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

РЕНИ СТОЙОВА ЦВЕОВА

ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ СЪРДЕЧНО – СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

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:
ЧЛ. КОР. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО МИТЕВ, ДМ, ДБН
ПРОФ. Д-Р ГЕНЧО НАЧЕВ, ДМ
ДОЦ. Д-Р РАДКА КЪНЕВА, 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.

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

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 Съвета за медицинска наука на Медицински Университет – Плевен (Договор № D1/2011)

Защитата ще се състои на 01.06.2015 год. от 12.30 часа в в III-та аудиторията на Предклиничен Университетски Център (ПУЦ), Медицински Университет – София, ул. “Здраве”2

Материалите по защитата са на разположение в Център по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински университет – София, 14-ти етаж, СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. Здраве № 2 и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – София, **http://career.mu-sofia.bg/**

Посвещавам този труд на сина си Светослав – с цялата си любов!

По време на обучението ми в Медицински университет – гр. София имах възможността да работя с голям брой специалисти, които ми даваха постоянни съвети и напътствия в разработването на настоящия дисертационен труд.

На първо място изказвам най – искрени благодарности на научния си ръководител Чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев за гласуваното ми доверие и предоставената ми възможност за обучение в рамките на Центъра по молекулна медицина и Катедрата по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински университет – гр. София за дадената ми възможност да усвоя и прилагам най-съвременните подходи и методи в молекулярната биология и генетика; на научния си ръководител Проф. д-р Генчо Начев за съдействието и съветите при подбора и насочването на пациенти от УМБАЛ „Св. Екатерина" – гр.София, изследвани в настоящия дисертационен труд; на научния си ръководител Доц. д-р Радка Кънева за цялостната й подкрепа при дизайна, изработването и оформянето на настоящата дисертация, за помощта при анализа и интерпретирането на получените резултати. Едно голямо „благодаря" на всички лекари, с чиято помощ беше събрана изследваната група от пациенти. Също така изказвам най-сърдечни признателност на всички колеги от Центъра по молекулна медицина за цялостната им подкрепа и приятелство, на колегите от Лабораторията по клинична диагностика за безценните им съвети, както и на колегите си от Катедрата по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет, София, за подкрепата и съдействието при кандидатстването за научни грандове. Благодарна съм за огромната подкрепа на моето семейство, особено на съпруга си и детето си, които бяха една от основните движещи сили за изработването на настоящия труд.

Сърдечно благодаря!

СПИСЪК НА ПО-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:

Кирилица:

АДФ – аденозин дифосфат
АН – артериално налягане
АТФ – аденозин трифосфат
АХ – артериална хипертония
АЦ – аценокумарол
б.дв. - базова двойка
БМ – бавни метаболизатори
БРМ – бързи метаболизатори
БТЕ - белодробен тромбоемболизъм
ВОТА - висока остатъчна тромбоцитна агрегация
ВТЕ - венозен тромбоемболизъм
г - грам
ГИТ – гастро – интестинален тракт
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ДАН – диастоличноно артериално налягане
ДВТ - дълбока венозна тромбоза
ДКБ – Дружество на кардиолозите в България
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
дНТФи – дезоксинуклеотидтрифосфати
ЕКГ – електрокардиография
ИБС – исхемична болест на сърцето
ИТМ - индекс на телесната маса
КЛП – клопидогрел
КС – коронарен стент
М - моларен
мг - милиграм
МИ – миокарден инфаркт
мин - минута
мкл - микролитър
мл - милилитър
ММ – междинни метаболизатори
мМ - милимоларен
мРНК – матрична РНК
НАП – нестабилна ангина пекторис
НМ – нормални метаболизатори
НСТЕМИ - миокарден инфаркт без ST елевации на ЕКГ (нетрансмурален инфаркт)
ОКС – остър коронарен синдром
ПАХ - първична артериална хипертония
ПКИ - перкутанна коронарна интервенция
ПМ – предсърдно мъждене
САН – систолно артериално налягане
САП – стабилна ангина пекторис
сек. - секунда
СЗО – Световна Здравна Организация
ССЗ – сърдечно-съдови заболявания
СТЕМИ - миокарден инфаркт с ST елевации на ЕКГ (трансмурален инфаркт)
Т2ЗД – захарен диабет тип 2

Латиница:

A - аденин
ANRIL - антисенс некодираща РНК влокус INK4
ApoE - аполипопротеин Е
ARF - транскрипт на гена *CDKN2A* с алтернативна рамка на четене
AUC – площ под кривата
BLAST - basic local alignment search tool
BSA - body surface area
C – цитозин
CI - доверителен интервал
CYP- цитохром Р 450 ензими
ddH2O – двойно дестилирана вода
dNTP - дезоксирибонуклеозид три фосфати
G - гуанин
GWASs - Genome Wide Association Studies
HDL - липопротеини с висока плътност
HWE - равновесие по Харди-Вайнберг
INR – International Normalized Ratio γ-карбокси-Glu - γ-карбоксиглутаминови
LD - неравновесна скаченост
LDL – липопротеини с ниска плътност
MAF - минорна алелна честота
NCBI - National Center for Biotechnology Information
OR - odds ratio
PCR - полимеразна верижна реакция
rpm - оборота в минута
SAP - алкална фосфатаза от скарида
SNP - единични нуклеотидни полиморфизми
T – тимин
TBE – трис – боратен буфер
TE – Tris EDTA буфер
VKOR - витамин К епоксид редуктаза

Сърцето никога не спира, спре ли веднъж, спира завинаги.

Леонардо да Винчи

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ 11

1.ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 13
1.1. СЪРДЕЧНО-СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ХЕМОСТАЗА И ТРОМБОЗА 14
1.2. ФИЗИОЛОГИЧНИ МЕХАНИЗМИ НА ХЕМОСТАЗАТА 16
1.2.1. АДХЕЗИЯ, АКТИВИРАНЕ И АГРЕГАЦИЯ НА ТРОМБОЦИТИТЕ 17
1.2.2. КОАГУЛАЦИОННА КАСКАДА 18
1.3. ВИДОВЕ ТРОМБОЗИ 19
1.3.1. АРТЕРИАЛНА ТРОМБОЗА 19
1.3.2. ВЕНОЗНА ТРОМБОЗА 20
1.4. ТЕРАПЕВТИЧНИ ИНТЕРВЕНЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИЕ НА ТРОМБОЗИ 21
1.4.1. ЛЕЧЕНИЕ С ПЕРОРАЛНИ АНТИКОАГУЛАНТИ 21
1.4.2. АНТИТРОМБОТИЧНА ТЕРАПИЯ 22
1.5. ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ СЪРДЕЧНО – СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 22
1.5.1. ФАРМАКОГЕНЕТИКА НА ЛЕКАРСТВЕНИЯ ОТГОВОР ПРИ ТЕРАПИЯ С ТРОМБОЦИТНИЯ АНТИАГРЕГАНТ КЛОПИДОГРЕЛ 23
1.5.1.1. КЛОПИДОГРЕЛ 23
1.5.1.2. МЕТАБОЛИЗЪМ НА КЛОПИДОГРЕЛ 24
1.5.1.3. МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА КЛОПИДОГРЕЛ 25
1.5.1.4. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ КЛОПИДОГРЕЛ 27
1.5.1.5. ПОТЕНЦИАЛНИ МЕХАНИЗМИ ЗА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМКЛОПИДОГРЕЛ 28
1.5.1.5.1. *CYP2C19* 29
1.5.1.5.2. *CYP3A5* 31
1.5.1.5.3. *ABCB1* 31
1.5.1.5.4. *P2Y12* 32
1.5.1.5.5. *PON1* 32
1.5.1.6. КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ВАРИАБИЛНОСТТА В ОТГОВОРА КЪМ ТЕРАПИЯТА С КЛОПИДОГРЕЛ 32
1.5.2. ФАРМАКОГЕНЕТИКА НА ЛЕКАРСТВЕНИЯ ОТГОВОР ПРИ ТЕРАПИЯ С ИНДИРЕКТНИЯ АНТИКОАГУЛАНТ АЦЕНОКУМАРОЛ 33
1.5.2.1. ПОЛЗИ И НЕДОСТАТЪЦИ ПРИ ТЕРАПИЯТА С АЦЕНОКУМАРОЛ 33
1.5.2.2. МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА АЦЕНОКУМАРОЛ 34
1.5.2.3. РОЛЯ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ФАКТОРИ ПРИ ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С АЦЕНОКУМАРОЛ 35
1.5.2.3.1. *CYP2C9* 37
1.5.2.3.2. *VKORC1* 37
1.5.2.3.3. *CYP4F2* 38
1.5.2.3.4. *APOE* 38
1.5.2.3.5. *GGCX* 39
1.5.2.3.6. *CALU* 40
1.5.2.3.7. *mEH* 40
1.5.2.3.8. *MDR1* 40
1.6. ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ СЪРДЕЧНО-СЪДОВИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ 40
1.6.1. ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И ИНФАРКТ НА МИОКАРДА 40
1.6.1.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И ИНФАРКТ НА МИОКАРДА 41
1.6.2. ПЪРВИЧНА АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 43
1.6.2.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ПЪРВИЧНАТА АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 44
1.6.3. РОЛЯ НА ГЕНОМНИТЕ, АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 45
1.6.3.1. РОЛЯ НА ГЕНОМНИТЕ, АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ 46
1.6.3.2. ГЕНИ, ИМАЩИ ОТНОШЕНИЕ КЪМ РЕГУЛАЦИЯТА НА ИНСУЛИНОВАТА СЕКРЕЦИЯ, ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И РЕЗИСТЕНТНОСТ И ГЛЮКОЗНАТА ОБМЯНА 49

