН при жени.

Хромозома	Ген	Вариант	Хромозома	Ген	Вариант	БЕТА взаимодействие	F	P стойност	P Bonferroni
<b>Систоличното артериално налягане (жени)</b>									
1	<i>CYP2J2</i>	rs890283	7	<i>eNOS</i>	rs3918226	22.75	12	0.0005	0.01

#### 4.6.6. Хаплотипен анализ на полиморфни варианти в локус 9p21 и асоциацията им с исхемична болест на сърцето и миокарден инфаркт

Използвахме данните от генотипирането на 6-те представителни полиморфизма в локус 9p21 и програмата HaploView (v.4.0), за да установим степента на неравновесна скаченост (LD) между изследваните маркери за нашата популация и да проследим структурата на LD в този район. Както се вижда на Фиг. 4. 10., анализираният 6 маркера принадлежат на един LD блок с големина 93 kb. Степента на неравновесна скаченост е представена чрез стойностите на  $D'$  (коефициент на неравновесна скаченост), разположени в средата на правоъгълниците с различен интензитет на цвета. По-тъмния цвят е индикатор на по-висока степен на неравновесна скаченост, която намалява с избледняването на тоновете.



**Фиг. 4. 10.** Диаграма на LD структурата в района на 9p21. За построяване на LD блоковата структура (очертаните с черен контур триъгълна фигура) е използван подходът „solid spine of LD approach“ в програмата HaploView 4.0.

Анализът за асоциация на най - често срещаните хаплотипи в българската популация с риска за развитие на ИБС и миокарден инфаркт е обобщен в **Табл. 4. 27.**

**Табл. 4. 27.** Анализ за асоциация на най - често срещаните хаплотипи в българската популация с риска за развитие на ИБС и миокарден инфаркт.

Хаплотип						<u>ИБС</u> (със и без МИ)		<u>ИБС</u>		<u>МИ</u>		<u>МИ vs ИБС</u>	
rs7865618	rs1537378	rs7857345	rs10757274	rs2383206	rs10757278	Честота пациенти/контроли	P	Честота пациенти/контроли	P	Честота пациенти/контроли	P	Честота пациенти/контроли	P
A	C	C	G	G	G	0.37/ 0.33	0.09	0.36/ 0.33	0.31	0.38/ 0.37	0.83	0.38/ 0.33	0.08
G	T	T	A	A	A	0.18/ 0.20	0.27	0.19/ 0.20	0.81	0.17/ 0.19	0.50	0.17/ 0.20	0.24
A	C	C	A	A	A	0.07/ 0.07	0.65	0.08/ 0.07	0.54	0.07/ 0.08	0.75	0.07/ 0.07	0.80
G	T	C	A	A	A	0.06/ 0.07	0.43	0.05/ 0.07	0.40	0.07/ 0.06	0.63	0.06/ 0.07	0.64
A	C	C	G	A	G	0.04/ 0.05	0.20	0.05/ 0.04	0.25	0.05/ 0.05	0.73	0.05/ 0.05	0.53
G	C	C	G	G	G	0.05/ 0.04	0.21	0.02/ 0.03	0.25	0.05/ 0.03	0.36	0.05/ 0.04	0.42
A	T	C	G	G	G	0.03/ 0.03	0.87	0.02/ 0.03	0.32	0.04/ 0.01	0.04	0.04/ 0.03	0.29
A	C	C	G	G	A	0.03/ 0.02	0.40	0.02/ 0.02	0.66	0.03/ 0.03	0.99	0.02/ 0.02	0.61
G	T	T	A	G	A	0.02/ 0.02	0.52	0.02/ 0.02	0.98	0.03/ 0.02	0.51	0.01/ 0.03	0.18
A	C	C	A	G	A	0.01/ 0.03	0.11	0.01/ 0.02	0.61	0.02/ 0.02	0.89	0.03/ 0.02	0.49
A	T	T	A	A	A	0.02/ 0.02	0.97	0.01/ 0.01	0.92	0.02/ 0.01	0.84	0.02/ 0.02	0.95
A	T	C	A	A	A	0.02/ 0.01	0.10	0.01/ 0.01	0.82	0.02/ 0.01	0.75	0.02/ 0.01	0.06
G	T	C	G	G	G	0.01/ 0.01	0.94	0.01/ 0.01	0.76	0.01/ 0.01	0.77	0.02/ 0.01	0.79
G	C	T	A	A	A	0.01/ 0.01	0.83	0.01/ 0.01	0.51	0.01/ 0.02	0.56	0.01/ 0.01	0.53
A	C	T	A	A	A	0.01/ 0.02	0.11	0.02/ 0.01	0.17	0.01/ 0.02	0.13	0.004/ 0.02	0.08

Само хаплотип **ATCGGG** показва слаба връзка с риска от развитие на миокарден инфаркт ( $p=0.04$ ), но тази асоциация не се запазва след корекция по Бонферони ( $p_{adj}=0.60$ ).

## 5. ОБСЪЖДАНЕ

### 5.1. Асоциативни изследвания при артериална хипертония, исхемична болест на сърцето и миокарден инфаркт

Сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ) съставляват близо 40% от причините за инвалидизация и смъртност в развиващите се страни, в това число и в България. От тази разнородна група от съдови усложнения тромбоемболизмът (ТЕ), исхемичната болест на сърцето (ИБС) и първичната артериална хипертония (ПАХ) са с най-голям дял и значение [16]. Добре известно е, че тези заболявания представляват многофакторни състояния, за чието проявление е необходимо едновременното влияние на факторите на околната среда, начина на живот и не на последно място – генетично предразположение. Тромбоемболизмът и хипертонията представлява проатерогенни рискови фактори за развитие на исхемична болест заедно с тютюнопушенето, метаболитните нарушения, дислипидемията и възпалението, които водят до микросъдова дисфункция.

През последните няколко години чрез асоциативни изследвания на целия човешки геном са идентифицирани 62 генетични варианта, свързани с промяна в стойностите на систоличното и диастоличното артериално налягане (САН и ДАН) и ПАХ като цяло, с ниво на значимост ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) [17] и 50 варианта, показващи връзка с повишен или понижен риск за ИБС и тромбоза [18].

Един от общите патофизиологични механизми в основата на исхемичната болест и артериалната хипертония е ендотелната дисфункция, която се свързва с повишен риск за сърдечно-съдови усложнения. Ендотелната дисфункция обикновено се проявява с увреждане в процесите на ендотел-зависимата вазодилатация. Съдоразширяващите, фибринолитичните и противовъзпалителни свойства на епоксиейкозатриеновите киселини (ЕЕТКи) са важни хиперполяризиращи медиатори в този процес [19, 20]. Епоксигеназите от групата на цитохром P450 са важни ензими, метаболизиращи арахидонова киселина до ЕЕТКи, за които е установено, че имат съществена роля в етиологията и патогенезата на сърдечно-съдови заболявания.

Установено е, че ЕЕТКи играят централна роля в регулацията на бъбречния електролитен транспорт и съдовия тонус [13]. Генетични полиморфизми, причиняващи по-ниска активност на тези ензими са потенциално свързани с повишен риск от няколко ССЗ като хипертония и коронарна болест на сърцето [17].

Два от полиморфните варианти, които бяха изследвани в настоящия дисертационен труд са разположени в гените *CYP2J2* и *CYP2C8* (*CYP2J2\*7* и *CYP2C8\*3*), чиито белтъчни продукти участват в процесите на възпаление в организма. При субгруповия анализ на пациентите беше установена положителна асоциация със заболяването на алел *CYP2C8\*3* [OR 1.96 (95% CI 1.17-3.29),  $p=0.01$ ] при представителите от мъжки пол. Подобна полово-свързана асоциация беше установена и за *CYP2J2\*7* [OR 2.17 (95% CI 1.05-4.50,  $p=0.03$ ) по отношение на исхемичната болест отново в групата на мъжете. Полиморфният алел -50 T беше намерен при 10.17% от мъжете с ИБС и само при 4.98% от индивидите в контролната група.

Множество експериментални и епидемиологични изследвания показват, че естрогените повлияват началото и развитието на заболяванията, свързани с възпаление. Ниската честота на исхемичната болест при жени преди менопауза и значителното ѝ повишаване, което се наблюдава след менопауза, дава основание да се предположи, че женските полови хормони имат защитно действие и предотвратяват развитието на ССЗ [21, 22]. Ендогенните и екзогенни естрогени претърпяват оксидативен метаболизъм чрез чернодробните микрозомални цитохром P450 ензими. Няколко изоформи на тези цитохроми включително *CYP2C8* са показани да катализират хидроксилирането на естрадиол до 2-хидроксиестрадиол и/или 4-хидроксиестрадиол [23]. Една от съществуващите хипотези е, че естрогенът проявява защитни ефекти по отношение на възпалението на сърдечно-съдовата система, посредством стимулиране на *CYP2C8*-медирано метаболизиране на арахидоновата киселина до ЕЕТК. Вероятно естрогените действат като агонист на *CYP2C8*-медираните противовъзпалителни пътища.

Изследването на Renaud et al. установява, че ензимите от семейството CYP2C имат по-висока експресия при жени, отколкото при мъже [24], вероятно поради влиянието на естрогените. В друго проучване средните нива на експресия на CYP2C8 са определени като малко по-високи при жените ( $34.3 \pm 17.7$ ), в сравнение с мъжете ( $27.7 \pm 17.4$ ,  $p = 0.18$ ) [25]. Съществуват данни, че женските полови хормони увеличават експресията на ензими от семейството CYP2C и проявяват защитни сърдечно-съдови ефекти. Вероятно увеличената генна експресия води до по-високо ниво на ензима CYP2C8, който метаболизира арахидонова киселина до ЕЕТК, притежаващи съдоразширяващи и кардиопротективни свойства. Поради тази причина би могло да се предположи, че, ниското ниво на естрогени и носителството на CYP2C8\*3 алел осигуряват по-ниска експресия на ензима и по-високия риск от ПАХ при мъже.

Подобни резултати за полово-свързана асоциация се наблюдавани при проучването на Wu и др., които установяват връзка между носителството на полиморфен вариант CYP2J2\*7 и високите стойности на АН при жени [26]. Данните от това проучване показват, че носителите на хомозиготен вариант ТТ за rs1155002 в интронния регион на гена CYP2J2 повишават риска от хипертония при китайските жени. Авторите обяснят получените резултати с потенциално взаимодействие между експресията на CYP2J2 и нивата на естрогените. [26]. При някои други изследвания също са идентифицирани гени с половосвързан ефект по отношение на чувствителността към ПАХ [27, 28]. Въпреки това към момента няма проучвания с резултати, подобни на получените от нас относно CYP2C8\*3 и повишения риск за хипертония при мъже.

Генът APOE е високо полиморфен. Ние изследвахме два варианта в него (rs7412 и rs429358), които формират хаплотип с три общи алела: \*ε2, \*ε3, и \*ε4. Тези алели могат да бъдат обединени в шест различни генотипа [29]. В нашето проучване ние анализирахме поотделно влиянието на двата варианта върху изследваните заболявания, като се ръководихме от факта, че носителството на алтернативен алел за rs7412 определя наличието на алел \*ε2 в общия хаплотип, докато rs429358 определя алел \*ε4. Както очаквахме, носителството на алела С за rs429358 се свързва с повишен риск за развитие на МИ (OR 1.92 (1.16-3.17)  $p=0.01$ ) при мъже и ИБС (OR 1.73 (1.14-2.62)  $p=0.01$ ) в общата група спрямо здравите контроли, както и за развитие на миокарден инфаркт при пациенти с исхемия (OR 2.33  $p=0.03$ ). При пациентите с АХ беше установено значимо влияние и на двата варианта, като първият (алел Т) се свързва с понижен риск от хипертония при жени (OR 0.61 CI95: 0.39-0.97,  $p=0.03$ ), докато вторият (алел С) е предразполагащ за развитие на заболяването при мъже (OR 2.10 (1.19-3.71)  $p=0.01$ ).

Редица епидемиологични проучвания са изследвали прякото въздействие на генотипа на APOE върху риска за исхемична болест и миокарден инфаркт, както и неговото влияние върху нивата на липиди и аполипопротеини в кръвта. Почти всички изследвания установяват, че полиморфизмите в гена за ApoE представляват независим рисков фактор за сърдечно – съдовите заболявания, както и че същите тези варианти имат отношение и към нивата на холестерола, триглицеридите и липопротеините в кръвта [30-41].

Проучванията за APOE във връзка с риска за развитие на АХ са малко. В едно такова изследване е установено, че няма връзка между носения хаплотип и повишените стойности на АН (съответно OR = 0,94, 95% CI = 0.83-1.07 и 0.98, 0.89-1.07). От друга страна носителите на \*ε2 алел имат по-ниски нива на LDL холестерол ( $p < 0.001$ ), докато тези на \*ε4 показват по-високи стойности на този показател ( $p=0.036$ ) [42].

Генът CDH13 кодира калциево-зависим, адхезионен гликопротеин – Т-кадхерин, представляващ регулатор на процеса на ремоделиране на съдовата стена и ангиогенезата. Неговата функция е съвместима с биологията и патофизиологията на АХ. Предполага се, че въпросният протеин оказва регулаторно влияние върху стойностите на АН [43]. Генът за Т-кадхерин 13 е един от кандидат-гените за АХ при провеждането на геномни асоциативни проучвания. В нашето изследване алелът А на полиморфен вариант rs11646213 в този ген показва асоциация с понижен риск за развитие на ИМ (OR 0.56 CI95: 0.38-0.85,  $p=0.005$ ).

Ролята на Т- кадхерина в сърдечно-съдовата патология е все още в голяма степен неизвестна. Този кадхерин е силно експресиран в сърцето, аортната стена, невроните на мозъчната кора и

гръбначния мозък, а също и в малките кръвоносни съдове в далака и други органи. Експресията на CDH13 е повишена при атеросклеротични лезии и при рестеноза след ангиопластика, свързани с патологични процеси в ангиогенезата. Освен това, експресията на T- кадхерин е повишена при перипити и гладко-мускулните клетки на атеросклеротичните лезии. Също така, T- кадхерин се експресира в артериалната стена след балонна ангиопластика в късните етапи на формирането на неointима, което съвпада с пика на пролиферацията и диференциацията на съдовите клетки [44, 45].

В резултат на проведените анализи беше установено, че интронният вариант rs2681472 (алел G) в гена *ATP2B1* показва асоциация с повишен риск за развитие на ИБС (OR 1.40, CI95: 1.09-1.82, p=0.01) и МИ (OR 1.48, CI95: 0.10-1.99, p=0.009). При субгруповия анализ след разделяне на пациентите и контролите по пол, тази зависимост се запазва само при мъжете с ИБС (OR 1.60, CI95: 1.14-2.24, p=0.01), но не и при жени (OR 1.09, CI95: 0.71-1.65, p=0.75). Подобни резултати се наблюдават и в групата на пациентите с прекаран МИ, като носителството на полиморфен алел G се свързва с повишен риск за развитие на заболяването при представители на мъжкия пол (OR 1.87, CI95: 1.29-2.72, p=0.001).

Генът *ATP2B1* кодира изоформа 1 на калциевата АТФаза в плазмената мембрана, която изнася двувалентни калциеви йони от еукариотните клетки срещу много големи градиенти на концентрацията и играе важна роля във вътреклетъчната калциева хомеостаза [50, 51]. Съвсем скоро беше докладвано, че гладката мускулатура на съдовите клетки в *ATP2B1* нокаут мишки показва значително по-високо систолично АН (САН) [46]. Освен това, фенилефрин - индуцираната вазоконстрикция е значително повишена в съдовите пръстени на феморалната артерия на *ATP2B1* нокаут мишки, което показва, че *ATP2B1* играе важна роля в регулирането на АН чрез промяна в пропускливостта за калций и вазоконстрикцията на съдовите гладкомускулни клетки. Това означава, че по-високата диализа на калций може да доведе до остро и преходно повишение на артериалната ригидност при пациенти на хемодиализа [47]. Съществуват и няколко доказателства в подкрепа на връзката между *ATP2B1* и съдовата функция. Предложена е хипотезата, че варианти в гена *ATP2B1* участват в контрола на артериалната ригидност чрез регулиране на концентрацията на калций при хипертоници [48].

Ролята на *RNACTR1* в патофизиологията на сърдечно-съдовите заболявания предстои да бъде изяснена. *RNACTR1* представлява регулатор на протеин фосфатаза 1 (PP1), ензим регулиращ синтеза на азотния оксид в ендотелиума [30], който от своя страна е важен модулатор при сърдечно-съдовите заболявания [49].

В проведеното от нас проучване полиморфен вариант rs9349379 (алел G) в гена *RNACTR1* показва асоциация с повишен риск за развитие на ИБС (OR 1.33, CI95:1.01-1.74, p=0.046) и ИМ (OR 1.28, CI95:1.01-1.63, p=0.037), като тази тенденция се засилва в групата на мъжете (OR 1.45, CI95:1.07-1.97, p=0.017). По отношение на риска за възникването на миокарден инфаркт на фона на сърдечна исхемия, полиморфният алел G на изследвания вариант е с по-висока честота в групата на болните само с исхемична болест в сравнение с групата на пациентите с вече прекаран МИ (44.59% vs 36.58%), което определя неговата протективна роля по отношение на инфарктни усложнения при вече установена исхемична болест (OR 0.71, CI95:0.52-0.99, p=0.046).

Други проучвания установяват, че носителството на полиморфния вариант G за rs9349379 се асоциира със степента на аортна стеноза, независимо от наличието на МИ. Тъй като стенозата на коронарните артерии е основен рисков фактор за миокарден инфаркт, то би могло да се допусне, че носителството на полиморфни варианти в *RNACTR1* биха могли да допринесат за възникване на инфаркт посредством участие в процесите на сърдечно-съдова стеноза, независимо от роля в Ca<sup>2+</sup> хомеостазата на сърцето [50].

В нашето асоциативно изследване беше потвърдена връзката между носителството на полиморфен алел за rs7865618 (алел A) в локус 9p21 и повишения риск за развитие на исхемична болест (OR 1.29, CI 95:1.05-1.59, p=0.01) и миокарден инфаркт (OR 1.33 p=0.019), като този риск е пропорционален на броя полиморфни алели. При жени беше наблюдавана асоциация между алел C

на полиморфен вариант rs7857345 и повишен риск за развитие на миокарден инфаркт (OR 1.64, CI95:1.03-2.61, p=0.03).

Потенциалната връзка между 9p21 и атеросклерозата на коронарните съдове би могла да се обясни с антипролиферативното действие на циклин-зависимите киназни инхибитори, за които е известно, че са потиснати при индивиди, носители на 9p21 рисков алел [51]. Тъй като клетъчната пролиферация и апоптоза играят важна роля в атерогенезата, може да се предположи, че гените в INK4/ARF могат да представляват кандидат-гени за атеросклероза [51].

Няколко проучвания показват, че локус 9p21 взема участие във формирането на атеросклеротична плака и еветуално в прогресията на атеросклерозата, без обаче да оказва ефект върху руптурата на плаката или механизмите на тромбозата – основните събития, водещи до инфаркт на миокарда [52-58]. Независими експериментални изследвания показват, че вариации в локус 9p21 представляват рисков фактор не само за коронарно заболяване, но също така и за коремна аортна аневризми и интракраниални аневризми [59-63]. Към настоящия момент, тези фенотипни ефекти нямат своето обяснение, понеже нито коремните аневризми, нито интракраниалните такива са свързани с патогенезата на атеросклерозата като цяло. Така например, в основата на етиологията на аневризмите стои изтъняване и загуба на тъкан от стената на кръвоносния съд, което води до неговото разкъсване.

Някои проучвания предполагат, че локус 9p21 участва при иницирането на процеса на атеросклероза, а не е свързан с неговото развитие или тежестта на заболяването [53], докато други твърдят точно обратното [64, 65]. Всички проучвания обаче показват, че полиморфни варианти в 9p21 определят по-висок риск за развитие на исхемична болест на сърцето или ИМ в по-ранна възраст (преди 55 години при мъжете и преди 60 години в жените) [53].

Друго възможно обяснение на връзката между изследвания локус 9p21 с повишения риск от атеросклероза е наличието на множество енхансери в региона CDKN2B-AS, които са отговорни за повишената експресия на гени индуциращи клетъчната пролиферация. В своето изследване Narismendy и съавт. идентифицират 33 на брой енхансера в рамките на въпросната секвенция. [66]. Всичко казано до тук обяснява получената асоциация между носителството на полиморфни алели за варианти в локус 9p21 и риска за развитие на ИБС и миокарден инфаркт в настоящото проучване. Необходимо е обаче разширяване на изследваните групи с цел потвърждаване на

Пропотеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9) е ключов протеин в метаболизма на LDL-C и играе основна роля в разграждането на рецептора за липопротеините с ниска плътност (LDLR). Установено е, че полиморфните варианти в гена *PCSK9* имат комплексно отношение към патофизиологията и регулацията на ИБС при рискови пациенти [67].

В резултат на проведения от нас анализ беше установено, че носителството на редкия алел C за полиморфен вариант rs11206510 в гена *PCSK9* се свързва с повишен риск за развитие на ИБС при българи (OR 1.43, CI95: 1.01-2.03, p=0.04), а също така и за миокарден инфаркт на фона на сърдечна исхемия (OR 1.78, CI95: 1.17-2.73, p=0.007), като тези ефекти се засилват в групата на представителите от мъжки пол (OR 1.74, CI95: 1.02-2.96, p=0.038).

Свърхекспресията на PCSK9 значително намалява броя на LDLR на повърхността на клетките на черния дроб. Изследователите предполагат, че протеинът вероятно предизвика разграждането на LDLR по-бързо от обичайното. С по-малко рецептори за премахване на липопротеини с ниска плътност от кръвта хора с мутации от типа “gain – of - function” в гена *PCSK9* имат много високи нива на холестерол. Излишният холестерол циркулира в кръвния поток, като се депозира в тъкани като кожата, сухожилията и коронарните артериите, които доставят кръв към сърцето. Натрупването на холестерол в стените на коронарните артерии увеличава значително риска от остър миокарден инфаркт и сърдечно – съдови увреждания [68].

Инхибирането на PCSK9 е една доста обещаваща възможност при лечението със статини, особено като се има в предвид, че при голямата част от високорисковите пациенти не се постигат прицелните стойности за LDL-C въпреки максималните дози на наличните в момента липидопонижаващи средства. По данни на последните проучвания фармакологично индуцираното инхибиране на PCSK9 е ефективно за намаляване на нивата на LDL-C. Терапевтичната оценка в

дългосрочен план ще определи благоприятните ефекти на PCSK9 за намаляване на нивата на LDL-C, което ще намери израз в директна редукция на риска за ИБС.

Друг полиморфен вариант, разгледан в настоящия дисертационен труд, е rs6015450. Той е локализиран в близост до гените *GNAS* и *EDN3*. В нашето проучване този полиморфизъм (алел А) показва асоциация с повишен риск за развитие на ИБС при представителите от мъжки пол (OR 3.90, CI95: 1.69-9.18,  $p=0.0009$ ). По отношение на възникването на миокарден инфаркт на фона на сърдечна исхемия, полиморфният алел А е с по-висока честота в групата на болните само с исхемична болест, което определя протективния му ефект по отношение на инфарктни усложнения при вече установена исхемична болест на сърцето (OR 0.39,  $p=0.037$ ) отново само при мъже.

Предишни изследвания показват, че Т алелът на полиморфен вариант T393C в гена *GNAS1* се свързва с резистентност към терапия с  $\beta$  - блокери, като в резултат на взаимодействието с тютюнопушенето и консумацията на алкохол има съществена роля в патогенезата на хипертонията. Вероятно този полиморфен вариант има отношение към стимулирането на  $\beta$ -адренергичните рецептори. Въпросното взаимодействие би могло да бъде причинено в резултат на директния ефект на Gs протеините върху сърдечно-съдовата система, или от индиректния им ефект върху глюкозния метаболизъм [69, 70].

Има редица доказателства за връзката на кръвните групи с различни заболявания. В продължение на много години АВ кръвна група е свързана с предразположение към артериални и венозни заболявания, като например венозен тромбемболизъм, периферна съдова болест и исхемична болест на сърцето [71]. Това обяснява получената в нашето изследване асоциация на редкия алел С за полиморфен вариант rs579459 в гена *ABO* с повишения риск за развитие на ИБС (OR 1.34, CI95: 1.00-1.80,  $p=0.05$ ) като рисковия алел се среща с по-висока честота при пациенти (34.4%) в сравнение с популационните контроли (28.9%).

Диабетът и исхемичната болест са заболявания, които причиняват значителна тежест за общественото здравеопазване в световен мащаб. Тъй като и двете усложнения често се срещат едновременно в един и същ индивид, се предполага, че те имат сходна етиопатологична етиология. Предполага се, че инсулинът и хипергликемията имат важна роля за проявата и развитието на двете заболявания.

През последните години са открити много генетични рискови фактори както за T23Д, така и за ИБС, главно чрез геномни асоциативни проучвания. В генетично отношение захарния диабет, макроваскуларните усложнения и ИБС вероятно имат обща основа, водеща до общата ефекторна хипотеза. Въпреки това могат да бъдат идентифицирани само малък брой генетични фактори, които модулират риска и при двете заболявания [72].

В настоящата работа бяха получени статистически значими асоциации между редица алели на изследваните варианти в гени свързани с предразположение към T23Д и появата на ИБС и/или МИ. Алелът Т за rs290481 в гена *TCF7L2* има протективен ефект по отношение на риска за ИБС при мъже (OR 0.48 (0.29-0.80)  $p=0.0045$ ). Полиморфният алел Т на rs9939609 в гена *FTO* определя повишен риск за развитие на МИ при жените (OR 2.37  $p=0.026$ ), докато полиморфният алел Т на rs1801278 в гена *IRS1* е с рисков ефект за развитие на МИ при вече установена исхемична болест (OR 2.37 (1.01-5.55)  $p=0.04$ ).

Има много предизвикателства пред идентифицирането на генетични варианти, които влияят на риска от T23Д, макроваскуларни усложнения и исхемична болест. Необходими са големи клинични проучвания, които да открият допълнителни генетични локуси, споделяни и от трите заболявания. Допълнителни биологични механизми при многофакторните заболявания могат да бъдат открити чрез изследване на взаимодействията ген-ген и ген-среда, особено ако се отчита и влиянието на хранителни и физически фактори. Тези изследвания трябва да бъдат насочени към изясняване на механизмите при всеки отделен индивид. По-добро разбиране на сложните механизми на тези заболявания със сигурност ще допринесе за намирането на превантивни терапии за тях. В момента има малко генетични доказателства, които да подкрепят хипотезата за обща генетична основа на ИБС и T23Д, различна от свързаната с инсулин или хипергликемия.

Възможно е генетичните рискови фактори за диабет наистина да повишават риска за ИБС, но са необходими допълнителни изследвания както на генетично, така и на функционално ниво.

### 5.1.1. Статистическа епистаза

Геномните асоциативни проучвания са доказали сложната архитектура и полигенния характер на ССЗ. Еднолокусно-базираните методи обикновено не са в състояние да открият всички допринасящи за развитието на тези заболявания локуси, особено когато отделните локуси проявяват относително малки ефекти. Освен това по-голямата част от полиморфизмите са разположени в некодиращи области на генома, което прави трудно разбирането на техния принос по отношение на фенотипа.

В тази научна разработка ние изследвахме епистатичните взаимодействия, свързани с три общи заболявания: миокарден инфаркт, хипертония и исхемична болест на сърцето, както и със стойностите на артериалното налягане и нивата на липиди в кръвта. За тестване на хипотезата, че съществува епистатично взаимодействие между алелите на тестваните в настоящото изследване полиморфни варианти и това взаимодействие модифицира риска от развитие на ИБС, беше използван методът на множествена линейна регресия.

Бяха установени няколко епистатични взаимодействия, както между алели на различни гени, така и между алели в локуси извън белтък-кодиращите гени. Такива взаимодействия бяха установени по отношение както на риска за развитие на изследваните заболявания, така и по отношение на стойностите на артериалното налягане и нивата на липиди в кръвта.

Бяха установени следните взаимодействия:

✓ Едновременното носителство на алел G за полиморфен вариант rs1173771 в близост до гена *NPR3* и алел G за вариант rs9349379 в гена *PHACTR1* води до 2.34 пъти повишен риск за развитие на ИБС ( $p=0.0029$ ).

✓ Едновременното носителство на алел A за полиморфен вариант rs10757274 в локус 9p21 и алел T за вариант rs1800450 в гена *MBL2* води до 2.26 пъти повишен риск за развитие на миокарден инфаркт при вече диагностицирана исхемична болест в групата на мъжете ( $p=0.017$ ).

✓ При жени епистатичното взаимодействие между алел G на вариант rs6922269 в гена *MTHFD1L* и алел G на полиморфния вариант в *FTO* оказва протективен ефект по отношение на риска от миокарден инфаркт на фона на сърдечна исхемия ( $p=0.017$ ).

✓ Едновременното носителство на алел T за полиморфен вариант rs2229238 в близост до гена *IL6R* и алел A за вариант rs1501299 в гена *ADIPOQ* води до 1.97 пъти повишен риск за развитие на миокарден инфаркт ( $p=0.029$ ).

✓ Едновременното носителство на алел C за полиморфен вариант rs890293 в гена *CYP2J2* и алел G за вариант rs6922269 в гена *MTHFD1L* е свързано с понижаване на нивата на триглицериди със средно 0.74 ммол/л при жени ( $p=0.049$ ), докато едновременното носителство на алел G за полиморфен вариант rs1173771 в близост до гена *NPR3* и алел A за вариант rs6015450 в близост до гените *GNAS* и *EDN3* е свързано с повишаване на нивата на триглицериди със средно 1.41 ммол/л при същия пол ( $p=0.0003$ ).

✓ Едновременното носителство на алел C за полиморфен вариант rs890293 в гена *CYP2J2* и алел T за вариант rs3918226 в гена *eNOS* води до повишаване на стойностите на САН със средно 22.75 mmHg при жените ( $p=0.01$ ).

Трябва да се отбележи, че в установените статистически епистази участват комбинирано гени, имащи различна роля и участващи в различни патофизиологични пътища, лежащи в основата на ИБС, АХ и ТЗД. В почти всички взаимодействия участват гени, полиморфни варианти в които са показали асоциация с повишен риск за развитие на АХ, в комбинация с гени свързани с риска за развитие на ИБС и ТЗД. Това е силно доказателство за сложното преплитане на патофизиологичните пътища на молекулярно ниво в основата на трите заболявания. Това предполага, че отделните заболявания не трябва да се разглеждат изолирано, а свързано, което би обяснило по-голям процент от етиологията им.

Друго наблюдение, което направихме по време на изследването е, че епистатични взаимодействия се проявяват основно при пациенти с ИБС и ИМ, но не и при АХ. Наблюдават се и свързани с пола взаимодействия, което води до извода, че механизмите, лежащи в основата на изследваните заболявания при мъже и жени биха могли да бъдат различни.

Получените от статистическата епистаза резултати не винаги могат да получат директно обяснение, свързано с функционален ефект на изследваните полиморфизми и биологичните механизми на взаимодействие между продуктите на съответните гени, но могат да послужат като основа за бъдещи изследвания, които ще спомогнат за изясняване на сложните механизми, подлежащи в основата на сърдечните заболявания.

Основният дял на наследствеността при сърдечно-съдовите заболявания остава необяснима въпреки големия обем от данни, получени в резултат на провеждането на цялостни геномни проучвания. Към настоящия момент са идентифицирани ~ 50 локуса, обясняващи едва ~ 10% от наследствеността при този тип заболявания [73]. Останалият процент от наследствеността може да се отдаде на други фактори като редки варианти с големи ефекти, взаимодействия между генетични и екологични фактори, междугенни взаимодействия и епигенетични фактори [74].

Доказателствата от експерименталните проучвания и асоциативните анализи показват, че междуалелните взаимодействия на различни гени могат да допринесат за индивидуалното предразположение към комплексните заболявания [75-78]. Проведени са няколко изследвания, целящи да определят основните епистатични взаимодействия във връзка с различни черти на многофакторните заболявания, но с много ограничен успех. Разработени са различни стратегии с цел подобряване силата за идентифициране на ген-генни взаимодействия в масивите от данни от геномни асоциативни проучвания [79]. Например, приоритизиране на онези единични еднонуклеотидни варианти въз основа на асоциацията им като единичен маркер от GWAS анализите [80].