1.6.3.3. РОЛЯ НА ГЕНОМНИТЕ, АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 49
1.7. ОБОБЩЕНИЕ 52

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 54
2.1. ЦЕЛ 55
2.2. ЗАДАЧИ 55

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 56
3.1.КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ 57
3.1.1. ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ 57
3.1.2. ПЪРВИЧНА АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 58
3.1.3. ПАЦИЕНТИ С ПОВИШЕН РИСК ОТ ТРОМБОЗИ 59
3.1.3.1. ПАЦИЕНТИ, ПОДЛОЖЕНИ НА АНТИТРОМБОЦИТНА ТЕРАПИЯ С КЛОПИДОГРЕЛ 59
3.1.3.2. ПАЦИЕНТИ, ПОДЛОЖЕНИ НА АНТИКОАГУЛАНТНА ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ 61
3.1.4. ПОПУЛАЦИОННА ГРУПА ОТ ЗДРАВИ ИНДИВИДИ С БЪЛГАРСКИ ПРОИЗХОД БЕЗ ДАННИ ЗА СЪРДЕЧНО - СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 63
3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ 64
3.2.1. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ 64
3.2.1.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ 64
3.2.1.1.1. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ЧРЕЗ ИЗСОЛВАНЕ НА БЕЛТЪЦИ (МЕТОД НА MILLER ET AL., 1988) 64
3.2.1.1.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ПО МЕТОДА НА ФЕНОЛНА ЕКСТРАКЦИЯ 66
3.2.1.1.3. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ЧРЕЗ ПОЛУАВТАМАТИЗИРАНА СИСТЕМА CHEMAGIC MAGNETICSEPARATION MODULE I (CHEMAGEN) 67
3.2.1.2. ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО И КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ИЗОЛИРАНАТА ДНК 69
3.3. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА ПОЛУЧЕНАТА ДНК 70
3.3.1. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (POLYMERASE CHAIN REACTION) 70
3.3.1.2. ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА 75
3.3.2. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ТОПЕНЕ НА ДНК С ВИСОКА РЕЗОЛЮЦИЯ(HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS, HRMA) 76
3.3.3. ГЕНОТИПИРАНЕ ЧРЕЗ 7900 HT FAST REAL-TIME PCR (APPLIED BIOSYSTEMS) 77
3.3.4. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ 81
3.4. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ 83
3.4.1. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТИ 84
3.4.2. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ХЕТЕРОЗИГОТНОСТ 85
3.4.3. ЗАКОН НА ХАРДИ-ВАЙНБЕРГ 85
3.4.5. НЕРАВНОВЕСНА СКАЧЕНОСТ 86
3.4.6. ОСНОВНИ ЕТАПИ НА ПРОВЕРКА НА СТАТИСТИЧЕСКИ ХИПОТЕЗИ 86
3.4.6.1. ФОРМУЛИРАНЕ НА НУЛЕВАТА (H_0) И АЛТЕРНАТИВНАТА (H_1) ХИПОТЕЗА 86
3.4.6.2. ИЗБОР НА ТЕСТ ЗА ПРОВЕРКА НА ХИПОТЕЗАТА 86
3.4.7. МЕТОД χ^2 (ХИ-КВАДРАТ) 87
3.4.8. ТЕСТ НА ФИШЕР (FISHER'S TEST) 88
3.4.9. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА OR (СЪОТНОШЕНИЕ НА ВЕРОЯТНОСТИТЕ) 88
3.4.10. КОРЕКЦИЯ ПРИ МНОЖЕСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ 89
3.4.11. ТЕСТОВЕ ЗА ПРОМЕНЛИВИ С МНОЖЕСТВО ИЗМЕРВАНИЯ. ТЕСТ НА МАН-УИТНИ (MANN-WHITNEY) 89
3.4.12. КОРЕЛАЦИОННИ АНАЛИЗИ 90
3.4.12.1. КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ НА ПИЪРСЪН (PEARSON) 90
3.4.12.2. КОРЕЛАЦИОНЕН КОЕФИЦИЕНТ НА СПИЪРМАН (SPEARMANN) 91
3.4.13. ЕДНОКОМПОНЕНТЕН И МНОГОКОМПОНЕНТЕН РЕГРЕСИОНЕН АНАЛИЗ 91
3.4.14. ГРАФИЧНО ПРЕДСТАВЯНЕ НА ДАННИТЕ ЧРЕЗ ХИСТОГРАМИ 92
3.4.15. СРАВНЕНИЕ НА СРЕДНИТЕ СТОЙНОСТИ 93
3.4.15. 1. STUDENT'S T ТЕСТ АНАЛИЗ 93

3.4.15. 2. ДИСПЕРСИОНЕН АНАЛИЗ (ONE-WAY ANOVA) 94

4. РЕЗУЛТАТИ 95
4.1. СИСТЕМЕН ХОД НА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗ 96
4.2. ОПТИМИЗИРАНЕ И ВЪВЕЖДАНЕ НА ДНК-МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ФАРМАГОГЕНЕТИЧНИ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ CYP2C9, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* И *APOE* 98
4.3. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *VKORC1* И *APOE* В БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ 100
4.4. 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 ПРИ ЕВРОПЕЙСКИ ПОПУЛАЦИИ 106
4.5. ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С АНТИТРОМБОЦИТНИЯ МЕДИКАМЕНТ КЛОПИДОГРЕЛ 108
4.5.1. СИСТЕМЕН ХОД НА АНАЛИЗА И ПОДБОР НА ПАЦИЕНТИ 108
4.5.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АДФ – ИНДУЦИРАНАТА ТРОМБОЦИТНА АГРЕГАЦИЯ ЧРЕЗ МНОЖЕСТВЕНА, ИМПЕДАНСНА АГРЕГОМЕТРИЯ НА АНАЛИЗАТОР MULTIPLATE 109
4.5.3. АНАЛИЗ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕТО И ЧЕСТОТАТА НА ПАНЕЛ ОТ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГРУПИТЕ ПАЦИЕНТИ, ПОКАЗВАЩИ РАЗЛИЧЕН ОТГОВОР КЪМ ТЕРАПИЯТА С КЛОПИДОГРЕЛ 110
4.6. ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ НА АНТИКОАГУЛАНТНАТА ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ 117
4.6.1. СИСТЕМЕН ХОД НА АНАЛИЗА И ПОДБОР НА ПАЦИЕНТИ 117
4.6.2. 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 118
4.6.3. АНАЛИЗ НА ЗНАЧЕНИЕТО НА КЛИНИЧНИТЕ ФАКТОРИ И ИЗСЛЕДВАНИТЕ ВАРИАНТИ В ГЕНИТЕ *CYP2C9*, *VKORC1* И *APOE* ВЪРХУ ОТГОВОРА КЪМ ЛЕКАРСТВЕНА ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ 119
4.6.4. СЪЗДАВАНЕ НА ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОПТИМАЛНАТА ДОЗА АЦЕНОКУМАРОЛ 124
4.6.5. ВАЛИДИРАНЕ НА СЪЗДАДЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ В НЕЗАВИСИМА ГРУПА ОТ ПАЦИЕНТИ С ПОВИШЕН РИСК ОТ ТРОМБОЗИ 126
4.6.6. СРАВНЕНИЕ НА СЪЗДАДЕНИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕН МОДЕЛ С АЛГОРИТМИ ЗА ДРУГИ ПОПУЛАЦИОННИ ГРУПИ 127
4.7. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ СЪРДЕЧНО-СЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 130
4.7.1. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 132
4.7.2. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ВОДЕЩИ КАНДИДАТ – ГЕНИ И РИСКА ОТ ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ 135
4.7.3. АНАЛИЗ НА ЕПИСТАТИЧНИТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ПО ОТНОШЕНИЕ НА РИСКА ЗА РАЗВИТИЕ НА ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ, МИОКАРДЕН ИНФАРКТ И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ 149
4.7.4. АНАЛИЗ НА ВЛИЯНИЕТО НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ВЪРХУ СТОЙНОСТИТЕ НА СИСТОЛИЧНО И ДИАСТОЛИЧНО АРТЕРИАЛНО НАЛЯГАНЕ И НИВАТА НА ЛИПИДИ 150
4.7.5. АНАЛИЗ НА ЕПИСТАТИЧНИТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ПО ОТНОШЕНИЕ НА СТОЙНОСТИТЕ НА СИСТОЛИЧНО И ДИАСТОЛИЧНО АРТЕРИАЛНО НАЛЯГАНЕ И НИВАТА НА ЛИПИДИ В КРЪВТА 152
4.7.6. ХАПЛОТИПЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ЛОКУС 9p21 И АСОЦИАЦИЯТА ИМ С ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ 153