## 5.2. Оптимизиране на терапията с аценокумарол

Една от стратегиите за намаляване на времето за достигане на оптимални стойности на INR при терапия с индиректни антикоагуланти, което да доведе до повишаване както на ефикасността, така и на безопасността при лечение с тези медикаменти, е използването на алгоритми за дозиране, които включват демографски, клинични и генетични променливи. Тези алгоритми трябва да бъде потвърдени с рандомизирани клинични изпитвания, за да се оцени ефективността им, както и възможността за въвеждането им в стандартната клинична практика.

В нашето изследване целяхме изясняване основата на тази вариабилност чрез анализ на подбрани варианти в гени, чиито продукти имат отношение към фармакокинетиката и фармакодинамиката на медикамента. Настоящото изследване е първото, търсещо връзка между носителството на полиморфни алели в гените *VKORC1* и *APOE* и чувствителността на български пациенти към лекарствена терапия с индиректен антикоагулант. Проучването включва пациенти от различни категории заболявания, изискващи продължителна перорална антикоагулация.

В резултат от проведените анализи беше установено, че алелните и генотипни честоти за полиморфизми *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* са сходни с резултатите от предишно проучване, проведено в България [5]. По отношение на дозата медикамент носителите на референтния генотип за *CYP2C9* и *VKORC1* имат нужда от по-висока доза аценокумарол от пациентите с генотипи в хетерозиготно и хомозиготно по алтернативния алел състояние.

В България само едно проучване (Саръева и съавт.) съобщава за асоциация на генетични вариации с дозата орален антикоагулант [5, 81]. В него са изследвани гени, участващи в метаболизма и транспорта на аценокумарол (а именно *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5* и *ABCB1*) за българската популация, като само алелите *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* и *ABCB1 2677GG/3435CC* хаплотипи са свързани с изискване на значително по-ниски дози аценокумарол [5, 81]. За разлика от настоящото проучване, изследването на Саръева и колектив не включва определяне на полиморфни варианти в гена *VKORC1* и разглежда пациентите по групи според дозата аценокумарол. Нашата цел беше не само доказване на връзка между носителството на един

или друг полиморфен вариант с дозата, а и създаване на математически модел за нейното предварително определяне на базата на клинични и генетични показатели.

Голям брой проучвания са разработили фармакогенетичен алгоритъм за предсказване на началната доза аценокумарол [8, 10, 13-15, 82-86]. Всички автори използват еднокомпонентен и многокомпонентен линеен регресионен анализ за оценка на влиянието на основните генетични и негенетични фактори върху оптималната дневна поддържаща доза аценокумарол. За генериране на най-адекватните фармакогенетични модели в крайните регресионни анализи са включени различни променливи като възраст, пол, диагноза, тегло, употреба на амиодарон, варианти в *CYP2C9*, *CYP4F2*, *GCCX*, *ApoE* и *VKORC1-1639G>A* генотипи.

Към настоящия етап за българската популация такъв алгоритъм все още не е предлаган. Разработените алгоритми са популационно специфични и не може да се използват вече готови такива за българското население. Нашето изследване описва създаването на алгоритъм, който може да се приложи за прогнозиране на терапевтична доза аценокумарол базирайки се на клинични и генетични данни. За да създадем този терапевтичен алгоритъм беше необходимо първо да се установят факторите, влияещи върху тази доза. По този начин при многовариантния анализ, ние използвахме възрастта като клиничен и демографски фактор и полиморфни варианти в гените *VKORC1* и *CYP2C9* като генетични фактори, влияещи на терапевтична доза аценокумарол. Нашето проучване предполага, че дозирането на аценокумарол, извършено на базата на фармакогенетичен алгоритъм, би могло да намали страничните ефекти от антикоагулантната терапия като кръвоизливи и тромбози.

Процентът вариабилност в дозата аценокумарол, който се обяснява от създадения на базата на данните на пациентите от тестовата група, модел е 43.8% и е значително по-ниска от тази, определена от модела на Van Schie и съавт. (52.6%) [8] или Vorobia и съавт. (60.6%) [15]. Това се обяснява с факта, че в алгоритъма, разработен от Vorobia и съавт. [15] са включени и полиморфни варианти в гените *CYP4F2* и *APOE*, за които е установено, че са асоциират с 5% от промяната в необходимата доза аценокумарол.

Както е видимо от **Фиг. 4. 8.** в раздел „**Резултати**“ с помощта на създадения фармакогенетичен алгоритъм с най-голяма точност са определени дозите в средния диапазон (2-4 мг/ден), който включва по-голяма част от пациентите на антикоагулантна терапия. Моделът показва трудности при предсказване на високи дози медикамент – над 4 мг/ден, като колкото реалната доза е по-висока, толкова отклонението в предсказаната доза е по-голямо. Подобна трудност се наблюдава и при диапазона от ниски дози аценокумарол (1-2 мг/ден), при които математическия модел показва отклонение към по-висока предсказана доза спрямо реалната. Моделът обаче предсказва с голяма точност екстремно ниските изисквания за антикоагулант (<1 мг/ден). Това е изключително важно при пациентите с повишена чувствителност към терапията с индиректен антикоагулант, като по този начин би се избегнало свръхдозирването при тези пациенти и възникване на животозастрашаващи хеморагии.

Наблюдаваното отклонение на математическия модел е  $-0.23 \pm 1.35$  мг/ден, което показва че моделът не е силно изкривен към високи или ниски стойности. Средното абсолютно отклонение (точност) на модела е  $1.09 \pm 0.81$  мг/ден. Процентът на пациентите, чиято доза е определена с точност от 1 мг/ден е 53.85% (28 бр.). Тези стойности вероятно се дължат на попадането на голям брой пациенти, третиран с високи дози медикамент (N=10 бр., 19.23% от общия брой) във валидиращата група. Моделът среща трудности при предсказването на високите дози аценокумарол, вероятно дължащо се на факта, че алгоритъмът включва предимно фактори (възраст, *VKORC1* и *CYP2C9* генотипи), които водят до значително намаление в дозовите изисквания, и само един фактор (носителството на полиморфен вариант за хаплотип *VKORC1\*3*), определящ изискването на дози над средните. Както беше споменато по-горе, разпределението на пациентите в двете групи, тестова и валидираща, беше извършено на случаен принцип с помощта на статистически пакет SPSS 20.0 с цел предотвратяване на влиянието на външните фактори или преценката на изследователя върху текущия експеримент.

Друга възможна причина е малкият брой пациенти във валидиращата група. Известно е, че статистическите закономерности могат да се проявят само при голям брой наблюдавани случаи в масов процес. Освен това, тъй като стойностите на зависимата променлива (доза медикамент) следват някакво разпределение дори при индивиди с една и съща стойност на разглежданите параметри, то не е възможно те да се предскажат точно, а само да се оценят с определена точност.

Въпреки това стои въпросът доколко оправдано и икономически изгодно е използването на информацията за генотипа на пациентите при определяне на тяхната оптимална доза антикоагулант. Към настоящия момент са публикувани резултатите от три големи рандомизирани клинични проучвания, които проверяват хипотезата за необходимостта от прилагането на фармакогенетични алгоритми за дозиране на аценокумарол в рутинната клинична и диагностична практика [87-89]. Въпреки че те се различават по своята организация и структура (време на проследяване на пациентите, различни антагонисти на витамин К, дизайн за двойно-сляпо vs. единично-сляпо проучване, расови характеристики на изследваната група, и метод за дозиране в контролната група), те са много сходни (многоцентрови, рандомизирани, с основна крайна цел времето за постигане на прицелни нива на антикоагулация в терапевтичния диапазон; определяне на генотипа на *CYP2C9* и *VKORC1*; както и използването на прицелното INR като биомаркер за риска от кървене и тромбоза). Данните за честотата на кървене и тромботични усложнения остават обаче извън изследователския дизайн на тези проучвания. Въпреки организационните разлики заключенията на трите проучвания са сходни. В началния период от 4 седмици на антикоагулация с варфарин, рандомизираното двойно-сляпо проучване на Kimmel et al. [87] показва почти идентични резултатите в групите, при които дозирането е извършено на база фармакогенетичен и клиничен алгоритъм (процент от времето в терапевтичния INR диапазон 45.2% срещу 45.4% за съответно клиничното и фармакогенетично дозиране). В 12-та седмица след започване на антикоагулантната терапия с аценокумарол и фенпрокумон Verhoef et al. [88] установяват, че алгоритъмът с използване на генетична информация дава резултати, които са подобни на тези, постигнати с алгоритъма, базиран на клинични променливи (61,6% срещу 60,2% на 12-та седмица). При изследването на Pirmohamed et al. [89] тези проценти са съответно 67.4% и 60.3% на 12-та седмица от лечението.

Резултатите от анализи на финансовите разходи и ефективността при използване на генетична информация за определяне на необходимата доза медикамент също са доста противоречиви [90, 91]. В едни от тези изследвания изглежда, че генотипирането е доминиращата стратегия, което означава, че използването на генетичната информация е по-ефективно и по-евтино, в сравнение с отчитането само на демографските и клинични показатели [91]. От друга страна, съществуват и изследвания, които определят тази стратегия като финансово неизгодна и необоснована [90]. В повечето проучвания ефектът на генотипа се определя чрез пряко наблюдение и определяне на риска от хеморагии и тромбоемболия в резултат на антикоагулантната терапия. Въпреки това, проведените до настоящия момент проучвания не са осъществени при достатъчно голяма група от пациенти, за да може да се отчетат с голяма точност риска от настъпването на нежелани лекарствени реакции.

Според изследването на Meckley и др. обаче, определянето на оптималната доза медикамент на базата на генотипа на пациентите е по-малко ефективно и по-скъпо в сравнение със стандартния начин на дозиране [92]. Това заключение вероятно се дължи основно на несигурността по отношение на ефективността на дозиране чрез използване на информацията за генотипа по отношение на риска от сериозни инциденти или терапевтичен неуспех на лечение с антикоагуланти.

### 5.3. Оптимизиране на терапията с клопидогрел

Към настоящия момент фенотипирането за идентифициране на пациенти с висока остатъчна тромбоцитна агрегация на фона на лечение с антиагреганти се извършва посредством използване на разнообразни тромбоцитни функционални тестове. Все още обаче липсват препоръки за избор на антиагрегантен тест за определяне на “слабите” метаболитори на този тип медикаменти [93].

Сред чернодробните ензими, които допринасят за активирането на клопидогрел до неговия активен метаболит, ключов ензим е мефенитоин – хидроксилазата, кодирана от гена *CYP2C19*. Съществуват голям брой изоформи на този ензим, които се различават съществено по своята каталитична активност. Различните изоформи на *CYP2C19* оказват съществено влияние върху превръщането на КЛД в активната му форма, като тя може да намали (*CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3*) или повиши (*CYP2C19\*17*) фармакодинамичния ефект на лекарството [94, 95]. Функционалният вариант, водещ до загуба на каталитичната активност на ензима мефенитоин - хидроксилаза (*CYP2C19\*2*), присъстващ в около 30% от бялата раса и до 60% от населението от азиатски произход, се свързва с намаляване на активацията на КЛД и последващо понижаване на антиагрегантният ефект [96, 97]. Носителството на дори един *CYP2C19\*2* алел води до значително увеличаване на риска от повтарящи се сърдечно-съдови инциденти, включително драматично трикратно увеличение на тромбоза на стента при пациенти, приемащи КЛД [98-100]. При по-скорошни проучвания са били идентифицирани няколко други механизма, които оказват влияние върху ефективността на терапията с КЛД, включително лекарство-лекарствени взаимодействия с инхибитори на протонната помпа [101, 102] и клинични фактори като диабет и наднормено тегло [94, 103].

В проведеното от нас проучване установихме, че носителството на полиморфния алел *CYP2C19\*2* се свързва с близо трикратно повишен риск за проява на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на референтни *\*1* алели (OR 2.81,  $p=0.001$ ). Към настоящия момент това е най-силният маркер, определящ резистентност към антиагрегантната терапия с клопидогрел.

Връзката между дозата и носителството на полиморфните варианти в гена *CYP2C19* е изследвана и потвърдена в голям брой проспективни проучвания [104-109]. Доказано е, че носителството на *CYP2C19\*2* алел се свързва с недостатъчно инхибиране на тромбоцитната агрегация и резистентност към терапия с КЛД. От своя страна, носителството на *CYP2C19\*17* алел води до възникване на кръвоизливи в резултат на прилаганото лечение, както и до повтарящи се сърдечно-съдови инциденти като мозъчен инсулт.

Полиморфизмът *CYP2C19\*2* е една от основните детерминанти и на прогнозата след прекаран миокарден инфаркт при пациенти, лекувани с клопидогрел [110]. В проучване, проведено в Корея с участие на 2 146 пациенти, лекувани с излъчващи коронарни стентове, 47% са били носители на поне един *CYP2C19\*2* алел. Пациентите са проследени в продължение на 12 месеца и резултатите показват, че смъртните случаи, дължащи се на сърдечна недостатъчност, миокарден инфаркт или тромбоза на стента, са били със значително по – високи нива при пациенти, които са носители на *CYP2C19\*2* алел в сравнение с останалите (2,0% срещу 0,8%) [110].

Друг наскоро открит полиморфизъм в гена *CYP2C19* е *CYP2C19\*17*. Последните проучвания във връзка с този полиморфен вариант показват, че транскрипционната активност на гена *CYP2C19* е значително повишена при наличието на алел *CYP2C19\*17*. Този полиморфен вариант се дължи на замяна на цитозин с тимин в позиция 806 (- 806C>T) в 5' – фланкиращия регион на гена *CYP2C19*. Алелът *CYP2C19\*17* може да свързва специфично ядрени протеини към 5' – фланкиращия район на гена, което води до значително повишаване на генната транскрипция и експресия. Следователно наличието на алел *CYP2C19\*17* определя ултрабързия метаболизъм на *CYP2C19* субстратите [111]. Това е доказано в редица фармакологични изследвания. В малка подгрупа от пациенти (N=237), Geisler et al.[112] оценява въздействието на този алел при пациенти, подложени на терапия с клопидогрел след ПКИ. Авторите наблюдават тенденция към по-ниски нива на остатъчната АДФ-индуцирана тромбоцитна агрегация при носители на *CYP2C19\*17* алел. Поради относително малкия брой пациенти, разликите не са достигнали статистическа значимост.

Друг генетичен фактор, оценен в нашето проучване е полиморфен вариант *CYP3A5\*3*. Беше установено, че повечето от пациентите са носители на *CYP3A5\*3/\*3* генотип. Поради ефекта на този генотип в метаболизирането на КЛД до неговия активен метаболит, предположихме, че носителството на полиморфен вариант в гена може да доведе до слаб отговор към лечение с този медикамент. Няколко проучвания изследват влиянието на този полиморфизъм в *CYP3A5* върху

антиагрегантният ефект на КЛД [113]. Suh et al. [113] провеждат изследване сред корейското население, като резултатите от това проучване сочат, че атеротромботичните събития настъпват по-често при пациенти с неекспресиращ генотип за CYP3A5 (CYP3A5\*3/\*3). Според тези изследователи CYP3A5 експресиращата група не показва по-значителна инхибиция на тромбоцитната агрегация от CYP3A5 неекспресорите след лечението с КЛД [113].

В нашето изследване установихме, че носителството на полиморфен алел T за rs15373378 в локус 9p21 води до повишен риск по отношение на развитието на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 1.71 (0.96-3.10)  $p=0.01$ ).

През 2010 год. Musunugu и съавт. провеждат проучване, което включва 1 402 асимптоматични възрастни от изолатна популация (амиши), при 788 от които е измерена тромбоцитната активност (HAPI Heart Study), както и 939 пациента с диагноза калцификация на коронарните артерии (определена чрез компютърна томография). Активността на тромбоцитите е измерена чрез импедансна агрегометрия. Изследването включва 29 полиморфни варианта в локус 9p21, генотипирани посредством Affymetrix GeneChip® Human Mapping 500K Array. Дванадесет от тези варианти показват значима асоциация с реактивността на тромбоцитите ( $p \leq 0.001$ ). Вариантът rs10965219 в *CDKN2B-AS1* показва асоциация, както с тромбоцитната активност ( $p=0.0002$ ), така и с калцификация на артериите ( $p=0.002$ ). Този вариант впоследствие е тестван за асоциация с тромбоцитната функция при 2 364 участника от Framingham Heart Study (FHS) и 1 169 участника от GeneSTAR Study. Алелът G на този вариант (с честота ~ 51% сред трите изследвани популационни групи) показва значителна асоциация с повишена реактивност на тромбоцитите в FHS ( $p = 0.001$ ), както и тенденция към такава при GeneSTAR ( $p = 0.087$ ); впоследствие е проведен мета-анализ, за който комбинираната  $p$ -стойност достига 0.0002 [114].

На базата на тези резултати би могло да се предположи, че полиморфни варианти в локус 9p21.3 имат плейотропен ефект и повлияват риска от МИ/ИБС и мозъчен инсулт, вероятно посредством влияние върху активността на тромбоцитната функция [114]. Тромбоцитите играят съществена роля при възстановяването на васкулатурата на кръвоносните съдове и когато те се активират в резултат на патологични условия, това би могло да доведе до формиране на тромби и оклузия на съдовете [115]. Освен това терапевтичните интервенции, които понижават реактивността на тромбоцитите, като аспирин и клопидогрел, повишават също така и риска от възникване на съдови оклузивни събития, стоящи в основата на миокардния инфаркт и мозъчния инсулт [116, 117].

Поради тази причина може да се направи предположението, че повишаването на реактивността на тромбоцитите, водещо до екс виво тромбоцитна агрегация в резултат на носителството на полиморфни варианти в локус 9p21, може да има отношение и към отговора към лекарствена терапия с клопидогрел при рискови пациенти.

В нашето изследване ние установихме, че носителството на полиморфен алел T за rs3918226 в гена *IL6R* има протективен ефект по отношение на развитието на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 0.48 (0.24-0.96)  $p=0.04$ ). Получената зависимост се засилва в групата на представителите от женски пол (OR 0.05 (0.006-0.39)  $p=0.0003$ ).

Процесите на възпаление и активиране на тромбоцитите са критични явления в условията на остър коронарен синдром. Тромбоцитите могат да допринесат за увеличаване на исхемичното увреждане на сърцето чрез повишаване на възпалителния отговор на левкоцитите и ендотелните клетки на сърдечния миокард. Фармакологичното инхибиране на тромбоцитната активация предотвратява появата на исхемични усложнения при пациенти с коронарни заболявания. Агенти, насочени срещу интегринавия гликопротеин IIb / IIIa (GP IIb/IIIa) рецептор не само инхибират тромбоцитната агрегация, но също така ограничават възпалителния отговор при остри коронарни синдроми. Остава да се изясни дали инхибирането на тромбоцитната активация чрез други механизми, различни от блокадата на гликопротеин IIb / IIIa, може също така да стимулира антивъзпалителни ефекти.

Много фактори за фармакокинетиката на лекарствата, включително абсорбция, разпределение, метаболизъм и елиминиране, могат да бъдат променяни по време на възпалителна реакция. Проучванията при остри възпалителни модели са илюстрирали промени във фармакокинетиката и

фармакодинамиката на множество клинично значими терапевтици. въпреки това механизмът на това въздействие остава все още доста неясен [118]

Данните от литературата от последните няколко години показва, че прилагането на провъзпалителни цитокини значително променя експресионния профил на лекарствените транспортери, като в резултат на това би могло да се направи извода, че цитокините оказват съществено влияние върху чернодробната детоксификация на лекарствените препарати по време на възпаление [118].

Процесът на възпаление модулира фармакокинетичните процеси в организма, водещи до разлика в терапевтичния отговор при лечение с даден медикамент. Мембранно-свързаните лекарствени транспортери са важни детерминанти на фармакокинетиката на лекарствата като са доказани и идентифицирани медириани от възпаление промени в тяхната експресия и регулация [119].

През последните 20 години се съобщава, че инфекцията и възпалението са свързани с промени в нивата на различни лекарства, като се предполага, че това се дължи на влиянието на плазмените протеини [120, 121] в допълнение към потискането на различни чернодробни и екстрахепатални лекарство-метаболизиращи ензими [122, 123].

Възпалението медирира промени в експресията на множество мембранно-свързани лекарствени транспортери, принадлежащи главно към АТР-свързващото касетно суперсемејство (ABCВ) и суперсемејството на преносителите на разтворими вещества (Solute carrier family, SLC суперфамилия). Тези протеини играят роля в фармакокинетични процеси, участват активно в абсорбцията на ксенобиотици от стомашно-чревния тракт, разпределението на лекарства в целевите обекти и елиминирането на спрегнатите метаболити чрез хепатобилиарната и бъбречната система. Тези протеини участват в транспорта на клинично значими терапевтици чрез своята широка субстратна специфичност [124].

Транспортерите от групите на ABCВ и SLC притежават широка субстратна специфичност и показват взаимодействия с множество клинично значими субстрати, включително антидиабетни медикаменти, антихистамини, статини, антиинфекциозни, антинеоплазмени, антиретровирусни съдови агенти, имunosупресори, стероиди, опиоиди, токсини и много глюкуронид-, глутатион- и сулфат-конюгирани метаболити [124].

В проведеното от нас проучване беше установено, че носителството на полиморфен алел T за rs3918226 в гена *eNOS3* се свързва с близо четирикратно повишен риск за развитие на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 3.98 (1.25-12.6)  $p=0.01$ ). Рискът, определен от носителството на този полиморфен вариант, е дори по-висок от този, определящ се от носителството на алел *CYP2C19\*2* (OR 2.81 (1.47-5.39)  $p=0.001$ ), който към настоящия момент е най-силния маркер, свързан с резистентност към антиагрегантна терапия.

Тромбоцитите не само допринасят за нормалната хемеостаза, но също така са отговорни и за възникването на тромботични нарушения в кръвоносните съдове на сърцето. Въпреки различните патологични ситуации, като например диабет, атеросклероза, затлъстяването и хипертонията, които са свързани с анормална функция на тромбоцитите, доклади свързани с модулация на тромбоцитната реактивност посредством промени в експресията и дейността на eNOS досега са ограничени до диабет и хипертония. Съществуват изследвания, които потвърждават водещата роля на артериалната хипертония като предразполагащ фактор за липсата или недостатъчния терапевтичен отговор при терапия с клопидогрел [125].

Хипертонията се характеризира с повишен риск от тромбоемболизъм. Нарушения в хемостазата и функцията на тромбоцитите стоят в основата на патофизиологията на тромбоза при фона на високите стойности на АН. Няколко изследвания показват, че нарушението в експресията на eNOS активност в тромбоцитите може да доведе до повишена тромбоцитна реактивност, свързана с подлежащата хипертония [126].

От друга страна хипертонията е свързана и с инхибирането на транспорта на L-аргинин чрез системата  $y + L$  при хора и животни. Инхибирането на тази система-носител води до намаляване на бионаличността на L-аргинин и нарушено производство на азотен оксид [126].

Предполага се, че ендогенните L-аргинин аналози (напр асиметричен диметиларгинин), които инхибират NOS активността, са замесени в активирането на тромбоцитите при пациенти с хипертония [126].

Ситуацията обаче вероятно е по-сложна, тъй като производството и дейността на eNOS са две различни неща. eNOS в тромбоцитите, подобно на ензима в ендотелните клетки, може да бъде преобразуван (особено в отсъствието на адекватни нива тетрахидробиоптерин) в  $O_2$  - и/или пероксинитрит-генериращ ензим [126].

Въпреки че eNOS може да бъде открит в човешки тромбоцити, способността на тромбоцитите в резултат на повишена реактивност да произвежда NO, както и значението му при повлияване на тромбоцитната агрегация все още е обект на противоречиви дебати. *In vitro* е доказано, че NO произведен от тромбоцити само слабо инхибира активирането на тромбоцитите чрез колаген или тромбин. [127].

Изследванията, извършени с помощта на тромбоцити от eNOS-дефицитни мишки показват, че липсата на тромбоцитен NO променя хемостатичния отговор *in vivo* чрез увеличаване на участието на тромбоцитите за подпомагане на eNO в регулацията на хемостазата [128].

Интересното е, че последните данни показват, че вместо предотвратяване на тромбоцитната активация и агрегация, eNO може действително да стимулира тромбоцитите [129].

Ефекторът на NO, цикличният гуанозин монофосфат, предизвиква двуфазен отговор на тромбоцитите, състоящи се от първоначален преходно стимулиращ отговор (който насърчава агрегацията на тромбоцитите) и последващ инхибиторен отговор, който ограничава размера на формираните тромби. Допълнителни доказателства сочат, че ниските концентрации на NO насърчават дискретната дегранулация на тромбоцитите.

Генът, кодиращ ендотелната синтаза на азотния оксид се счита за един от логичните кандидати за хипертония, тъй като засиленото производство и бионаличността на този ензим може да доведе до освобождаване на азотен оксид в ендотелните клетки, което оказва вазопротекторен ефект върху кръвното налягане [130]. Това е едно от възможните обяснения на асоциацията на полиморфен вариант в гена за ендотелната синтаза на азотния оксид и отговора към лекарствена терапия с клопидогрел, която получихме в нашето изследване. Известно е, че хипертонията представлява основно клинично състояние, което води до недостатъчен отговор към антиагрегантната терапия. Поради тази причина е напълно възможно индиректно носителството на полиморфен вариант в гена *eNOS* да се свързва и с резистентността към клопидогрел.

Редица клинични проучвания и експерименти с животни показват, че промяна в метаболизма на азотния оксид (NO) може да бъде фактор, допринасящ за патогенезата на хипертонията. Еднонуклеотидните базови замени G894T (Glu298Asp в екзон 7), T786C и G23T в гена са най-клинично значимите полиморфизми в гена *eNOS*, които са описани до този момент в научни списания в тази област [131, 132].

От друга страна се знае, че тромбоцитите експресират ендотелната форма на синтазата на азотния оксид и произвеждат NO. Въпреки това, за разлика от eNOS в ендотелните клетки, тази в тромбоцитите е до голяма степен  $Ca^{2+}$  -независима и дейността ѝ се дължи на процесите на фосфорилиране. Азотният оксид в тромбоцитите играе важна роля в регулирането на тромбоцитната агрегация и секреция. Промени в активността на тромбоцитната eNOS са отговорни за свъхактивиране на тромбоцитите, което е характерно за различни патологични състояния (например хипертония, диабет, резистентност към терапия с клопидогрел и др.) [126]. Освен това е известно, че терапията с клопидогрел при пациенти с ИБС не само инхибира активирането на тромбоцитите, но и подобрява и ендотелната функция и бионаличността на азотен оксид [133].

В проведеното от нас проучване установихме, че носителството на полиморфен алел G за rs1173771 в близост до гена *NPR3* се свързва с двукратно повишен риск за развитие на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 2.49

(1.41-4.39)  $p=0.016$ ). Рискът, определен от носителството на този полиморфен вариант, е по-нисък от този, определящ се от носителството на алел *CYP2C19\*2* (OR 2.81 (1.47-5.39)  $p=0.001$ ), който към настоящия момент е най-силния маркер, свързан с резистентност към антиагрегантна терапия.

Системата на натриуретичните пептиди (НП) регулира АН и хомеостазата на вътрешната течна среда на организма посредством модифициране на гломерулната филтрация и екскрецията на натрий. Тази система се състои от семейство, включващо три пептидни хормона (типове А, В и С), които взаимодействат с три различни рецептора (НП рецептор А, НП рецептор В и НП рецептор С - NPRC) [134].

В проучване, проведено през 2014 г. са изследвани 145 пациента (19 жени [13,1%], 126 мъже [86,9%], на средна възраст 55 години) със стабилна ИБС. Всички пациенти са получавали редовно антитромбоцитна терапия, включваща 100 мг/ден аспирин и 75 мг/ден клопидогрел поради инплантиране на лекарство-излъчващи стентове от най-малко 1 месец преди провеждане на изследването. При всички пациенти е проведено 24-часово наблюдение на стойностите на АН. Остатъчната тромбоцитна активация след прилаганото лечение с клопидогрел и аспирин е измерено чрез импедансна агрегометрия.

От всички пациенти 49 са с установена АХ, а останалите 96 показали нормални стойности на кръвно налягане. Резистентност към аспирин е установена при 22 (16,4%) от всички 134-имата пациенти, които са приемали аспирин. Резистентност към клопидогрел е открита при 55 (37,9%) от 145-те пациенти които са получили клопидогрел. Честотата на резистентност към провежданата антиагрегантна терапия е значително по-висока в групата на хипертониците в сравнение с нормотензивните пациенти (съответно  $P=0.030$  и  $P=0.007$ ). Корелационен анализ показал слаба, но значима положителна корелация между резистентността към клопидогрел и серумните нива на пикочната киселина, средният обем на тромбоцитите, броят на тромбоцитите, както и с 24-часовата средна стойност на систоличното АН ( $r=0.180$ , съответно  $p=0.030$ ;  $p=0.016$ ;  $p=0.006$ ;  $p=0.016$ ). Това изследване демонстрира по-висока честота на резистентност към антитромбоцитната терапия при пациенти с АХ [125].

В съответствие с тези резултати, Kim и др определят високото систолично и диастолично налягане като рисков фактор за резистентност към клопидогрел при пациенти с ИБС или мозъчно-съдова болест [135].

В проучването на Ozben и съавт. от 2010 г. също е докладвана висока честота на резистентни към терапията с клопидогрел пациенти в групата на хипертониците. Резистентност към аспирин е наблюдавана при 21% от хипертониците посредством измерване на тромбоцитната функция чрез използването на Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA system (Accumetrics Inc., San Diego, CA).

Wang и съавт. изследват резистентността към аспирин при 328 пациенти със стабилно сърдечно или мозъчно-съдово заболяване, диабет, хипертония и хиперлипидемия като съобщават, че хипертонията и диабетът представляват рискови фактори за аспиринова резистентност [136].

Подобни резултати получават и Abaci и съавт [137]. Вероятната причина за тези резултати е, че редица фактори, включително повишена артериалната ригидност и ендотелна дисфункция биха могли да допринесат за промяна в тромбоцитната реактивност и да доведе до относително висока честота на резистентност към аспирин сред пациенти с хипертония [138, 139].

Доказаната връзка между носителството на полиморфни варианти в гена за *NPR3* с артериалната хипертония би могла да обясни получената в нашето проучване асоциация между носителството на полиморфен алел за rs1173771 и лекарствената резистентност при терапия с клопидогрел.

Пациентите с диабет имат повишена тромбоцитна реактивност и проявяват "устойчивост" към терапия с клопидогрел в сравнение с пациенти без диабет, което ги излага на повишен риск от атеротромботични събития в условията на остър коронарен синдром или перкутанни коронарни интервенции [140].

В резултат на всичко изброено до тук е съвсем нормално да предположим, че щом състоянието на захарен диабет и свързаната с него инсулинова резистентност са предразполагащи фактори за липсата или недостатъчен отговор към терапията с клопидогрел, то и полиморфните варианти в

различни гени, асоциирани с повишен риск за развитие на глюкозен интолеранс, също могат да са свързани с отговора към лекарствена терапия с този медикамент. Това предположение напълно обяснява получените резултати за асоциация на полиморфните варианти в гените *ADIPOQ* и *LEP* с терапевтичния отговор при лечение с клопидогрел. Парадоксалното, обаче, е че двата варианта в гена за адипонектин показват противоположно влияние по отношение на резистентността към медикамента. Полиморфният алел Т за rs1501299 в гена *ADIPOQ* се среща с по-висока честота при пациенти, които се повлияват добре от лечението в сравнение с тези, показали недостатъчен или липсващ отговор към терапия с медикамента (съответно 35.19% vs 22.92%, OR 0.55 (0.3-1.02) p=0.05). От друга страна беше установено, че носителството на полиморфен алел А за rs7799039 в гена *LEP* се свързва с 3 пъти повишен риск за развитие на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 3.03 p=0.04). Съществуват изследвания, които доказват връзката между носителството на полиморфни варианти в гените за адипонектин и лептин и повишения риск за затлъстяване при рискови пациенти. Както е известно, повишеното телесно тегло е един от клиничните показатели, които предразполага към резистентност към клопидогрел [141]

Лептинът регулира телесното тегло и разхода на енергия, както и играе важна роля в модулирането на глюкозния и липидния метаболизъм, ангиогенезата, имунитета и кръвното налягане. Лептинът е важна сигнална молекула в хипоталамуса, където влияе върху състоянията на апетита и ситост. Циркулиращите нива на лептин корелират с броя на адипоцитите и техните размери, което обяснява защо нива на лептин са повишени при затлъстяване и допринасят за местния възпалителен отговор и създаване на положителна обратна връзка за поведението на хранене чрез лептиновата резистентност [141].