5. ОБСЪЖДАНЕ 155
5.1. АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ, ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО И МИОКАРДЕН ИНФАРКТ 156
5.1.1. *CYP2J2 / CYP2C8* 157
5.1.2. *APOE* 158

5.1.3. *CDH13* 159
5.1.4. *ATP2B1* 160
5.1.5. *PHACTR1* 161
5.1.6. *ЛОКУС 9p21* 162
5.1.7. *PCSK9* 164
5.1.8. *GNAS* И *EDN3* 165
5.1.9. *ABO* 166
5.1.10. ГЕНИ, СВЪРЗАНИ С ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНИЕ КЪМ ДИАБЕТ 166
5.1.11. СТАТИСТИЧЕСКА ЕПИСТАЗА 171
5.2. ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С АЦЕНОКУМАРОЛ 172
5.3. ОПТИМИЗИРАНЕ НА ТЕРАПИЯТА С КЛОПИДОГРЕЛ 177
5.3.1. *ЛОКУС 9p21* 181
5.3.2. *IL6R* 182
5.3.3. *eNOS* 183
5.3.4. *NPR3* 185
5.3.5. ГЕНИ, СВЪРЗАНИ С ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНИЕ КЪМ ДИАБЕТ 186
5.3.6. *APOE* 187
5.3.7. *PHACTR1* 188
5.4. ОБОБЩЕНИЕ 189

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ 191
6.1. ИЗВОДИ 192
6.2. ПРИНОСИ 193
6.2.1. ПРИНОСИ С НАУЧНО – ФУНДАМЕНТАЛЕН ХАРАКТЕР 193
6.2.2. ПРИНОСИ С НАУЧНО – ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР 193
6.2.3. ПРИНОСИ С МЕТОДИЧЕН ХАРАКТЕР 194
6.2.4. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР 194

7. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА 195

8. ПРИЛОЖЕНИЯ 215

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 227

ВЪВЕДЕНИЕ

Тромбоемболизмът е водеща причина за заболеваемост и смъртност в следствие на миокарден инфаркт и мозъчен инсулт. Основните медикаменти, които се използват за профилактика и лечение на тромбози са антикоагулантите и тромоцитните 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 тяхното 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 заема най-голям процентен дял сред сърдечно-съдовите заболявания, последвана от артериалната хипертония. Известно е, че това са многофакторни заболявания, чието проявлението 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 въпросните усложнения.

Исхемичната болест и артериалната хипертония се характеризирт 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.

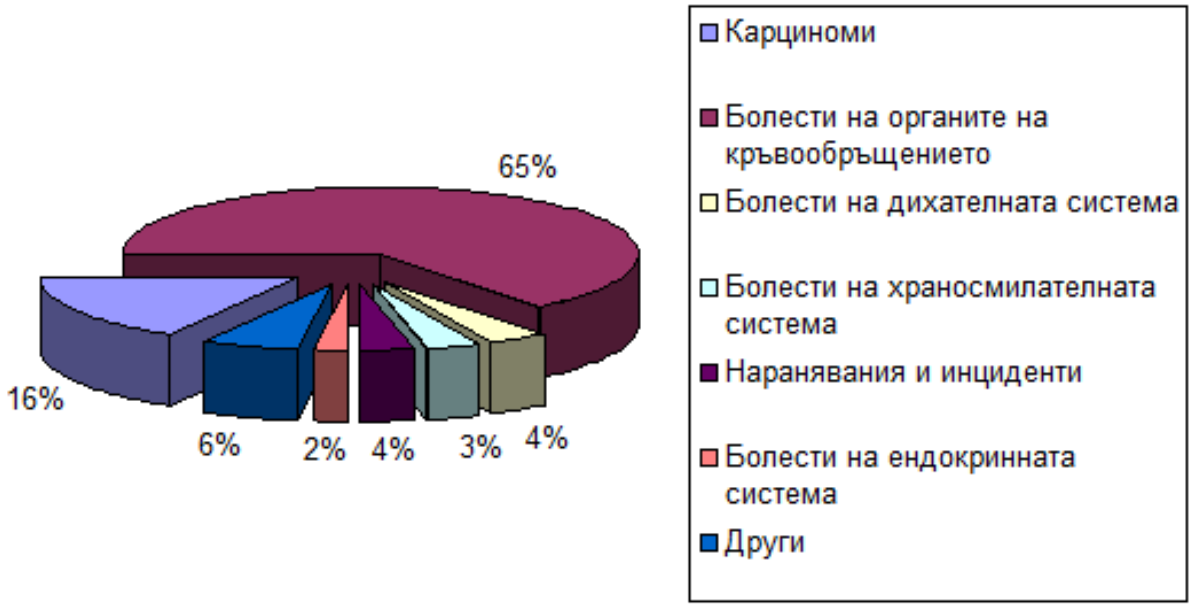
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Сърдечно – съдови заболявания, хемостаза и тромбоза

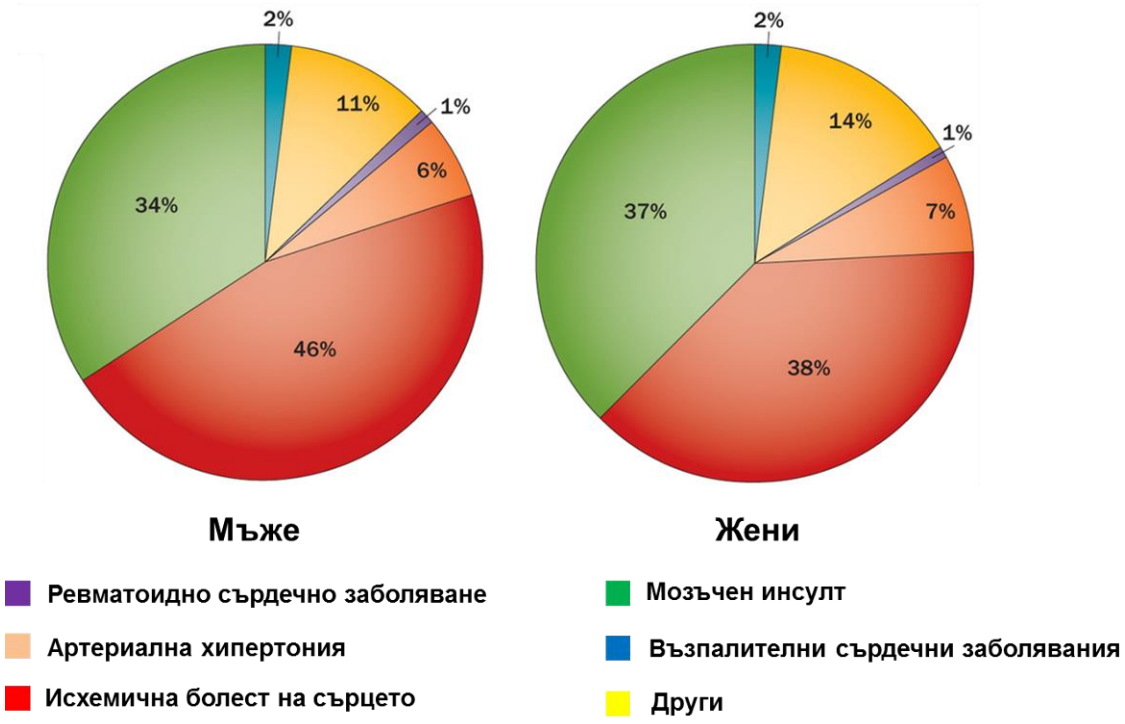
Сърдечно – съдовите заболявания (ССЗ) са основен фактор, предизвикващ временна нетрудоспособност, инвалидизация и висока смъртност в икономически развитите и много от развиващите се страни в световен мащаб, в това число и България. Те съставляват половината от всички смъртните случаи в Европа (49%) и 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 (**Фиг 1.1**).



Фиг 1.1 Процентно разпределение на основните причини за смъртност сред българската популация (по данни на Национален статистически институт, http://www.nsi.bg)

Към ССЗ се отнасят исхемична болест на сърцето (ИБС), мозъчно-съдова болест (МСБ), артериална хипертония (АХ), периферно артериално заболяване (ПАЗ), възпалителни заболявания (ендокардит, миокардит, перикардит), вродено сърдечно заболяване (ВСЗ), ритъмни проводни нарушения (РПН), кардиомиопатии, сърдечна недостатъчност (СН) и др (**Фиг 1.2**).



Фиг 1.2 Процентно разпределение на видовете сърдечно-съдови заболявания (преработено по [4]).