Състоянието на диабетно болните е свързано с ендотелна дисфункция, нарушения във фибринолизата, повишени нива на фактори на кръвосъсирването и висока реактивност на тромбоцитите. Като се има предвид, че агрегацията на тромбоцитите играе централна роля в развитието на атеротромботични събития, не е изненадващо, че повишената тромбоцитна активност се свързва с краткосрочни и средносрочни атеротромботични усложнения при пациенти с Т2ЗД. Въпреки антитромбоцитната терапия, диабетно болните остават с повишен риск от повтарящи се исхемични инциденти в сравнение с пациенти без заболяването [140].

Тромбоцитната дисфункция при захарен диабет е свързано с няколко механизми - включително нарушения в метаболизма, оксидативен стрес и ендотелна дисфункция, които водят до повишена тромбоцитна реактивност. Тромбоцитите при диабетици реагират по-често, дори на подпрагови дразнителни, като по този начин допринасят за ускоряване на тромбозата в сравнение с недиабетици [140, 142].

Както инсулин - зависимият (тип 1), така и инсулин независимият захарен диабет (тип 2) се характеризират с повишена активация на тромбоцитите. Към настоящия момент ендотелната дисфункция, причинена от деградацията на ендотелната NOS, е описана като водеща причина за активиране на тромбоцитите при захарен диабет. Също така, остро намаляване на бионаличността на системен NO предизвиква активиране на тромбоцитите. Функцията на тромбоцитите при диабет може да бъде възстановена в резултат на възстановяването на производството на NO от ендотела [140, 142]. Въпреки това, тъй като тромбоцитите не произвеждат NOS, необходим за достатъчното инхибиране на тромбоцитната активация чрез увеличаване цитоплазмени нива на цикличния гуанозин монофосфат, увреждането на този път в тромбоцитите би могъл да допринесе за хиперактивиране при пациенти с диабет. В действителност в тромбоцитите при пациенти с диабет активността на eNOS е значително по-ниска от тази, измерена в тромбоцити на здрави индивиди, което предполага, че намаляването на NOS активността може да играе роля в патогенезата на съдовите усложнения при диабет [140, 142].

В проведеното от нас проучване установихме, че носителството на полиморфен алел Т за rs7412 в гена *APOE* се свързва с близо четирикратно повишен риск за развитие на резистентност към терапията с клопидогрел в сравнение с носителите на див тип алели (OR 3.89 p=0.03). Рискът, определен от носителството на този полиморфен вариант, е дори по-висок от този, определящ се от

носителството на алел *CYP2C19\*2* (OR 2.81 (1.47-5.39)  $p=0.001$ ), който към настоящия момент е най-силния маркер, свързан с резистентност към антиагрегантна терапия и съизмерим с риска, определящ се от носителството на алел T за rs3918226 в гена *eNOS3*.

Съществуват предположения, според които между *APOE* и *CYP2D6* би могло да се осъществява плейотропно взаимодействие, което да води до промяна в метаболизма на различни ксенобиотици и лекарства, както и в чернодробната функция [143].

Това може да обясни получената от нас зависимост. Освен това съществуват проучвания, които докладват, че аполипопротеин (АПО) Е-съдържащите липопротеини с висока плътност притежават мощен анти-тромбоцитен ефект, очевидно поради конкурентно насищане на свързващите рецепторни места върху клетъчната повърхност на тромбоцитите, което води до потискане на тромбоцитната агрегация.

Установено е, че аполипопротеин Е повлиява образуването на атеросклеротични лезии посредством инхибиране на тромбоцитната агрегация. Аполипопротеин Е осъществява този процес посредством свързване с HDL частици, водещо до образуване на HDL-E. От своя страна, HDL-E действа като инхибитор на индуцирана тромбоцитна агрегация чрез взаимодействието си с насищащи се сайтове, разположени на повърхността на тромбоцитите [144].

Както е известно, аро-Е представлява активната съставка на HDL-E частиците. Сам по себе си HDL не притежава инхибиторен ефект, но когато се комбинира с апо-Е, това води до понижаване на агрегацията на тромбоцитите с до 26% в сравнение с контролните нива [144].

Според някои изследователи, инхибирането на тромбоцитите се дължи на действието на комплексното действие на L-аргинин и азотен оксид. Съдовия ендотел синтезира азотен оксид (NO) от крайните гуанидинови азотни атоми на L-аргинин, като използва разтворим ензим, наречен NO синтаза. След това азотния окис се свързва с разтворима гуанилатциклаза с цел производство на цГМФ, който има инхибиращ ефект върху тромбоцитната агрегация. Повишените нива на цГМФ също така намаляват количеството на цикличната АМФ фосфодиестераза, ензим, който превръща цикличния АМФ в АМФ. Намалението на нивата на цикличната АМФ фосфодиестераза води до увеличаване на тези на цикличния АМФ, който също има инхибиторен ефект по отношение на тромбоцитната агрегация [145].

Докато свободният аполипопротеин Е има слаб инхибиторен ефект по отношение на тромбоцитната реактивност, то комплексът от апоЕ и фосфолипиди (аро-Е'DMPC) инхибира в висока степен тромбоцитната агрегация, индуцирана от АДФ, епинефрин и колаген.

Освен това апоЕ повишава активността на синтазата на азотния окис и нивата на цГМФ вътре в самите тромбоцити. При прагови концентрации на АДФ, комплексът апо-Е'DMPC води до увеличаване на цГМФ от 3.7 +/- 1.1 до 33.9 +/- 3.2 пикомола /  $10^9$  тромбоцити, както и до увеличаване на вътреклетъчните нива на цАМФ, от 11.7 +/- 1.9 до 23.5 +/- 3.3 пикомола /  $10^9$  тромбоцити [145].

Съществуват предположения, според които извънклетъчният NO освободен от тромбоцитите посредством ароЕ стимулацията на NO-синтазната активност, има потенциал да функционира по паракринен начин. Също така, ароЕ би могъл да действа директно върху други видове клетки, за да предизвика производството на NO, включително и нервни клетки и T-лимфоцити [145].

Механизмът, на базата на който G алелът на полиморфния вариант rs9349379 в гена *PHACTR1* оказва протективен ефект по отношение на развитието на резистентност към антиагрегантната терапия (OR 0.51,  $p=0.02$ ), към настоящия момент не е обяснен. В литературата не бяха установени такива асоциации, което налага провеждането на функционални анализи за установяване на потенциалните механизми на това влияние. *PHACTR1* представлява регулатор на фосфатазата и актина. Вероятно влиянието на този протеин по отношение на отговора към лекарствена терапия с клопидогрел е предимно регулаторно посредством въздействие върху междинни посредници, участващи в активацията и агрегацията на тромбоцитите.

Освен това, при провеждане на статистическите анализи бяха установени и две епистатични взаимодействия между полиморфни варианти rs7865618 и rs1537378 в локус 9p21 (съответно алели А и Т) и алел G на полиморфния вариант rs9349379 в гена *PHACTR1*, водещи до съответно 5.62x и

6.24x по-висок риск за развитие на резистентност към проведеното лечение с клопидогрел. Вероятно некодиращата ANRIL РНК (9p21) оказва регулаторно въздействие върху експресията и каталитичната активност на Phactr1 протеина, който се явява регулатор на фосфатазата и актина на биохимично ниво.

Към настоящия момент в научната литература няма данни за епистатични взаимодействия, показващи асоциация с отговора към лекарствена терапия с КЛД. Подобно на еднолокусните асоциации, тези в резултат на епистаза също трябва да бъдат потвърдени в независима група от пациенти с повишен риск от тромбози. Установените взаимодействия биха дали основа на бъдещи проучвания във връзка с изясняване на фармакогенетичните основи на терапевтичния отговор при антитромботичната терапия с тиенопиридини.

#### 5.4. Обобщение

Както е известно, ИБС и АХ представляват многофакторни заболявания, за чието проявление принос имат както начина на живот и факторите на средата, така и генетичните фактори. Установените към настоящия момент полиморфни замени, асоциирани с повишен или понижен риск за развитие на ИБС и АХ, са с относително висока честота, като всеки от тези полиморфизми допринася в изключително ниска степен за развитие на двете заболявания. Генетичният компонент при сърдечно-съдовите заболявания е около 50% - приблизително толкова е и процентното влияние на средата и външните фактори. Важното е, че в този генетичен компонент се включват десетки, дори стотици промени в генома, които взети самостоятелно оказват изключително слаб ефект. Основната насока на генетиката на сърдечно-съдовите заболявания е идентифициране на промени в човешкия геном, имащи отношение към сърдечно-съдовите увреждания. Целта е в следствие да бъде създаден панел от варианти с висока популационна честота, които обаче в комбинация да дадат възможност да бъде определен потенциалния риск за развитие на сърдечно заболяване за всеки конкретен пациент. Работата по настоящия дисертационен труд представлява само една малка част от реализирането на тази цел. Изследванията в тази насока трябва да продължат посредством разширяване на изследваните групи от пациенти и контроли, увеличение на броя на изследваните маркери, което ще даде възможност да се осъществи един по-задълбочен анализ и последваща интерпретация на получените резултати. Въпреки продължаващите проучвания в тази насока, е необходимо време и още много задълбочени изследвания преди генетичната информация да придобие значима стойност за подобряване на оценката на риска при индивиди с АХ и ИБС.

Генетичните фактори оказват съществено влияние върху риска от развитие на АХ и ИБС, отчасти чрез тяхното влияние върху конвенционалните рискови фактори. Съществуват важни теоретични предимства за предсказване на риска въз основа на геномната информация [146]. Използването на генетични биомаркери за оценка на риска е по-ясно в сравнение с използването на не-генетични такива, защото генетичните фактори могат да бъдат определени с изключително голяма точност и не се променят с течение на времето и могат да се установят само веднъж, и това може да бъде в началото на живота, докато останалите конвенционални рискови фактори варират в голяма степен. Това позволява промяната в начина на живот и прилагането на необходимите инвазивни и неинвазивни интервенции да започнат по-рано и с по-висок потенциал за проява на положителния им ефект върху развитието на заболяването. Друго предимство на генетичната информация е, че множество генетични маркери могат да бъдат определени едновременно в една и съща проба, докато при по-голямата част от конвенционалните биомаркери това не е възможно [146].

Генетичните проучвания представляват интересен подход, който може да подпомогне по-доброто разбиране на етиопатогенезата на многофакторните заболявания и евентуално да позволи по-добра идентификация на високорисковите индивиди. Данните, публикувани до момента, обаче не подкрепят въвеждането в клиничната практика на рутинни изследвания за генетични маркери

при всички болни с ИБС или ИМ. При специфични групи пациенти, например млади болни, при които липсват конвенционални рискови фактори за този тип заболявания, генетичните фактори най-вероятно имат значително по-голямо влияние върху сърдечно-съдовия риск [147].

Друга задача на нашето проучване беше да се установят основните генетични фактори, оказващи влияние върху ефикасността от терапията с клопидогрел след тромбоза на стента в българското население. Като начало беше проучена ролята на три базови замени в гените *CYP2C19* и *CYP3A5*, като само носителството на нефункционален алел *CYP2C19\*2* показва съществено влияние върху антитромбоцитния ефект на антиагреганта. Необходими са по-задълбочени анализи в по-голяма група от пациенти с оглед определяне на влиянието на полиморфен вариант *CYP2C19\*17* върху терапията с медикамента като се имат предвид получените в настоящото изследване резултати при подгруповия анализ на пациентите. Поради сериозността на проблема, свързан с възникване на тромбоза на стента при пациенти, подложени на ПКИ, е необходимо да се оцени ефекта и на други генетични фактори, които вероятно оказват влияние върху ефикасността от терапията с КЛД. Поради тази причина ние се насочихме към изследване на други полиморфни замени в гени, чиито продукти участват в патофизиологията на ССЗ и АХ. Бяха установени, нови, неописвани в литературата асоциации, които е необходимо да бъдат валидирани в независима група от болни с повишен риск от тромбози, за да се провери тяхната достоверност.

Освен това, чрез работата по настоящия дисертационен труд бяха идентифицирани основните генетични детерминанти, имащи отношение към дозирането на индиректния антикоагулант аценокумарол. Беше потвърдена ролята на полиморфизмите в гените *CYP2C9* и *VKORC1*, като на базата на получените резултати беше генериран фармакогенетичен модел (уравнение) за определяне на оптималната доза медикамент при пристъпване към антикоагулантно лечение. Въпросният модел обяснява по – малко от 50% от вариабилността в дозата медикамент, което предполага участието и на други фактори (клинични и фармакогенетични) при дозирането на аценокумарол. Прилагането на така създадения фармакогенетичен алгоритъм би улеснил прецизирането на провежданата антикоагулантна терапия, като ще подпомогне и отдиференцирането на онези пациенти, които са с повишен риск за развитие на хеморагии или тромбози. Разбира се, тази част от научното изследване има и своите недостатъци, като например малката група от пациенти с повишен риск от тромбози, която е анализирана. Разширяването на изследваната група би подпомогнало прецизирането на създадения фармакогенетичен модел и последващата антикоагулантна терапия.

Като заключение би могло да се каже, че проведените в настоящия дисертационен труд изследвания са пилотни и работата в тази насока трябва да продължи и за в бъдеще.

## 6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

### 5.1. Изводи

- 6.1.1** Разпределението на алелните и генотипни честоти за фармакогенетичните полиморфни варианти *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*17*, *VKORC1\*2A*, *\*2B*, *\*3*, *\*4* и *APOE* в контролната група от популационни контроли са близки до честотите, докладвани за други европейски популации.
- 6.1.2** Носителството на поне един алел със загуба на функция *CYP2C19\*2*, определящ слаб метаболизиращ фенотип, предразполага към липсващ или недостатъчен отговор към терапията с клопидогрел и по-бавно достигане на инхибиране на тромбоцитната активация.
- 6.1.3** Полиморфен вариант *CYP2C19\*2* обяснява между 5 и 20% от вариабилността в отговора при терапия с клопидогрел и е необходимо търсенето на нови генетични маркери, имащи отношение към лечението с този медикамент.
- 6.1.4** Генотипизирането на полиморфния вариант *CYP2C19\*2*, както и функционалните тромбоцитни тестове, биха могли да ръководят антитромботичната терапия в съответствие с индивидуалните нужди на всеки пациент.
- 6.1.5** Възрастта е независим клиничен фактор, който оказва влияние върху определянето на оптималната доза антикоагулант при български пациенти, като се свързва с изискването на по-ниски дози аценокумарол.
- 6.1.6** Полиморфизмите *CYP2C9\*2/\*3* и *VKORC1\*2A* обясняват най-голяма част от измененията в необходимата доза аценокумарол при изследваната група от пациенти с повишен риск от тромбози (съответно 10.1% и 26.8%)
- 6.1.7** Полиморфните варианти *VKORC1\*2A*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* са основните независими генетични фактори, които се свързват с изискването на по-ниски дози аценокумарол при рискови пациенти.
- 6.1.8** Полиморфният вариант rs7294 (хаплотип *VKORC1\*3*) е основният независим генетичен фактор, който се свързва с необходимостта от по-високи дози медикамент и който обяснява 12,2% от вариабилността в оптималната доза аценокумарол при български пациенти.
- 6.1.9** Комбинираното носителство на генотипи *CYP2C9\*2/\*3* и *VKORC1\*2A/\*2A* води до значителна редукция в оптималната доза аценокумарол и е свързано с повишена чувствителност към терапията с медикамента. Това определя необходимостта от по-внимателно дозиране при тези пациенти.
- 6.1.10** Отдиференцирането на пациентите, носители на полиморфни варианти *CYP2C9\*2/\*3* и *VKORC1-1639A*, би спомогнало за предотвратяване и/или намаляване на честотата на кръвоизливите и тромботичните усложнения по време на антикоагулантната терапия с аценокумарол.
- 6.1.11** Създаденият фармакогенетичен модел обяснява само част от вариабилността в дозата аценокумарол ( $R^2=43.8\%$ ). Отговорът към лекарствена терапия с този медикамент се дължи на едновременното влияние на клинични, патофизиологични и генетични фактори, което определя комплексния му характер и необходимостта от индивидуализиране на терапията при всеки пациент.
- 6.1.12** При валидирането на фармакогенетичния модел с най-голяма точност бяха определени средните (2-3 мг.) и изключително ниските (1 мг/ден и по-малко) дози аценокумарол, което е изключително важно за пациентите, показващи повишена чувствителност към антикоагулантната терапия.