В основата на по-голяма част от тези заболявания стоят тромбоемболични усложнения, дължащи се на нарушения във функционирането на сърдечно-съдовата система (ССС), както и на нарушения в процесите на коагулация, тромбоза и фибринолиза. Поддържането на флуидитета на кръвта във кръвоносните съдове представлява важен физиологичен процес, необходим за поддържането на вътрешната хомеостаза на организма и предотвратяване на сърдечно-съдовите инциденти [5-7].

При нормални условия в организма съществува фино равновесие между основните патологични състояния на хипо- и хиперкоагулация. Хемостазата се отнася до серия от нормално протичащи физиологични процеси, които ограничават кръвта само до вътресъдовото пространство, поддържане на флуидитетаи осигуряват формирането на тромби с цел ограничаване на кръвоизливите след съдово увреждане. Тромбозата представлява образуване на патологичен съсирек в случаите, когато хемостазата е активирана в отсъствието на хеморагия. През 1800 г. Рудолф Вирхов постулира основните три причини за образуването на тромбози: промени в състава на кръвта, промени в стените на съдовете и прекъсване на притока на кръв [6]. Всъщност, в случай на увреждане на кръвоносния съд в отговор се генерират поредица от събития: вазоконстрикция (свиване на кръвоносните съдове) за намаляване на силата на кръвния поток, образуване на хемостатична тромбоцитна тапа на мястото на травмата след адхезия, активиране и агрегиране на тромбоцитите, образуване на фибринов съсирек за стабилизиране на тромбоцитната тапа посредством стимулиране на протеините от коагулационната каскада. В резултат на настъпилите промени в хемостатичната система се формира тромб, който в голям кръвоносен съд би довел до намаляване притока на кръв, докато в малък такъв може напълно да го прекъсне. Настъпва емболия, която блокира кръвоснабдаването към периферните части на тялото [5-7].

Разбирането на патогенните процеси, водещи до артериална или венозна тромбоза е от решаващо значение за избора на ефективни и безопасни антитромботични и антикоагулантни средства за лечение на пациенти с тромбоемболични усложнения.

1.2. Физиологични механизми на хемостазата

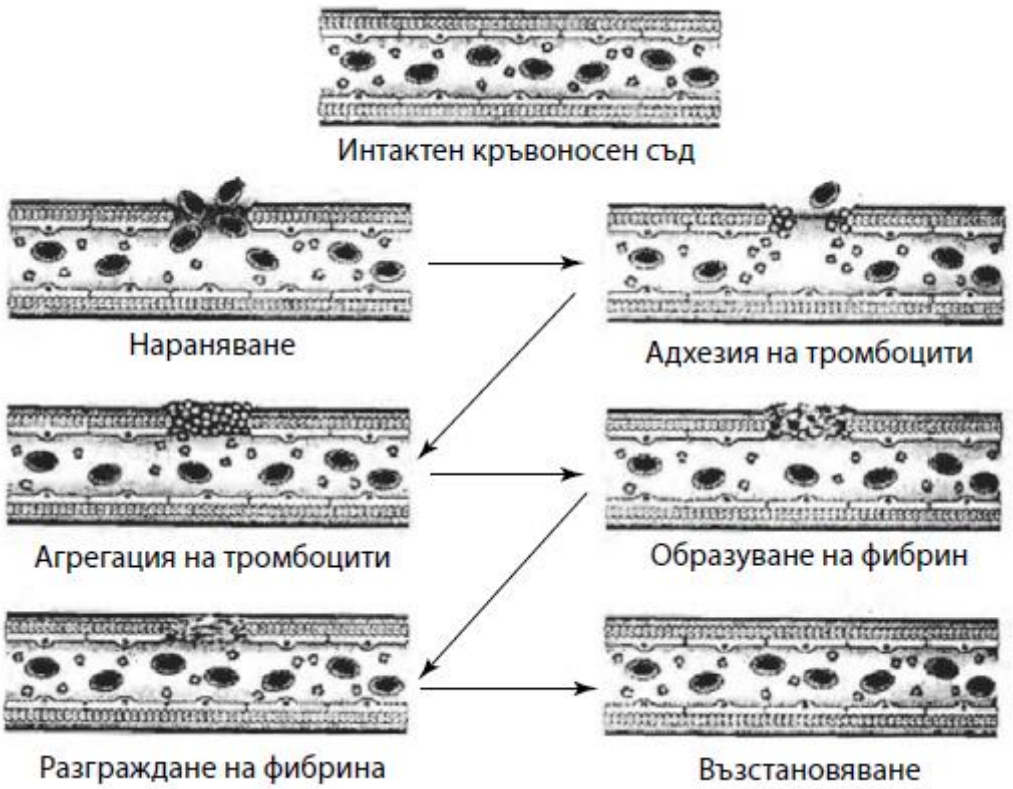
Хемостазата (αιμα – кръв, στασιϚ – спиране) представлява сложен комплекс от процеси, който спира кръвотечението при нараняване на кръвоносните съдове и поддържа в тях течното състояние на кръвта. Хемостазата включва две основни системи [8]:

1. Прокоагулантна система, която участва в образуването на съсирек на мястото на съдовото увреждане;

2. Регулираща система, която ограничава образуването на съсирек само в областта на нараняването.

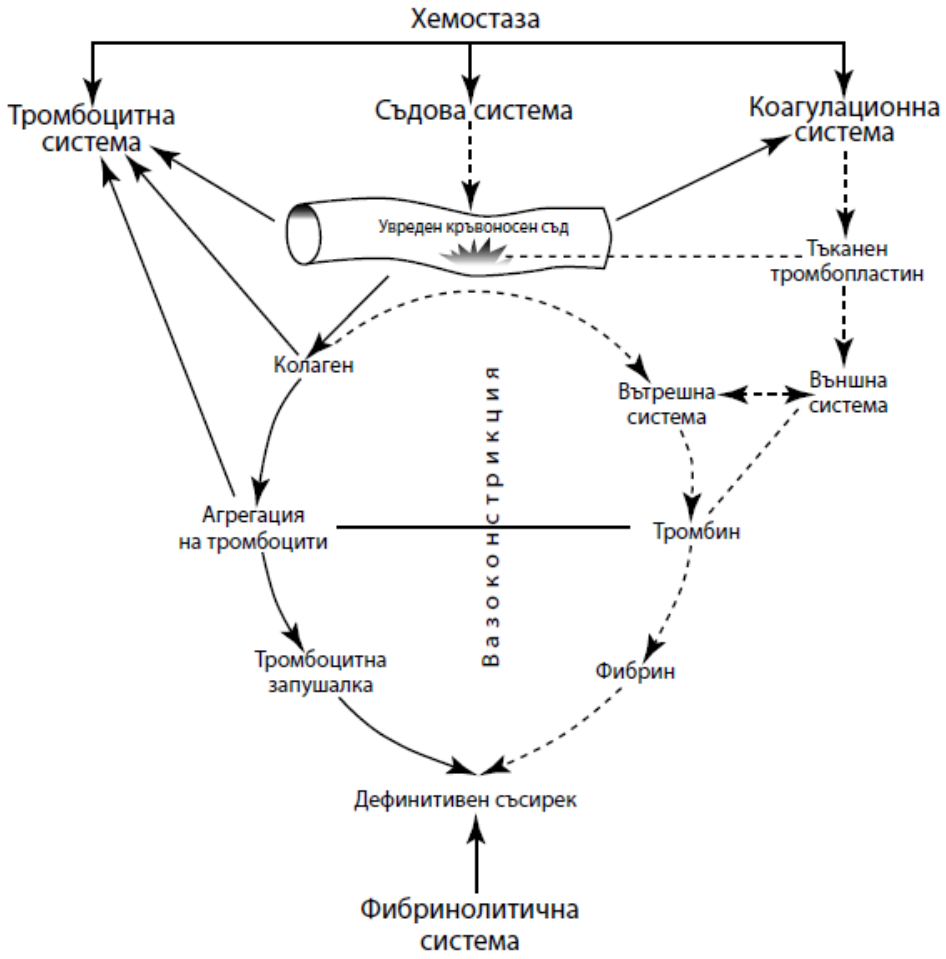
В процесите на хемостаза участват в тясно взаимодействие три групи фактори: съдова стена, тромбоци и фактори от коагулационната каскада [8].

Във физиологични условия ендотелът на стените на кръвоносните съдове играе важна роля в поддържането на техния тонус. Увреждането на стените на съдовете или прекъсването на ендотела води до натрупване на тромбоцити на мястото на увреждането, които биват изложени на действието на колагена, присъстващ в субендотелното пространство (**Фиг. 1.3**).



Фиг. 1.3. Общ преглед на процесите на увреждане на кръвоносен съд и последваща хемостаза.[8].