- 6.1.13 Резултатите от получените асоциации потвърждават съществуването на общи патофизиологични и молекулни механизми за артериална хипертония и ИБС.
- 6.1.14 Наблюдава се значително влияние на пола при установените асоциации като по-често положителни такива се срещат при представителите от мъжки пол.
- 6.1.15 Чрез изследване на статистическата епистаза са идентифицирани взаимодействия между алелите на няколко кандидат - гена, които могат да бъдат основа за бъдещи изследвания.

## 6.2 Приноси

### 6.2.1. Приноси с научно – фундаментален характер

- 6.2.1.1 Определени са алелните и генотипни честоти за фармакогенетичните варианти *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*17*, *VKORC1\*2A*, *\*2B*, *\*3*, *\*4* и *APOE* в българската популация.
- 6.2.1.2 Поставено е началото на фармакогенетичните изследвания, свързани с отговора към лекарствена терапия с клопидогрел.
- 6.2.1.3 Разширени са проучванията във връзка с фармакогенетичния отговор към лекарствена терапия с аценокумарол като са изследвани допълнителни генетични варианти, показали асоциация с терапевтичната доза при други популационни групи.
- 6.2.1.4 Установени са нови полиморфни варианти в или в близост до гените и хромозомни райони *IL6R*, *ADIPOQ*, *PHACTR1*, *NPR3- C5orf23*, *eNOS*, *APOE*, *LEP* и *9p21*, които показват връзка с терапевтичния отговор при лечение с клопидогрел.

### 6.2.2. Приноси с научно - приложен характер

- 6.2.2.1 Създадена е ДНК биобанка от български пациенти със сърдечно-съдови заболявания и с повишен риск от тромбози.
- 6.2.2.2 Създаден и валидиран е фармакогенетичен модел за определяне на първоначалната и/или поддържаща дози аценокумарол при български пациенти.

### 6.2.3. Приноси с методичен характер

- 6.2.3.1 Оптимизирани са молекулярни - генетични методи (високорезолютивно топене на двойноверижната структура на ДНК) за определяне на генотипа на изследваните полиморфни варианти в гените *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *APOE* и *CYP3A5*, които биха спомогнали за въвеждането им в рутинната диагностична практика. Това ще помогне за лесно и бързо определяне на типа метаболитатор на базата на генотипа и подобряване на ефективността при лечение с аценокумарол и клопидогрел.

### 6.2.4. Приноси с потвърдителен характер

- 6.2.4.1 Потвърдена е връзката между носителството на полиморфен вариант *CYP2C19\*2*, определящ слаб метаболизиращ фенотип, и недостатъчния или липсващ отговор към приложената антиагрегантна терапия с клопидогрел.
- 6.2.4.2 Потвърдена е връзката на полиморфните варианти в гените *VKORC1* и *CYP2C9* с оптималната доза аценокумарол при български пациенти с повишен риск от тромбози.
- 6.2.4.3 Потвърдена е връзката между възрастта и изискването на по-ниски дози антикоагулант при възрастни пациенти.
- 6.2.4.4 Анализирани са 29 бр. полиморфни варианта в общо 20 гена и хромозомни района от геномни асоциативни проучвания и е потвърдена ролята на някои от тях с риска за развитие на исхемична болест на сърцето, миокарден инфаркт и/или артериална хипертония, както и със стойностите на артериалното налягане и нива на липиди, при българи.

## 7. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА

- [1] Allender S SP, Peto V, et al. European Cardiovascular disease statistics. 2008 Edition. British Heart Foundation Health Promotion research Group. Oxford ed 2008.
- [2] Sophie Petersen VPAMR, ed. European cardiovascular disease statistics British Heart Foundation Health Promotion Research Group Department of Public Health, University of Oxford ed 2005.
- [3] European Cardiovascular disease statistics-British Heart Foundation and European Heart Network 2005.
- [4] Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, 3rd, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *Jama*. 2011 Nov 23;306(20):2221-8.
- [5] Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganey VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *J Clin Pharm Ther*. 2007 Dec;32(6):641-9.
- [6] Liu Y, Zhong SL, Tan HH, Yang M, Fei HW, Yu XY, et al. [Impact of CYP2C9 and VKORC1 polymorphism on warfarin response during initiation of therapy]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*. 2011 Oct;39(10):929-35.
- [7] Shalia KK, Doshi SM, Parikh S, Pawar PP, Divekar SS, Varma SP, et al. Prevalence of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms in Indian population and its effect on warfarin response. *J Assoc Physicians India*. 2012 Dec;60:34-8.
- [8] van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJ, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *European heart journal*. 2011 Aug;32(15):1909-17.
- [9] Wolkanin-Bartnik J, Pogorzelska H, Szperl M, Bartnik A, Koziarek J, Bilinska ZT. Impact of genetic and clinical factors on dose requirements and quality of anticoagulation therapy in Polish patients receiving acenocoumarol: dosing calculation algorithm. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Nov;23(11):611-8.
- [10] Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS one*. 2012;7(5):e37844.
- [11] Pop TR, Vesa SC, Trifa AP, Crisan S, Buzoianu AD. An acenocoumarol dose algorithm based on a South-Eastern European population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013 Jun 18.
- [12] Markatos CN, Grouzi E, Politou M, Gialeraki A, Merkouri E, Panagou I, et al. VKORC1 and CYP2C9 allelic variants influence acenocoumarol dose requirements in Greek patients. *Pharmacogenomics*. 2008 Nov;9(11):1631-8.
- [13] Krishna Kumar D, Madhan S, Balachander J, Sai Chandran BV, Thamijarassy B, Adithan C. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms on mean daily maintenance dose of acenocoumarol in South Indian patients. *Thrombosis research*. 2013 Apr;131(4):363-7.
- [14] Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Anton AI, Perez-Andreu V, Garcia-Barbera N, Martinez AB, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thrombosis and haemostasis*. 2013 Jan;109(1):146-53.
- [15] Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, Lorenzo A, Campos A, Munoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS one*. 2012;7(7):e41360.
- [16] Gaziano TA, Bitton A, Anand S, Abrahams-Gessel S, Murphy A. Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Current problems in cardiology*. 2006 Feb;35(2):72-115.
- [17] Cabrera CP, Ng FL, Warren HR, Barnes MR, Munroe PB, Caulfield MJ. Exploring hypertension genome-wide association studies findings and impact on pathophysiology, pathways, and pharmacogenetics. *Wiley interdisciplinary reviews*. 2015 Mar;7(2):73-90.
- [18] Roberts R. Genetics of coronary artery disease: an update. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. 2014 Jan-Mar;10(1):7-12.
- [19] Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005 Jan 15;433(2):413-20.
- [20] Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007 May;17(5):349-58.
- [21] Nilsson BO. Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes. *Inflamm Res*. 2007 Jul;56(7):269-73.
- [22] Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol*. 1994 Sep;9(5):619-26.
- [23] Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*. 2003 Aug;144(8):3382-98.
- [24] Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci*. 2011 Dec;124(2):261-77.
- [25] Narahariseti SB, Lin YS, Rieder MJ, Marcianti KD, Psaty BM, Thummel KE, et al. Human liver expression of CYP2C8: gender, age, and genotype effects. *Drug Metab Dispos*. 2010 Jun;38(6):889-93.
- [26] Wu SN, Zhang Y, Gardner CO, Chen Q, Li Y, Wang GL, et al. Evidence for association of polymorphisms in CYP2J2 and susceptibility to essential hypertension. *Annals of human genetics*. 2007 Jul;71(Pt 4):519-25.
- [27] Heo SG, Hwang JY, Uhm S, Go MJ, Oh B, Lee JY, et al. Male-specific genetic effect on hypertension and metabolic disorders. *Hum Genet*. 2014 Mar;133(3):311-9.
- [28] Dhanachandra Singh K, Jajodia A, Kaur H, Kukreti R, Karthikeyan M. Gender specific association of RAS gene polymorphism with essential hypertension: a case-control study. *Biomed Res Int*. 2014;2014:538053.
- [29] Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem*. 2003 Mar;84(6):1215-36.
- [30] Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2002 Mar 15;155(6):487-95.
- [31] Gamboa R, Huesca-Gomez C, Perez-Mendez O, Cruz-Robles D, Fragoso JM, Juarez-Cedillo T, et al. Apolipoprotein E polymorphisms in Mexican patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(4):481-5.
- [32] Grammer TB, Hoffmann MM, Renner W, Kleber ME, Winkelmann BR, Bohm BO, et al. Apolipoprotein E genotypes, circulating C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. Apr;215(2):487-93.

- [33] Graner M, Kahri J, Varpula M, Salonen RM, Nyssonen K, Jauhiainen M, et al. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both carotid and coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 May;18(4):271-7.
- [34] Heidari MM, Foruzannia SK, Khatami M, Hadadzadeh M, Emami Meybodi M. Apolipoprotein e gene polymorphism in Iranian coronary atherosclerosis patients candidate for coronary artery bypass graft. *Iranian journal of basic medical sciences*. Jul;16(7):841-4.
- [35] Kharrazi H, Vaisi Raygani A, Sabokroh AR, Pourmotabbed T. Association between apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease in the Kermanshah population in Iran. *Clinical biochemistry*. 2006 Jun;39(6):613-6.
- [36] Kumar NT, Liestol K, Loberg EM, Reims HM, Brorson SH, Maehlen J. The apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular diseases--an autopsy study. *Cardiovasc Pathol*. Nov-Dec;21(6):461-9.
- [37] Lenzen HJ, Assmann G, Buchwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clinical chemistry*. 1986 May;32(5):778-81.
- [38] Schmitz F, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Erdmann J, Hoffmann R, et al. Robust association of the APOE epsilon4 allele with premature myocardial infarction especially in patients without hypercholesterolaemia: the Aachen study. *European journal of clinical investigation*. 2007 Feb;37(2):106-8.
- [39] Yang SL, He BX, Liu HL, He ZY, Zhang H, Luo JP, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms and risk for coronary artery disease in Chinese Xinjiang Uygur and Han population. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hseh k'o hseh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences*. 2004 Jun;19(2):150-4.
- [40] Yin YW, Sun QQ, Zhang BB, Hu AM, Liu HL, Wang Q, et al. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of coronary artery disease in Chinese population: evidence from a meta-analysis of 40 studies. *PLoS one*. 8(6):e66924.
- [41] Zhang MD, Gu W, Qiao SB, Zhu EJ, Zhao QM, Lv SZ. Apolipoprotein E gene polymorphism and risk for coronary heart disease in the Chinese population: a meta-analysis of 61 studies including 6634 cases and 6393 controls. *PLoS one*. 9(4):e95463.
- [42] Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambui Health Aging Study (BHAS). *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2008 Feb;41(2):89-94.
- [43] Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Human molecular genetics*. 2009 Jun 15;18(12):2288-96.
- [44] Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2157-63.
- [45] Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat*. 2012 Feb;33(2):402-10.
- [46] Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, et al. Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation. *Hypertension*. 2012 Apr;59(4):854-60.
- [47] LeBoeuf A, Mac-Way F, Utescu MS, De Serres SA, Douville P, Desmeules S, et al. Impact of dialysate calcium concentration on the progression of aortic stiffness in patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Nov;26(11):3695-701.
- [48] Wang Y, Zhang Y, Li Y, Zhou X, Wang X, Gao P, et al. Common variants in the ATP2B1 gene are associated with hypertension and arterial stiffness in Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2013 Oct 19.
- [49] Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovascular research*. 2007 Jul 15;75(2):247-60.
- [50] Hager J, Kamatani Y, Cazier JB, Youhanna S, Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, et al. Genome-wide association study in a Lebanese cohort confirms PHACTR1 as a major determinant of coronary artery stenosis. *PLoS one*. 2012;7(6):e38663.
- [51] Roberts R, Stewart AF. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. *Clin Chem*. 2012 Jan;58(1):104-12.
- [52] Abdullah KG, Li L, Shen GQ, Hu Y, Yang Y, MacKinlay KG, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). *Ann Hum Genet*. 2008 Sep;72(Pt 5):654-7.
- [53] Chen Z, Qian Q, Ma G, Wang J, Zhang X, Feng Y, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep*. 2009 May;36(5):889-93.
- [54] Shen GQ, Rao S, Martinelli N, Li L, Olivieri O, Corrocher R, et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet*. 2008;53(2):144-50.
- [55] Shen GQ, Li L, Rao S, Abdullah KG, Ban JM, Lee BS, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Feb;28(2):360-5.
- [56] Ding H, Xu Y, Wang X, Wang Q, Zhang L, Tu Y, et al. 9p21 is a shared susceptibility locus strongly for coronary artery disease and weakly for ischemic stroke in Chinese Han population. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Aug;2(4):338-46.
- [57] Lin HF, Tsai PC, Liao YC, Lin TH, Tai CT, Juo SH, et al. Chromosome 9p21 genetic variants are associated with myocardial infarction but not with ischemic stroke in a Taiwanese population. *J Investig Med*. 2011 Aug;59(6):926-30.
- [58] Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Feb;32(2):196-206.
- [59] Low SK, Takahashi A, Cha PC, Zembutsu H, Kamatani N, Kubo M, et al. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. *Human molecular genetics*. 2012 May 1;21(9):2102-10.
- [60] Olsson S, Csajbok LZ, Jood K, Nysten K, Nellgard B, Jern C. Association between genetic variation on chromosome 9p21 and aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011 Apr;82(4):384-8.
- [61] Thompson AR, Golledge J, Cooper JA, Hafez H, Norman PE, Humphries SE. 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 Mar;17(3):391-4.
- [62] Bown MJ, Braund PS, Thompson J, London NJ, Samani NJ, Sayers RD. Association between the coronary artery disease risk locus on chromosome 9p21.3 and abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008 Oct;1(1):39-42.
- [63] Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdottir S, Steinthorsdottir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature genetics*. 2008 Feb;40(2):217-24.
- [64] Patel RS, Su S, Neeland IJ, Ahuja A, Veledar E, Zhao J, et al. The chromosome 9p21 risk locus is associated with angiographic severity and progression of coronary artery disease. *European heart journal*. Dec;31(24):3017-23.
- [65] Ardissino D, Berzuini C, Merlini PA, Mannucci Mannucci P, Surti A, Burti N, et al. Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. Jul 19;58(4):426-34.
- [66] Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature*. Feb 10;470(7333):264-8.
- [67] Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology. *Journal of lipid research*. 2008 Jul;49(7):1595-9.