Това води до активиране на тромбоцитите, тяхното агрегиране и в последствие образуване на първично тромботично ядро (първичен тромбоцитен тромб). От своя страна, активирането на – субендотелните тъканни фактори (СТФ) е причина за стимулиране на коагулационната каскада, при което се формирана фибринова мрежа, стабилизираща първичния тромбоцитния тромб (формира се окончателен тромб) [9]. Образуването на първичен тромбоцитен тромб често се обозначава като първична хемостаза, а формирането на окончателния тромб с фибринова мрежа – като вторична хемостаза (**Фиг. 1.4**) [8].

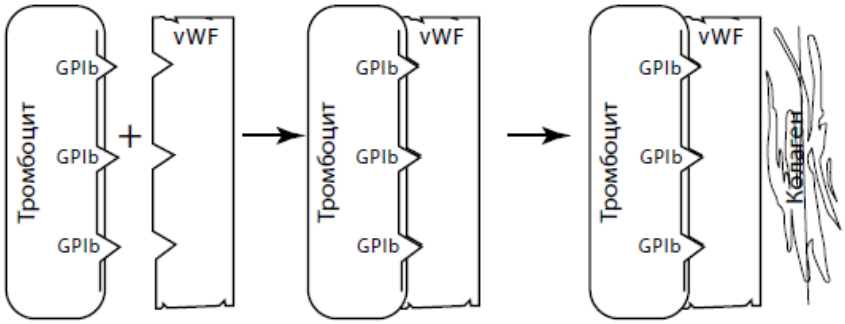


Фиг. 1.4. Схема на хемостазата и баланса между съдова система, коагулационни фактори, тромбоцити и фибринолитична система [8].

След образуване и стабилизиране на съсирека, спиране на кървенето и възстановяване на съдовата стена започва процес на разтваряне и отстраняване на съсирека. Този процес се нарича фибринолиза. Фибринолизата се намира в динамично равновесие с хемостазата [8].

1.2.1. Адхезия, активиране и агрегация на тромбоцитите

Тромбоцитите представляват дисковидни по форма, безцветни клетки, влизащи в състава на кръвта, които играят важна роля в хемостазата и са ключов фактор в патогенезата на артериалната и венозна тромбоза. Съдовото нараняване може да доведе до разкъсване на атеросклеротичната плака и последваща денудация на ендотела. Излагането на действието на субендотелния колаген, свързан с протеин, известен като фактор на фон Вилебранд (vWF, подпомага адхезията на тромбоцитите към стената на кръвоносния съд на мястото на нараняване. Факторът на фон Вилебранд е полимерен гли копротеин, съставен от различен брой димерни субединици. Синтезира се от мегакариоцитите и ендотелните клетки. Локализиран е в: кръвната плазма, където се отделя главно от ендотелните клетки; а-гранулите на тромбоцитите – продукт от синтеза в мегакариоцитите; субендотелното клетъчно пространство – образува се от ендотелните клетки. Предполага се, че тези три източника на vWF са необходими за нормалното протичане на тромбоцитната адхезия [8]. О една страна, vWF свързва тромбоцитите чрез взаимодействие с гликопротеин Ib/IX/V рецепторен комплекс, разположен в мембраната на тромбоцитите [10], като главният тромбоцитен рецептор за vWF е гликопротеин Ib (GPIb). От друга страна vWF се свързва с субендотелния колаген (**Фиг. 1.5**) [8].



Фиг. 1.5. Опростена схема на процеса на тромбоцитна адхезия [8].

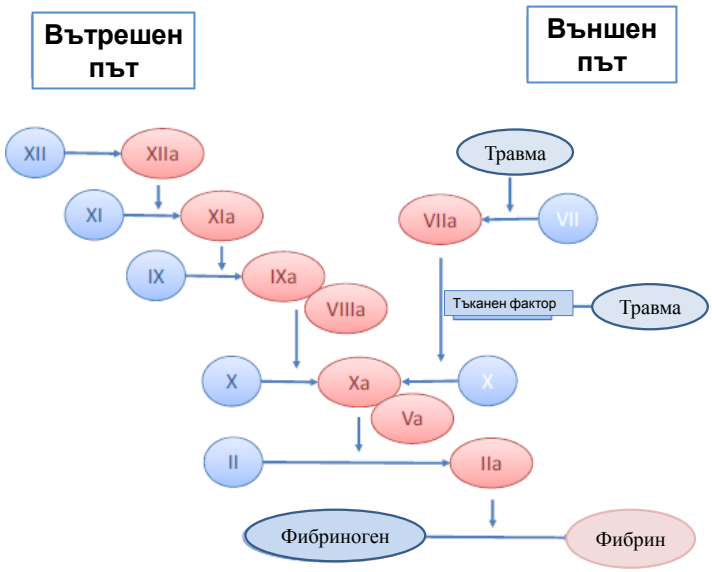
При намален кръвен поток е възможно тромбоцитите да се свържат (адхезират) към субендотелния колаген чрез vWF. Придържайки се към стената на съда, тромбоцитите освобождават гранулите на тромбоцитния агонист тромбоксан А2 и аденозиндифосфат (АДФ), което стартира каскадата на автокринната/паракринна сигнализация на активиране на тромбоцитите. Активираните тромбоцити претърпяват промяна в морфологията си, позволяваща им да се свързват един с друг и да инициират на тромбоцитната агрегация. Образуването по този начин на тази хемостатична тапа е от съществено значение за заздравяването на рани [7]. Въпреки това, образуването на тромботично запушване в коронарните артерии може да предизвика тъканна исхемия и да доведе до условия, известни като остри коронарни синдроми под формата на НАП или миокарден инфаркт (МИ).

1.2.2. Коагулационна каскада

Коагулация, или съсирване, означава образуване на съсирек и този процес се разглежда отделно от агрегацията на тромбоцитите, но в действителност двата механизма протичат едновременно в общия процес на хемостазата [8]. Коагулационната каскада играе основна роля при образуването на тромбин, който превръща разтворимия белтък фибриноген (зол) в неразтворим фибрин (гел) [8]. Образуваната фибринова мрежа стабилизира тромбоцитния тромб, създаден на мястото на съдовата увреда. Образуването на фибрин зависи от два отделни пътя: външен и вътрешен (**Фиг. 1.5**). Преди се е смятало, че и двата имат еднакво значение за хемостазата. В последствие е установено, че външният път има решаващо значение за активирането на коагулационната каскада в отговор на съдово увреждане. Външният и вътрешният път се активират от различни фактори, които се обединяват в един общ механизъм за активирате на тромбин и образуване на фибрин. Крайната фаза на процеса на формиране на фибрин се регулира от инициирането, усилването и разпространението на коагулацията [11]. Процесът на образуване на фибринов съсирек се извършва с участието на поредица от серинови протеази, които представляват основните фактори и/или кофактори на кръвосъсирването. Тези фактори на кръвосъсирването участват в производството на активен тромбин в резултат на поетапно активиране на серия от проензими. Те съществуват в неактивна форма (зимоген, проензим) и се активират чрез частична протеолиза на молекулата, с отцепване на аминокиселина или олигопептид. След протеолизата ензимът придобива активна конформация с образуване на характерната за сериновите протеази каталитична група серин-хистидин-аспартат в активния център на ензима [8].

По време на активиращата фаза, външната каскадата се стимулира чрез тъканно увреждане или травма. Това усилва експозицията на тъканния фактор, представен от субендотелните клетки, който изпълнява ролята на кофактор за коагулационен фактор VII [11]. Активираният фактор VII (серинпротеаза) впоследствие активира фактор X и фактор V съответно до Xa и Va. Последната стъпка от външният път на коагулация включва образуването на комплекс между фактор Xa и фактор Va, който посредством протеолитично разцепване на протромбин (фактор IIa) води до образуване на активен тромбин (фактор II). В следващия етап тромбинът преобразува фибриногена във фибрин и води до образуване на фибринова мрежа, допълнително стабилизираща формиралия се тромб [7].

Вътрешният път на коагулация започва с образуване на първичен комплекс от коагулационни фактори, включително високо молекулекулен кининоген, прекаликреин и фактор XII [11]. Прекаликреинът се превръща в каликреин, докато фактор XII се активира до фактор XIIa чрез процес, наречен автоактивация, което води до активиране на фактор XI до фактор Xia. Впоследствие фактор Xia активира фактор IX до фактор Ixa, който се свързва с фактор VIIIa в комплекс . От своя страна така формираният комплекс активира фактор X до фактор Xa. В последния си етап вътрешния път се слива с външния в общия път, когато фактор Xa активира протромбина в тромбин за образуване на фибрин [11] (**Фиг 1.6**).



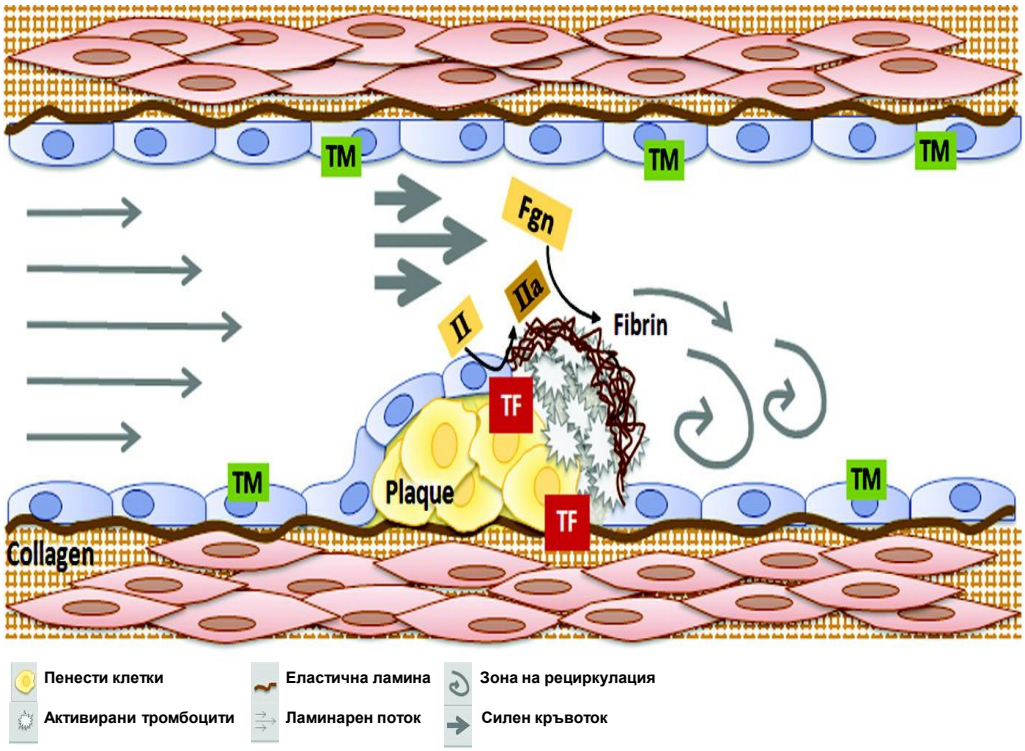
Фиг. 1.5. Коагулационна каскада – външен и вътрешет път (преработено по [7]).

1.3. Видове тромбози

наблюдават се два вида тромбози, артериална и венозна, при които клиничното и терапевтично поведение се различават като това отразява различната патогенеза на двата вида [7].

1.3.1. Артериална тромбоза

Артериалната тромбоза (АТ) обикновено се появява след ерозията или разкъсване на атеросклеротична плака, което може да доведе до исхемични инциденти. Сърдечната исхемия и мозъчният инсулт са най-сериозните и животозастрашаващи клиничните прояви на атеротромбозата. Артериалната тромбоза несъмнено включва участието на коагулационната каскада, но тромбоцитната активация и агрегация играе по-важна роля в артериите с по-висок флуидитет. Тромбът при артериалната тромбоза често се нарича „бял съсирек", защото съдържа предимно тромбоцити и малко на брой червени кръвни клетки (**Фиг. 1.7**). Богатият на тромбоцити тромб е вероятно частично оклузивен и води до нестабилна ангина пекторис НАП и миокарден инфаркт без елевация на ST сегмента (NSTEMI), с незначителна промяна в ЕКГ [7]. Предполага се, че тромботична коронарна оклузия съставлява 50-70% от внезапната сърдечна смърт, причинена от ИБС [12]. Артериалният тромб, който е богат на фибрин, често напълно оклузивен, води до миокарден инфаркт с елевация на ST сегмента (STEMI), който се характеризира с клинично значими промени в електрокардиограмата (ЕКГ) на пациента [7].

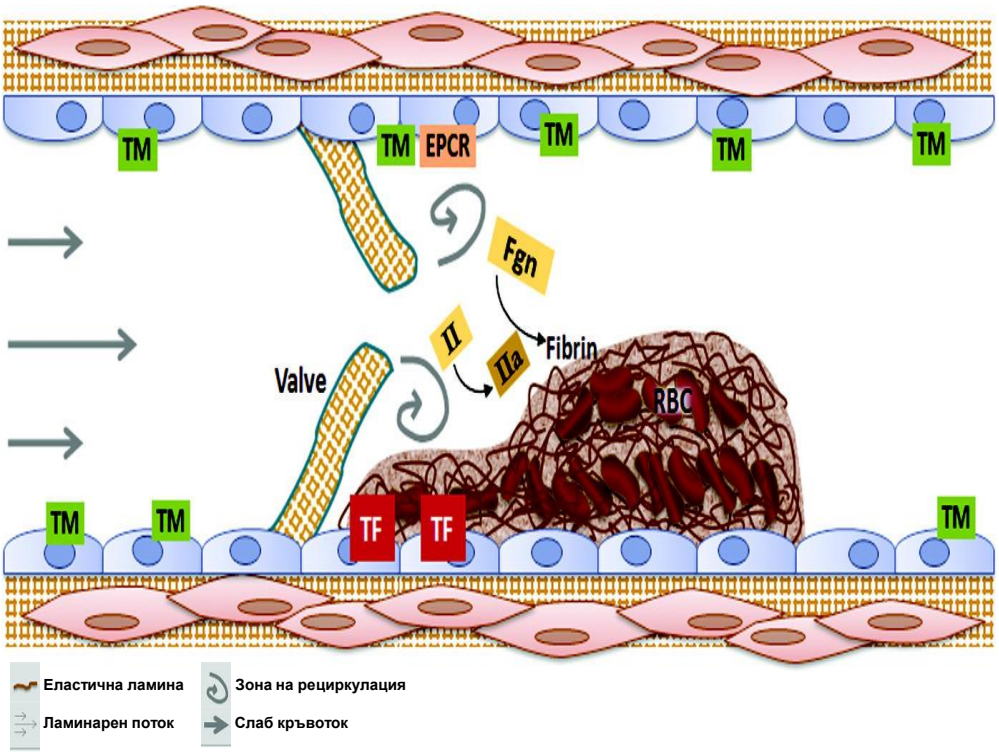


Фиг. 1. 7. Артериална тромбоза – патофизиология (преработено по [7]).
TF – тъканен фактор
II – коагулационен фактор
TM – тромбоцити
Fgn – фибриноген
IIa – коагулационен фактор

1.3.2. Венозна тромбоза

За разлика от артериалната тромбоза, венозната тромбоза обикновено не се свързва с базова съдова патология. В действителност повечето от венозните тромби се образуват в региони на бавен кръвен поток (**Фиг. 1.8**). Венозната тромбоза е свързана с венозен застой и хиперкоагулация на кръвта. Венозният застой може да бъде причинен от неподвижност, ортопедична операция или повишено венозно налягане. Като цяло продължителното увреждане на венозната функция, хиперкоагулацията и дисбаланса на ендогенната антикоагулантна и фибринолитичната системи допринасят за риска от развитие на клинично значим тромб. Венозните тромби са предимно под формата на червени кръвни клетки и фибрин и активирането на коагулационната каскада е основен фактор, допринасящ за венозна тромбоза. Коагулационната каскада има важна роля в образуването на венозни тромби, които често се наричат „червени съсиреци" поради изобилието на червените кръвни клетки и малкия брой тромбоцити в тях [5-7]. По тази причина антикоагулантната терапия е основната терапия за предотвратяване и профилактика на венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) [7].

Венозният тромбоемболизъм има две основни проявления – дълбока венозна тромбоза (ДВТ) и белодробен тромбоемболизъм (БТЕ). Най-сериозната клинична проява на ВТЕ е БТЕ, при който тромбите се придвижват от мястото си на образуване в долните крайници и мигрират до белодробната циркулация.



Фиг. 1.8. Венозна тромбоза – патофизиология (преработено по [7]).
TF – тъканен фактор
Fgn – фибриноген
II – коагулационен фактор
IIa – коагулационен фактор
TM – тромбоцити
EPCR – ендотелен рецептор за протеин C

1.4. Терапевтични интервенции при лечение на тромбози

Лекарствата, които се използват за предотвратяване и лечение на тромбози, по механизъм на лекарствено действие се разделят на: антикоагуланти, тромбоцитни антиагреганти и тромболитици (фибринолитици), като тромбоцитните антиагреганти и тромболитиците образуват групата на антитромбоцитните средства [13, 14].

1.4.1. Лечение с перорални антикоагуланти

В продължение на много десетилетия антагонистите на витамин К варфарин и аценокумарол – производни на кумарина, са златен стандарт за терапия при профилактиката на исхемичен инсулт (ИИ) при пациенти с предсърдно мъждене (ПМ). Механизмът на действие на кумариновите производни е инхибиране на синтеза на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирването (II, VII, IX, X) в черния дроб. През 1994 г. проучване на група от 3692 пациенти показва, че лечението с варфарин намалява риска от инсулт с 68% в сравнение с плацебо [7, 15]. Обединеният анализ на шест големи рандомизирани клинични проучвания, сравняващи аспирин с варфарин, показва превъзходството на варфарин в намаляване на исхемичните инсулти (ИИ) в сравнение с аспирин [7, 16].