- [68] Lambert G, Charlton F, Rye KA, Piper DE. Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis*. 2009 Mar;203(1):1-7.
- [69] Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, et al. Association of a GNAS1 gene variant with hypertension and diabetes mellitus. *Hypertens Res*. 2004 Dec;27(12):919-24.
- [70] Chen Y, Nakura J, Jin JJ, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, et al. Association of the GNAS1 gene variant with hypertension is dependent on alcohol consumption. *Hypertens Res*. 2003 Jun;26(6):439-44.
- [71] Biswas J, Islam MA, Rudra S, Haque MA, Bhuiyan ZR, Husain M, et al. Relationship between blood groups and coronary artery disease. *Mymensingh Med J*. 2008 Jul;17(2 Suppl):S22-7.
- [72] Shivani Vats VSaAB. Genetic Links between Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes 2013.
- [73] Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2012 Jan;45(1):25-33.
- [74] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):747-53.
- [75] Mackay TF. The genetic architecture of quantitative traits. *Annu Rev Genet*. 2001;35:303-39.
- [76] Segre D, Deluna A, Church GM, Kishony R. Modular epistasis in yeast metabolism. *Nat Genet*. 2005 Jan;37(1):77-83.
- [77] Shimomura K, Low-Zeddies SS, King DP, Steeves TD, Whiteley A, Kushla J, et al. Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Res*. 2001 Jun;11(6):959-80.
- [78] Ma L, Ballantyne CM, Belmont JW, Keinan A, Brautbar A. Interaction between SNPs in the RXRA and near ANGPTL3 gene region inhibits apoB reduction after statin-fenofibric acid therapy in individuals with mixed dyslipidemia. *J Lipid Res*. 2012 Nov;53(11):2425-8.
- [79] Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet*. 2009 Jun;10(6):392-404.
- [80] Marchini J, Donnelly P, Cardon LR. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet*. 2005 Apr;37(4):413-7.
- [81] Саръева Р. Изследване на полиморфни варианти в гени за ксенобиотик метаболизиращи ензими и гликопротеин-Р: асоциация с балканска ендемична нефропатия и с отговор към лекарствена терапия с аценокумарол Дисертация за образователна и научна степен „Доктор“. 2008;Медицински университет - София.
- [82] Smires FZ, Habbal R, Moreau C, Assaidi A, Lorient MA, Nadifi S. Effect of different genetics variants: CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 of cytochrome P-450 CYP2C9 and 1639G>A of the VKORC1 gene; On acenocoumarol requirement in Moroccan patients. *Pathologie-biologie*. 2013 Jun;61(3):88-92.
- [83] Smires FZ, Moreau C, Habbal R, Siguret V, Fadili S, Golmard JL, et al. Influence of genetics and non-genetic factors on acenocoumarol maintenance dose requirement in Moroccan patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2012 Oct;37(5):594-8.
- [84] Buzoianu AD, Militaru FC, Vesa SC, Trifa AP, Crisan S. The impact of the CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on acenocoumarol dose requirements in a Romanian population. *Blood cells, molecules & diseases*. 2013 Mar;50(3):166-70.
- [85] Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008 Sep;84(3):326-31.
- [86] Tham LS, Goh BC, Nafziger A, Guo JY, Wang LZ, Soong R, et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006 Oct;80(4):346-55.
- [87] Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *The New England journal of medicine*. 2013 Dec 12;369(24):2283-93.
- [88] Verhoef TI, Ragia G, de Boer A, Barallon R, Kolovou G, Kolovou V, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *The New England journal of medicine*. 2013 Dec 12;369(24):2304-12.
- [89] Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *The New England journal of medicine*. 2013 Dec 12;369(24):2294-303.
- [90] Eckman MH, Rosand J, Greenberg SM, Gage BF. Cost-effectiveness of using pharmacogenetic information in warfarin dosing for patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of internal medicine*. 2009 Jan 20;150(2):73-83.
- [91] You JH, Tsui KK, Wong RS, Cheng G. Potential clinical and economic outcomes of CYP2C9 and VKORC1 genotype-guided dosing in patients starting warfarin therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009 Nov;86(5):540-7.
- [92] Meckley LM, Gudgeon JM, Anderson JL, Williams MS, Veenstra DL. A policy model to evaluate the benefits, risks and costs of warfarin pharmacogenomic testing. *Pharmacoeconomics*. 2010;28(1):61-74.
- [93] Паскалева И, Динева, Д., Байчева, В., Цвеова, Р., Кънева, Р., Георгиев, Б. и Гочева, Н. Влияние на генетичните варианти CYP2C19\*2 и CYP2C19\*17 върху АДФ – индуцирана тромботична агрегация при пациенти на лечение с тиенопиридини. *Българска кардиология*. 2013; том XIX, № 4(Дружество на кардиолозите в България).
- [94] Cuisset T, Cayla G, Silvain J. Clopidogrel resistance: what's new? *Arch Cardiovasc Dis*. Jun-Jul;103(6-7):349-53.
- [95] Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. Feb 2;121(4):512-8.
- [96] Bhattacharyya S, Rakhit R. Cytochrome P450 2C19 polymorphism and clopidogrel after MI. *Lancet*. 2009 Apr 4;373(9670):1171; author reply 2-3.
- [97] Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *Jama*. 2009 Aug 26;302(8):849-57.
- [98] Mega JL, Close L, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 22;360(4):354-62.
- [99] Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet*. 2009 Jan 24;373(9660):309-17.
- [100] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 22;360(4):363-75.
- [101] Cuisset T, Frere C, Quilici J, Poyet R, Gaborit B, Bali L, et al. Comparison of omeprazole and pantoprazole influence on a high 150-mg clopidogrel maintenance dose the PACA (Proton Pump Inhibitors And Clopidogrel Association) prospective randomized study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009 Sep 22;54(13):1149-53.
- [102] Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, et al. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Jan 22;51(3):256-60.

- [103] Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Oct 16;50(16):1541-7.
- [104] Kassimis G, Davlouros P, Xanthopoulou I, Stavrou EF, Athanassiadou A, Alexopoulos D. CYP2C19\*2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res*. Apr;129(4):441-6.
- [105] Jeong YH, Tantry US, Kim IS, Koh JS, Kwon TJ, Park Y, et al. Effect of CYP2C19\*2 and \*3 loss-of-function alleles on platelet reactivity and adverse clinical events in East Asian acute myocardial infarction survivors treated with clopidogrel and aspirin. *Circ Cardiovasc Interv*. Dec 1;4(6):585-94.
- [106] Bauer T, Bouman HJ, van Werkum JW, Ford NF, ten Berg JM, Taubert D. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. *Bmj*.343:d4588.
- [107] Sawada T, Shinke T, Shite J, Honjo T, Haraguchi Y, Nishio R, et al. Impact of cytochrome P450 2C19\*2 polymorphism on intra-stent thrombus after drug-eluting stent implantation in Japanese patients receiving clopidogrel. *Circ J*.75(1):99-105.
- [108] Hwang SJ, Jeong YH, Kim IS, Koh JS, Kang MK, Park Y, et al. The cytochrome 2C19\*2 and \*3 alleles attenuate response to clopidogrel similarly in East Asian patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Thromb Res*. Jan;127(1):23-8.
- [109] Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, et al. Besides CYP2C19\*2, the variant allele CYP2C9\*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet Genomics*. Jan;20(1):18-25.
- [110] Akhlaghi A, Shirani S, Ziaie N, Pirhaji O, Yaran M, Shahverdi G, et al. Cytochrome P450 2C19 Polymorphism in Iranian Patients with Coronary Artery Disease. *ARYA atherosclerosis*. Fall;7(3):106-10.
- [111] Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006 Jan;79(1):103-13.
- [112] Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, Winter S, Buse V, Bischofs C, et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics*. 2008 Sep;9(9):1251-9.
- [113] Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang JI, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *Cmaj*. 2006 Jun 6;174(12):1715-22.
- [114] Musunuru K, Post WS, Herzog W, Shen H, O'Connell JR, McArdle PF, et al. Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with platelet reactivity: a potential mechanism for increased vascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Oct;3(5):445-53.
- [115] del Zoppo GJ. The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology*. 1998 Sep;51(3 Suppl 3):S9-14.
- [116] Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Antiplatelet Trialists' Collaboration*. *Bmj*. 1994 Jan 8;308(6921):81-106.
- [117] A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *CAPRIE Steering Committee*. *Lancet*. 1996 Nov 16;348(9038):1329-39.
- [118] Fardel O, Le Vee M. Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2009 Dec;5(12):1469-81.
- [119] Cressman AM, Petrovic V, Piquette-Miller M. Inflammation-mediated changes in drug transporter expression/activity: implications for therapeutic drug response. *Expert review of clinical pharmacology*. 2012 Jan;5(1):69-89.
- [120] Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Seminars in dialysis*. 2004 Nov-Dec;17(6):432-7.
- [121] Ruot B, Bechereau F, Bayle G, Breuille D, Obled C. The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Jan;102(1):107-14.
- [122] Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008 Feb;36(2):205-16.
- [123] Morgan ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009 Apr;85(4):434-8.
- [124] Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nature reviews*. 2010 Mar;9(3):215-36.
- [125] Akturk IF, Caglar FN, Erturk M, Tuncer N, Yalcin AA, Surgit O, et al. Hypertension as a risk factor for aspirin and clopidogrel resistance in patients with stable coronary artery disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014 Oct;20(7):749-54.
- [126] Randriamboavonjy V, Fleming I. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:59-65.
- [127] Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Jul 15;100(2):350-6.
- [128] Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, et al. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circulation research*. 1999 Jun 25;84(12):1416-21.
- [129] Li Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, et al. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell*. 2003 Jan 10;112(1):77-86.
- [130] Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 Sep 21;377(6546):239-42.
- [131] Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS One*. 2011;6(9):e24266.
- [132] Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension*. 2006 Oct;48(4):700-10.
- [133] Schafer A, Fraccarollo D, Pfortsch S, Loch E, Neuser J, Vogt C, et al. Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure. *Basic Res Cardiol*. May;106(3):485-94.
- [134] Saulnier PJ, Roussel R, Halimi JM, Lebrec J, Dardari D, Maimaitiming S, et al. Impact of natriuretic peptide clearance receptor (NPR3) gene variants on blood pressure in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011 May;34(5):1199-204.
- [135] Kim H, Lee HK, Han K, Jeon HK. Prevalence and risk factors for aspirin and clopidogrel resistance in patients with coronary artery disease or ischemic cerebrovascular disease. *Annals of clinical and laboratory science*. 2009 Summer;39(3):289-94.

- [136] Wang CB, Hu DY, Shi XB, Zhu ZY, Zhu JY, Yang JG. [Aspirin resistance in patients taking small dose of aspirin]. Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue = Chinese critical care medicine = Zhongguo weizhongbing jijiuyixue. 2006 Apr;18(4):219-23.
- [137] Abaci A, Caliskan M, Bayram F, Yilmaz Y, Cetin M, Unal A, et al. A new definition of aspirin non-responsiveness by platelet function analyzer-100 and its predictors. Platelets. 2006 Feb;17(1):7-13.
- [138] Kahraman G, Sahin T, Kilic T, Baytugan NZ, Agacdiken A, Ural E, et al. The frequency of aspirin resistance and its risk factors in patients with metabolic syndrome. International journal of cardiology. 2007 Feb 14;115(3):391-6.
- [139] Ozben B, Tanrikulu AM, Ozben T, Caymaz O. Aspirin resistance in hypertensive patients. Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn. 2010 Sep;12(9):714-20.
- [140] Angiolillo DJ, Suryadevara S. Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus. Best practice & research. 2009 Jun;23(3):375-88.
- [141] Enns JE, Taylor CG, Zahradka P. Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions. Journal of obesity. 2011;2011:168659.
- [142] Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in diabetes: efficacy and limitations of current treatment strategies and future directions. Diabetes care. 2009 Apr;32(4):531-40.
- [143] Cacabelos R, Martinez R, Fernandez-Novoa L, Carril JC, Lombardi V, Carrera I, et al. Genomics of Dementia: APOE- and CYP2D6-Related Pharmacogenetics. International journal of Alzheimer's disease. 2012;2012:518901.
- [144] Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. Journal of lipid research. 1989 Jun;30(6):831-40.
- [145] Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. The Journal of biological chemistry. 1997 Jan 3;272(1):89-95.
- [146] Dent TH. Predicting the risk of coronary heart disease. II: the role of novel molecular biomarkers and genetics in estimating risk, and the future of risk prediction. Atherosclerosis. Dec;213(2):352-62.
- [147] Носиков А, Савов А., Бянов К., Денчев С., Кременски И. . Възможности и перспективи за генетични проучвания при пациенти с миокарден инфаркт в България. Medinfo. 2007;брой 1.

## ИЗПОЛЗВАНИ ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ:

<http://www.nsi.bg/> (Национален статистически институт)

<http://www.puls.bg>

<http://ec.europa.eu/eurostat/help/new-eurostat-website> (Eurostat Statistics Database)

<http://directorsblog.nih.gov/high-blood-pressure-a-global-health-threat> (National Institutes of Health)

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>

<https://www.pharmgkb.org/pathway>

<http://en.wikipedia.org>

## СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

### *Публикации във връзка с дисертационния труд:*

#### **Международни списания с импакт фактор:**

**Tzveova R.**, Dimitrova-Karamfilova A., Saraeva R., Solarova T., Naydenova G., Petrova I., Hristova N., Popov I., Nachev G., Mitev V., Kaneva K. **Estimation and validation of acenocoumarol dosing algorithms in Bulgarian patients with cardiovascular diseases.** Personalized medicine **IF 1.13.**

Dimitrova-Karamfilova A., **Tzveova R.**, Chilingirova N., Goranova T., Nachev G., Mitev V., Kaneva R. **Acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithms and their application in two Bulgarian patients with extremely low anticoagulant requirements.** Biochemical genetics **IF 0.822** - under revision.

**Tzveova R.**, Naydenova G., Yaneva T., Dimitrov G., Vandeva S., Matrozova Y., Pendicheva-Duhlenka D., Popov I., Beltheva O., Naydenov C., Tarnovska-Kadreva R., Nachev G., Mitev V., Kaneva R. **Gender specific effect of CYP2C8\*3 on the risk of essential hypertension in Bulgarian patients.** Biochemical genetics **IF 0.822** - under review.

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 2.7**

#### **Специализирани български списания:**

**Р. Цвеова,** Г. Найденова, М. Цекова, Г. Начев, В. Митев. **Роля на генетичните полиморфизми в гените за инхибитора на плазминогенния активатор тип 1 (PAI1) и аполипопротеин е (APOE) при развитието на остър миокарден инфаркт.** Българска кардиология, Година XVIII, Брой № 4/2012, стр. 36-42.

**Р. Цвеова,** А. Миткова, И. Паскалева, Р. Кънева, В. Митев. **Роля на генетичните фактори при определяне на клиничната ефикасност на клопидогрел.** Сърдечно-съдови заболявания, Година XLIV, Брой № 1/2013, стр. 16-29.

**Р. Цвеова,** А. Миткова, Р. Кънева, Г. Начев, В. Митев. **Роля на геномните асоциативни проучвания за изясняване на генетичните основи на исхемичната болест на сърцето.** Сърдечно-съдови заболявания, Брой 03/2013, Година XLIV, стр. 55-64.

**Р. Цвеова,** Т. Янева, Г. Димитров, К. Найденов, Р. Търновска – Къдрева, Р. Кънева, Г. Начев, В. Митев. **Роля на геномните асоциативни проучвания за изясняване на генетичните основи на артериалната хипертония.** Сърдечно-съдови заболявания, Брой 03/2013, Година XLIV, стр. 47-54.

И. Паскалева, Д. Динева, В. Байчева, **Р. Цвеова,** Р. Кънева, Б. Георгиев, Н. Гочева. **Влияние на генетичните варианти CYP2C19\*2 и CYP2C19\*17 върху АДФ индуцирана тромбоцитна агрегация при пациенти на лечение с тиенопиридини.** Българска кардиология, Година XIX, Брой №4/2013, стр. 16-26.

Г. Найденова, **Р. Цвеова**, Г. Начев, В. Митев и Р. Кънева. **Влияние на полиморфните варианти в гена за пропротеин конвертаза субтилизин кексин тип 9 (PCSK9) върху нивата на холестерол и риска от исхемична болест на сърцето.** Сърдечно-съдови заболявания, Година XLV, Брой № 01/2014, стр. 28-36.

**Р. Цвеова**, С. Въндева, Й. Матрозова, Г. Найденова, Д. Пендичева - Духленска, А. Миткова, С. Захаријева, Г. Начев, В. Митев, Р. Кънева. **Полиморфни варианти във водещи кандидат – гени от геномни асоциативни проучвания и тяхната роля при определяне на риска от развитие на исхемична болест на сърцето - втора част.** Сърдечно-съдови заболявания, Година XLV, Брой № 02/2014, стр. 25-34.

**Р. Цвеова**, Т. Янева, Г. Димитров, Д. Пендичева - Духленска, С. Въндева, Й. Матрозова, К. Найденов, О. Белчева, А. Миткова, С. Захаријева, Р. Търновска-Къдрева, Г. Начев, В. Митев, Р. Кънева **Геномните асоциативни проучвания като съвременен подход за изясняване на генетичните основи на артериалната хипертония – част втора.** Сърдечно-съдови заболявания, Година XLV, Брой № 03/2014, стр. 25-34.

## ***Научни прояви във връзка с дисертационния труд:***

### **Участия в международни форуми:**

**Tzveova R.**, Pendicheva – Duhlenska D., Dimitrova – Karamfilova D., Solarova T., Naydenova G., Petrova I., Hristova N., Atanasov P., Andonov S., Mitkova A., Nachev G., Mitev V., Kaneva R., **Genetic polymorphisms in clopidogrel and acenocoumarol-related genes and their frequencies in South-Eastern European population**, EACPT2014, Poster presentation/ Clinical Therapeutics 08/2014; 36(8).

**Tzveova R.**, Dimitrova-Karamfilova A., Saraeva R., Solarova T., Naydenova G., Petrova I., Hristova N , Paskaleva I., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Development of a pharmacogenetic-based acenocoumarol dosing algorithm for Bulgarian patients with cardiovascular diseases.** 22nd International Congress of of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab 2014), 22-26 June 2014, Istanbul, Turkey, Poster presentation /Abstract book, 2014, page 137, Abstract № P13.

**Tzveova R.**, Naydenova G., Pendicheva D., Vandeva S., Atanasov P., Paskaleva I., Tzekova M., Kaneva R., Mitev V. **Association of Apolipoprotein E polymorphisms with coronary heart disease in Bulgarian population.** The European Human Genetics Conference, 30.05 - 03.06.2013, Milano, Italy/Eur J Hum Genet, Volume 22, Supplement 1, May 2014, P05.08-M, page 113.

**Tzveova R.**, Yaneva T., Matroзова Y., Vandeva S., Naydenova G., Pendicheva D., Tarnovska R., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Association study of APOE polymorphisms with essential hypertension in Bulgarian patients.** Artery 13, 17-19 October, London, UK, Poster presentation/ Artery Research, Volume 7, Issue 3 , Pages 133-134, September 2013, P3.27.

**Tzveova R.**, Naydenova G., Pendicheva D., Vandeva S., Atanasov P., Paskaleva I., Tzekova M., Kaneva R., Mitev V. **No evidence of association between rs7865618 in locus 9p21 and**

**coronary artery disease in Bulgarian population.** EuroThrombosis 2013, 3-5 October, Upsala, Sweden. Poster presentation /Abstract book, 2013, page 55, Abstract № P48.

**Tzveova R.**, Dimitrova – Karamfilova A., Solarova T., Petrova I., Hristova N., Naydenova G., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Cytochrome P450 (CYP2C9\*2,\*3) & vitamin-K epoxide reductase complex (VKORC1 1173C>T) gene polymorphisms & their effect on acenocoumarol dose requirement in Bulgarian patients.** 21st Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation 2013, 1st Montenegrin Conference of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 25-28 September, Budva, Montenegro. Poster presentation/ Balkan Journal of Clinical Laboratory, Supplement, vol. XXI, 13-1, September 2013, page 96, PF03.

**Tzveova R.**, Yaneva T., Matrozova Y., Vandeva S., Naydenova G., Pendicheva D., Kaneva R., Tarnovska R., Nachev G., Mitev V. **Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension in Bulgarian population.** WHC2013, 27-30 June, Istanbul, Turkey. Poster presentation/Abstract book, Abstract No: P-56.

Paskaleva I, Dineva D, Baycheva V, **Tzveova R.** Kaneva R, Gocheva N. **The Effect of Common CYP2C19 Genetic Variants on High Platelet Reactivity During Thienopyridine Therapy.** AACC Annual Meeting and Clinical Lab Expo 2013, 28 July – 1 August, Houston, USA. Poster presentation/

Naydenova G., **Tzveova R.**, Marinov M., Fiaz N., Borisova M., Yordanova – Laleva P., Atanasova A., Kaneva R., Mitev V., Nachev G. **Impact of CYP2C8\*3 and CYP2J2\*7 polymorphisms on myocardial infarction in the bulgarian population.** EuroMedLab, 19-23 May 2013, Milano, Italia, Poster presentation/, Biochimica clinica, 2013, vol. 37, SS, May 2013, W119, p. S553.

Dimitrova-Karamfilova D., **Tzveova R.**, Kratunkov P., Patokova Y., Solarova T., Petrova I., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. „**Extremely low acenocoumarol dose requirement in patients with VKORC1 A-1639A, VKORC1 T1173T, CYP2C9\*1/\*2 and CYP2C9\*1/\*3 genotypes**”, EuroMedLab, 19-23 May 2013, Milano, Italia, Poster presentation/, Biochimica clinica, 2013, vol. 37, SS, May 2013, M241, p. S206.

**Tzveova R.**, Dimitrova-Karamfilova D., Kratunkov P., Patokova Y., Solarova T., Petrova I., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. „**Allelic variants in VKORC1 and CYP2C9 influence acenocoumarol dose requirements in Bulgarian patients**”, EuroMedLab, 19-23 May 2013, Milano, Italia, Poster presentation/, Biochimica clinica, 2013, vol. 37, SS, May 2013, M247, p. S209.

**Tzveova R.**, Dimitrova – Karamfilova A., Patokova Y., Solarova T., Petrova I., Naydenova G., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Correlation between Apolipoprotein E gene polymorphisms and the dose for acenocoumarol maintenance in Bulgarian patients.** The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013, Paris, France. /Eur J Hum Genet, Volume 21, Supplement 2, June 2013, P16.001, page 379

**Tzveova R.**, Naydenova G., Tzekova M., Kaneva R., Mitev V. **The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile.** Artery 12, 18-20 October 2012, Vienna, Austria, Poster presentation/ Artery Research, Volume 6, Issue 4, December 2012, P1.41. p. 162.

Atanasova G., **Tzveova R.**, Kaneva R., Mitev V. **Association of a single nucleotide polymorphism in *CYP2C8* with myocardial infarction in Bulgarian population.** Artery 12, 18-20 October 2012, Vienna, Austria, Poster presentation/ Artery Research, Volume 6, Issue 4, December 2012, P4.20. p. 188-9.

**Tzveova R.**, Bichev S., Atanasov P., Mitkova A., Andonov S., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Allelic and genotypic frequencies of *CYP3A5*, *CYP2C19* and *VKORC1* in Bulgarian population.** The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012, Nuremberg, Germany. /Eur J Hum Genet, Volume 20, Supplement 1, June 2012, P10.56, page 260.

### **Участия в национални форуми:**

**Tzveova R.**, Beltcheva O., Naydenova G., Pendicheva D., Vandeva S., Atanasov P., Paskaleva I., Kaneva R., Mitev V. **Allelic and genotypic frequencies of polymorphic variants in *ADIPOQ* gene in Bulgarian population.** 7th International Congress on Cardiovascular Diseases (7th ICCD), 24-26 October 2013, Sofia, Bulgaria. Poster presentation.

**Tzveova R.**, Dimitrova – Karamfilova A., Solarova T., Petrova I., Hristova N., Naydenova G., Kaneva R., Nachev G., Mitev V. **Genetic polymorphisms in *CYP2C9* and *VKORC1* and their effect on the mean daily maintenance dose of acenocoumarol in Bulgarian patients with cardiovascular diseases.** XIth International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors 2013, 16-19 October 2013, Pleven, Bulgaria. Poster presentation /Abstract book, 2013, page 137, Abstract № P13, Poster section 1.

**Tzveova R.**, Naydenova G., Kaneva R., Paskaleva I., Mitev V. **Association of single nucleotide polymorphism in *CYP2C19* gene with acute coronary syndrome in Bulgarian population.** XXIII National congress of cardiology with international participation, 04-07 October 2012, Sofia, Bulgaria/ journal. Bulgarian cardiology, XVIII, 2012, supplementary №2, poster №13, p. 11.

## Резюме

Сърдечно – съдовите заболявания са основен фактор, предизвикващ временна нетрудоспособност, инвалидизация и висока смъртност в икономически развитите и много от развиващите се страни в световен мащаб, в това число и в България. От сърдечно-съдовите усложнения, тромбоемболизъмът е водеща причина за заболяемост и смъртност в следствие на миокарден инфаркт и мозъчен инсулт. Основните медикаменти, които се използват за профилактика и лечение на тромбози са антикоагулантите и тромболитните антиагреганти. От тях, аценокумарол и клопидогрел представляват златен стандарт за превенция на тромботични усложнения, като двата медикамента се различават по механизма на осъществяване на своето действие.

Независимо от широкото прилагане на антикоагулантите и антиагрегантите в клиничната практика, терапията с тези медикаменти има своите негативни страни. По отношение на терапията с клопидогрел някои пациенти показват частична или пълна резистентност към лечението, което увеличава риска от последващи сърдечно-съдови инциденти. От своя страна, индиректните антикоагуланти като варфарин и аценокумарол показват широка междуиндивидуална и междуетническа вариабилност, което затруднява ефективното им дозиране. Имено поради тези причини, целта на настоящия дисертационен труд е да определят основните фармакогенетични фактори, които имат отношение към терапията с аценокумарол и клопидогрел, и които са специфични за българската популация.

В общата група полиморфните варианти, които показваха връзка с терапевтичния отговор при лечение с КЛД са тези в или в близост до гените *CYP2C19*\*2 rs4244285 ( $p=0.001$ ), *IL6R* rs2229238 ( $p=0.036$ ), *ADIPOQ* rs1501299 ( $p=0.05$ ), *PHACTR1* rs9349379 ( $p=0.019$ ), *NPR3*, *C5orf23* rs1173771 ( $p=0.016$ ), *eNOS* rs3918226  $p=0.01$ ) и *APOE* rs7412 ( $p=0.03$ ). По-голяма част от тази тенденция се запазва в групата на мъжете с допълнение на полиморфните варианти *LEP* rs7799039 ( $p=0.04$ ) и *9p21* rs1537378 ( $p=0.01$ ), докато в групата на жените се наблюдава засилването на влиянието на полиморфната замяна в гена *IL6R* ( $p=0.0003$ ).

По отношение на аценокумарол средната дневна поддържаща доза медикамент в групата пациенти, носители на полиморфен вариант дори за един от изследваните полиморфизми (*CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3 и *VKORC1*\*2A) е значително по-ниска от средната поддържаща доза антикоагулант при пациентите с референтния алел. Носителите на референтен генотип за *CYP2C9* и *VKORC1* изискват близки дневни, поддържащи дози аценокумарол ( $3.51 \pm 2.00$  (SD) мг за *CYP2C9* \*1\*1 и  $4.01 \pm 1.89$  (SD) мг за *VKORC1*\*1/\*1). Беше установено също така, че наличието на *CYP2C9*\*1\*2 генотип води до 40.17% редукция в дозата, докато носителството на *CYP2C9*\*1\*3 води до -35.04% редукция спрямо носителите на референтни алели за съответните полиморфизми в гена *CYP2C9*. Носителите на *VKORC1*\*1/\*2A изискват 29.91% по-ниска доза, докато *VKORC1*\*2A/\*2A носителите изискват 77.21% по-ниска доза в сравнение с носителите на референтния генотип.

Методите на еднокомпонентна и многокомпонентна линейна регресия бяха приложени за оценка на основните генетични и клинични фактори и тяхното влияние върху поддържащата дневна доза аценокумарол в тестовата група от пациенти, подложени на терапия с кумаринов антикоагулант. Многокомпонентният анализ показва, че възрастта и носителството на *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3, *VKORC1*\*2A, *VKORC1*\*3 алели допринасят за 43.8% от промяната в средната дневна поддържаща доза аценокумарол.

Освен изясняване на ролята на фармакогенетичните фактори по отношение на отговора към терапия с антиагреганти и антикоагуланти, направихме опит да установим и тези генетични детерминанти, които имат протективен или рисков ефект по отношение на

развитието на тези сърдечно-съдови усложнения като исхемична болест, миокарден инфаркт и артериална хипертония. Бяха събрани и генотипирани 496 популационни контроли, 200 пациента с ИБС и 200 с АХ, като тези извадки биха могли да се приемат за представителни за България. Бяха анализирани 29 на брой полиморфни варианти в 20 гена, като беше определена ролята им по отношение на риска от развитие на трите типа заболявания.

Получените положителни асоциации е необходимо да бъдат потвърдени в по-голяма извадка от пациенти и контроли, както и в независими такива групи с цел приемане или отхварляне на установените зависимости. За първи път бяха установени и описани и епистатични взаимодействия между изследваните полиморфни варианти по отношение на влиянието им върху риска от развитие на изследваните заболявания и нивата на липиди в кръвта, както и по отношение на стойностите на систолично и диастолично артериално налягане при българи.

## Summary

Cardiovascular diseases are a major factor causing temporary disability, invalidity and high mortality rate in economically developed and many developing countries worldwide and in Bulgaria. Of cardiovascular complications, thromboembolism is a leading cause of morbidity and mortality rate due to myocardial infarction and ischemic stroke. The basic drugs used for the prophylaxis and treatment of thrombosis are anticoagulants and antiplatelet agents. Of these, acenocoumarol and clopidogrel constitute the gold standard for the prevention of thrombotic complications, such as the two drugs differ in the mechanism of their (respective) effects.

Regardless of the broad application of anticoagulants and antiplatelet agents in clinical practice, treatment with these medications has negative aspects. With regard to therapy with clopidogrel some patients showed partial or complete resistance to treatment, which increases the risk of subsequent cardiovascular events. Contrariwise, indirect anticoagulants such as warfarin and acenocoumarol show wide interindividual and interethnic variability, which affects their effective dosage. Therefore, the objective of this dissertation is to identify major pharmacogenetic factors that are relevant to therapy with acenocoumarol and clopidogrel and are specific to the Bulgarian population.

In the main group, the polymorphic variants which show a relation to the therapeutic response with clopidogrel are those in or near to genes *CYP2C19*\*2 rs4244285 ( $p = 0.001$ ), *IL6R* rs2229238 ( $p = 0.036$ ), *ADIPOQ* rs1501299 ( $p = 0.05$ ), *PHACTR1* rs9349379 ( $p = 0.019$ ), *NPR3*, *C5orf23* rs1173771 ( $p = 0.016$ ), *eNOS* rs3918226 ( $p = 0.01$ ) and *APOE* rs7412 ( $p = 0.03$ ). Most of this trend continues in the male group with an addition of polymorphic variants *LEP* rs7799039 ( $p = 0.04$ ) and 9p21 rs1537378 ( $p = 0.01$ ), whereas the female group shows a growing influence of the polymorphic gene replacement in *IL6R* ( $p = 0.0003$ ).

As for acenocoumarol, the average daily maintenance dose of the medicament in the group of patients carrying a polymorphic variant for at least one of the studied polymorphisms (*CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3 and *VKORC1*\*2A) is significantly lower than the average maintenance dose anticoagulant in patients with the reference allele. The carriers of a reference genotype for *CYP2C9* and *VKORC1* require similar daily maintenance doses of acenocoumarol ( $3.51 \pm 2.00$  (SD) mg for *CYP2C9*\*1\*1 and  $4.01 \pm 1.89$  (SD) mg of *VKORC1*\*1/\*1). It was also found that the presence of the *CYP2C9*\*1\*2 genotype results in a 40.17% reduction in the dose, while the carriage of *CYP2C9*\*1\*3 leads to -35.04% reduction compared with the carriers of reference alleles for the polymorphisms in the *CYP2C9* gene. The carriers of *VKORC1*\*1/\*2A require a 29.91% lower dose while *VKORC1*\*2A/\*2A carriers require a 77.21% lower dose compared with the reference genotype carriers.

Single-component and multilinear regression was applied to assess the basic genetic and clinical factors and their impact on the daily dose of acenocoumarol in the test group of patients undergoing therapy with coumarin anticoagulants. The Multi-component analysis showed that age and carriage of *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3, *VKORC1*\*2A, *VKORC1*\*3 alleles contribute to an alteration of 43.8% in the average daily maintenance dose of acenocoumarol.

Besides clarifying the role of pharmacogenetic factors in terms of response to therapy with antiplatelet agents and anticoagulants, we attempted to identify those genetic determinants that have protective or hazardous effect on the development of cardiovascular complications, such as coronary artery disease, myocardial infarction and hypertension. 496 population controls, 200 patients with coronary artery disease and 200 with hypertension were collected and genotyped, and these samples could be considered as representative for Bulgaria.

29 polymorphic variants were analyzed in 20 genes, and their role in the risk for developing the three types of diseases was determined.

The received positive associations need to be confirmed in a larger sample of patients and controls, as well as in independent groups for the purpose of accepting or rejecting the

established relations. We first identified and described epistatic interactions between the studied polymorphic variants in terms of their impact on the risk for the studied diseases and lipid levels in the blood, as well as the values of SBP and DBP in Bulgarians.