Антикоагулантната терапия е от решаващо значение и за превенция на рецидивиращи ДВТ и БТЕ. Оралната антикоагулантна терапия с варфарин е в основата на дългосрочно лечение и профилактика на БТЕ [7, 17]. Фармакологичното действие на варфарин е свързано с инхбиране на ензима витамин К епоксид редуктаза (VKOR), като по този начин предотвратява образуването на активни фактори на кръвосъсирването в черния дроб [7, 18]. Поради тази причина началото на антикоагулационната активност обикновено се забавя до 48 часа след започване на терапията. При ВТЕ обаче е необходима незабавна антикоагулация с цел минимизиране на риска от рецидив. Освен това подкожно прилаганият нискомолекулен

хепарин (инхибитор на фактор Ха) се използва едновременно с варфарин по време на началните дни на терапията. Важно е да се отбележи, че макар и варфарин да е златен стандарт за лечение на тромбози през последните 60 години, неговите недостатъци (включително широките междуиндивидуални различия в отговора към терапия и необходимостта от ежемесечно проследяване на терапевтичния отговор с използване на постоянен мониторинг) доведоха до одобрението и въвеждането на пазара на няколко нови орални антикоагуланти. Тези нови антикоагуланти проявяват терапевтична ефикасност чрез директно инхибиране на коагулационната каскада в системната циркулация. Новите перорални антикоагуланти включват директни инхибитори на тромбин като дабигатран, и инхибитори на фактор Ха като ривароксабан и апиксабан [7].

1.4.2. Антитромбоцитна терапия

Антитромбоцитната терапия се очертава като голям успех в намаляването на риска за ИМ, като усложнение от предхождаща атеросклероза на коронарните артерии. Към настоящия момент, двойна антитромботична терапия с клопидогрел и аспирин е основа на лечението за предотвратяване на повторни сърдечно-съдови инциденти при пациенти с ОКС, и предотвратяване на стент тромбози след перкутанна коронарна интервенция (ПКИ) [7, 19]. Целта на двойната терапия е да блокира двата основнии пътя, участващи в агрегацията на тромбоцитите. Клопидогрел представлява тиенопиридиново производно, което инхибира АДФ-медиираното активиране на тромбоцитите чрез необратимо свързване с P2Y12 G-протеин свързани рецептори върху повърхността на тромбоцитите [7, 20]. Аспиринът проявява антитромботичен ефект чрез инхибиране на активността на циклооксигеназа-1 (COX-1), като предотвратява на продукцията на тромбоксан А2 от арахидонова киселина (АХК) [7, 20]. Двойната антитромботична терапия има доказана ефективност при намаляване на риска от възникване на артериална тромбоза и исхемични усложнения, потвърдена от големи рандомизирани контролирани проучвания, като например CURE и PCI CURE [7].

1.5.Фармакогенетични изследвания при сърдечно-съдови заболявания.

Отговорът към лекарствената терапия с определен медикамент демонстрира голяма интериндивидуална и етническа вариабилност [21]. Оптималната терапевтична доза се определя, както от генетични, така и от негенетични фактори. Предполага се, че генетиката може да е причина за 20 до 95% от вариабилността в лекарствената ефикасност и проява на ефекта [22]. Клинични наблюдения на наследствени различия в дозовите ефекти на лекарствата за първи път са документирани през петдесетте години на миналия век [23], което води до обособяването като наука на фармакогенетиката като наука, а по-късно и на фармакогеномиката.

Фармакогеномиката е интердисциплинарна наука, занимаваща се с генетичното наследство на индивида засягащо отговора на организма към лекарствени медикаменти [15]. Тя съчетава традиционните фармацевтични науки с познанията за гени, белтъци и единични нуклеотидни полиморфизми. Тази наука сама по себе си е насочена към определяне на полиморфни варианти в ДНК, които са характерни за отделни пациенти с цел оценка на податливостта към лечение на съответното заболяване и избор на оптимална медикаментозна терапия [16].

Класическата фармакогенетика включва два основни раздела: фармакокинетика и фармакодинамика. Фармакокинетиката се фокусира върху абсорбцията, бионаличността и клирънса на системните лекарствени концентрации. От своя страна, фармакодинамиката разглежда концентрациите на лекарствата на мястото на рецептора и как този механизъм се превръща в терапевтичен отговор. На молекулярно ниво фармакокинетиката се контролира от метаболизиращи ензими, докато фармакодинамиката се контролира от рецептори.

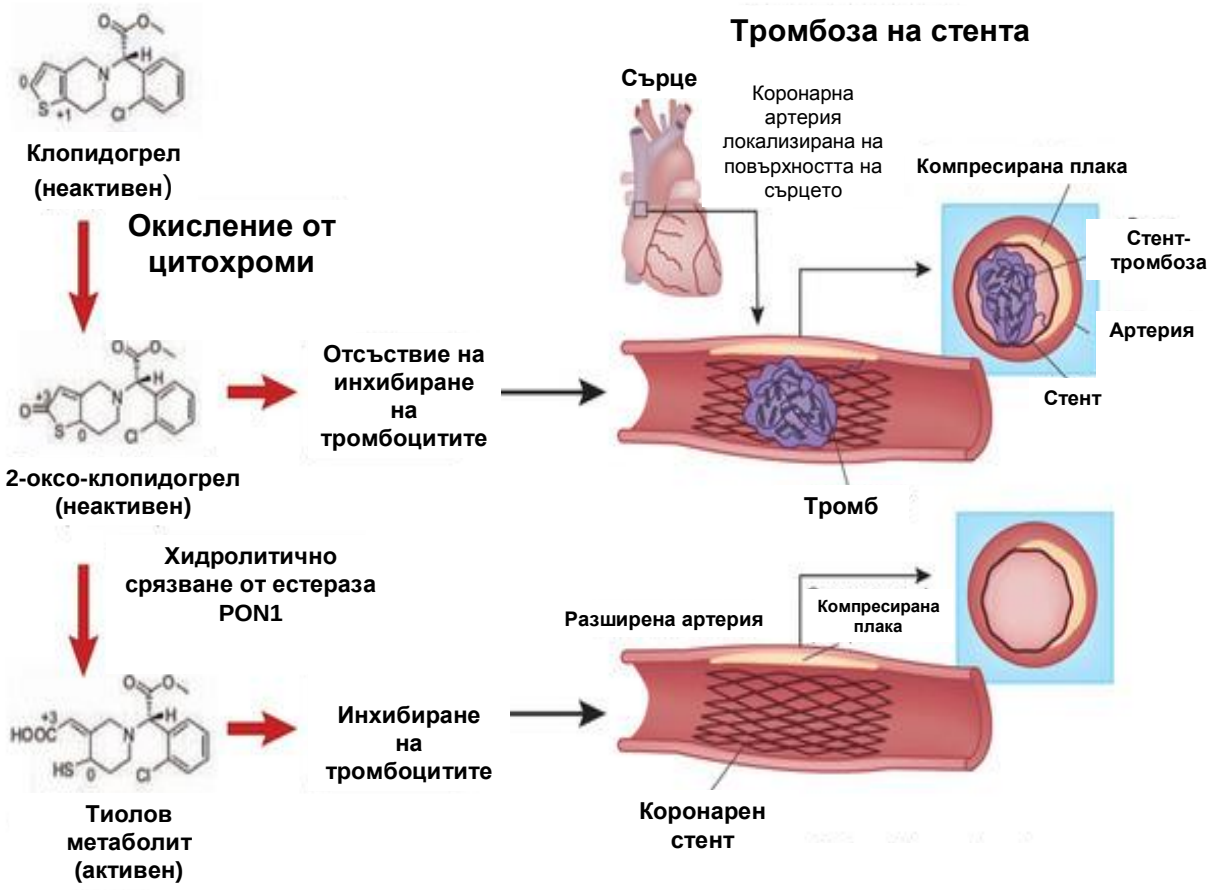
Поради тази причина, молекулни промени в метаболизиращите ензими можегат да доведат до по-бавното или по-бързото метаболизиране на съответното лекарство. Това може да причини свръхнатрупване или недостатъчни количества от медикамента на мястото на

рецептора, независимо от прилагането на стандартна лекарствена доза. Фармакокинетичните ефекти се дължат на между- индивидуални различия в абсорбцията, разпределението, метаболизма (активиране на предлекарство, инактивиране на биологично активните молекули с биологична активност) или екскрецията на лекарството. Фармакодинамичните ефекти могат да доведат до междуиндивидуални различия в ефекта на лекарствата и в лекарствените реакции, въпреки наличието на подходящи концентрации на активното съединение в прицелното място на действие [26, 27].

1.5.1. Фармакогенетика на лекарствения отговор при терапия с тромбоцитния антиагрегант клопидогрел

1.5.1.1. Клопидогрел

Клопидогрел (КЛД) представлява мощен антитромбоцитен медикамент, който започнва да се прилага в близкото минало за профилактика на съдови, тромботични събития при пациенти в риск (**Фиг.1.9**) [17].



Фиг 1.9. Приложение на клопидогрел при превенция на стент тромбози(преработено по [18]).

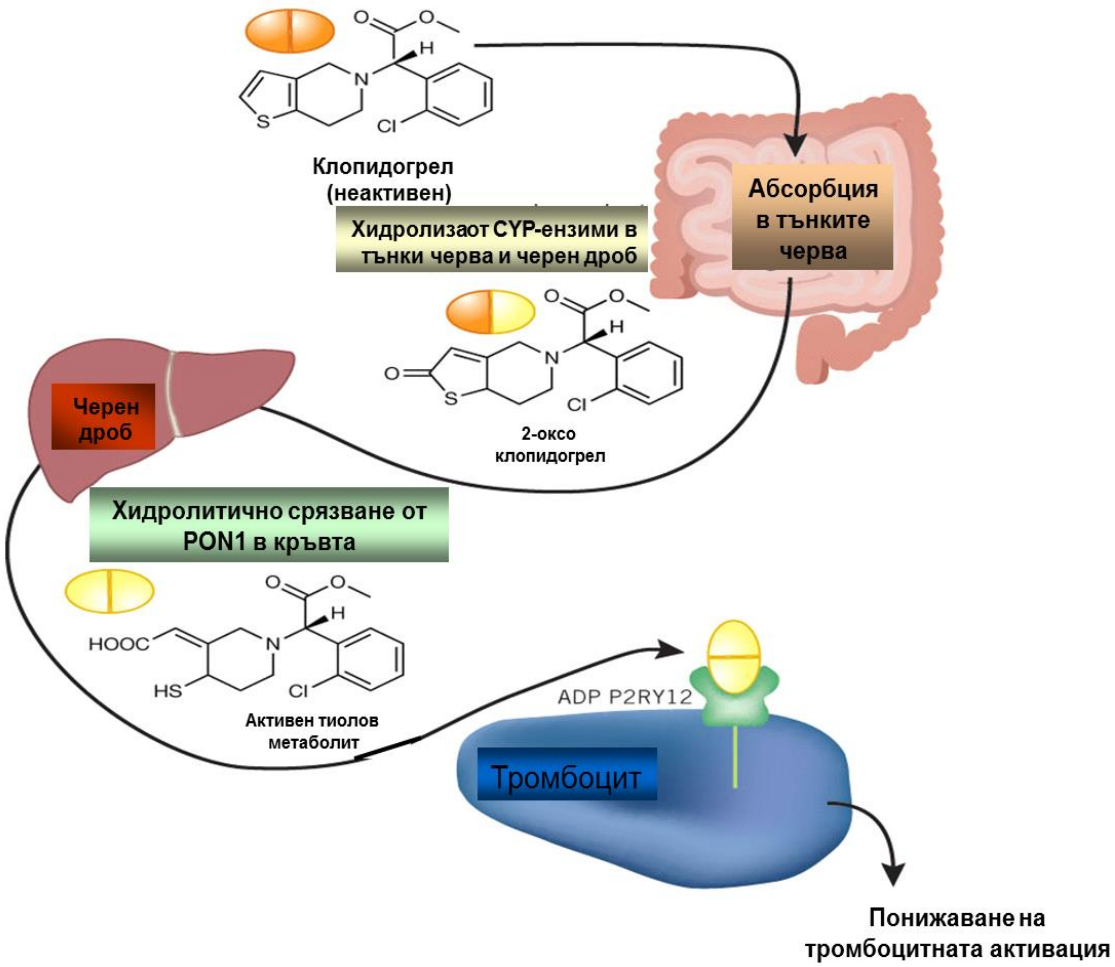
Терапията с този медикамент може да предизвика редица сериозни и нежелани лекарствени реакции, като например:

- Тежка неутропения (нисък брой бели кръвни клетки) (Честота: 1 / 2, 000) [19].
- Тромботична тромбоцитопенична пурпура (ТТП) (Честота: 4 / 1, 000 000) [19-21].
- Кръвоизливи – честота на кръвоизливите може да се увеличи при едновременното приложение на КЛД с аспирин [20-23].

- Стомашно-чревни кръвоизливи (честота: 2.0% годишно) [20, 24].
- Мозъчен кръвоизлив (честота 0,1 – 0,4% годишно) [19, 25].

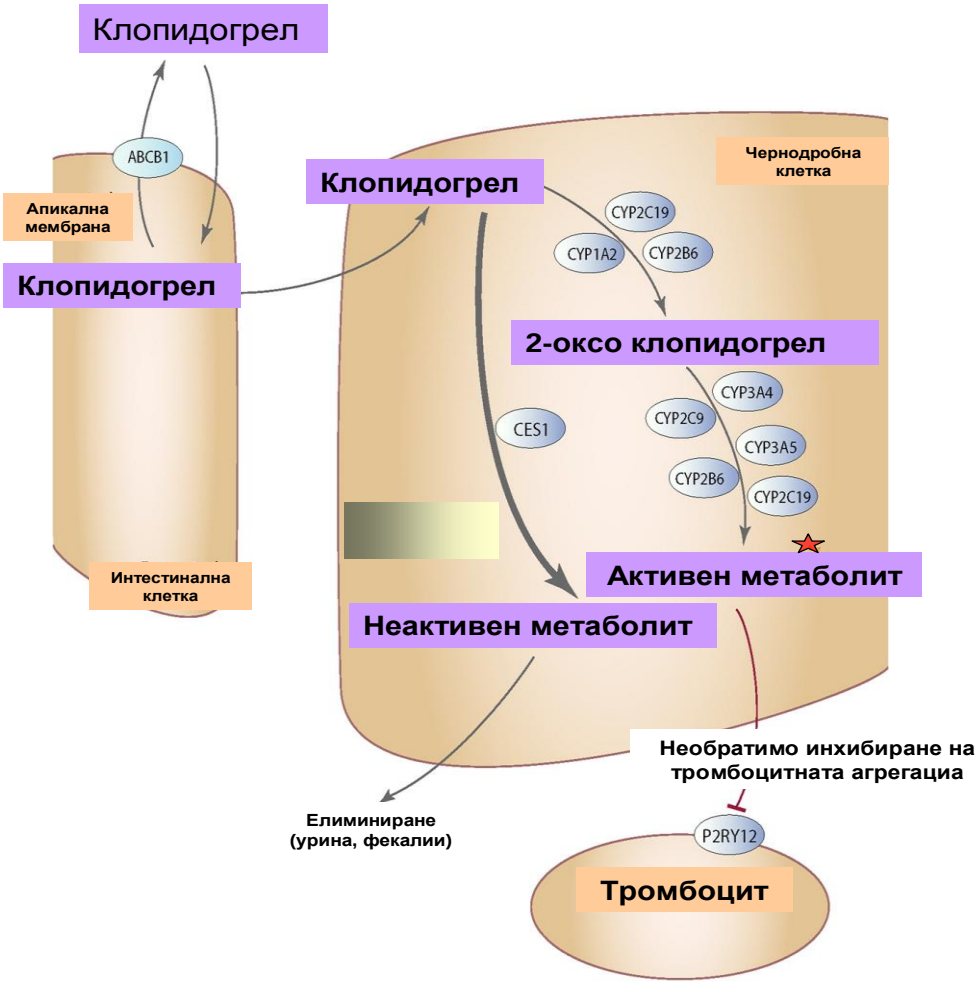
1.5.1.2. Метаболизъм на клопидогрел

Клопидогрел бисулфат се метаболизира до активен тиолов дериват в черния дроб чрез окисление и хидролиза [26-33]. Общият път на метаболизиране на КЛД от CYP450 е в основата на лекарствените му взаимодействия (**Фиг 1.10**) [34]. Ензимът paraoxonase 1 (PON1) също е включен в биотрансформацията на КЛД до активен метаболит [28, 33, 35-39].



Фиг 1.10. Метаболизиране на клопидогрел до активен метаболит (преработено по [40]).

Оксидативният метаболизъм на КЛД включва два основни етапа. Първата стъпка е окисление на тиофеновия пръстен на предлекарството, с цел формиране на 2-оксо-КЛД. Втората стъпка включва хидролиза на 2-оксо-КЛД до активен метаболит, който се свързва с рецептора P2Y12, при което протича инхибиране на АДФ-стимулираната агрегацията на тромбоцитите. Ензими, които участват в първата стъпка на метаболизма на КЛД са CYP1A2, CYP2B6 и CYP2C19. Втората стъпка позволява окисление чрез CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 и CYP2C19, последвана от хидролитично разцепване от paraoxonase 1 (PON1) на активния метаболит (**Фиг. 1.11**) [41].



Фиг 1.11. Основни ензими, участващи в метаболизма на клопидогрел до неговия активен метаболит (преработено по [42] и https://www.pharmgkb.org/pathway).

Единичните нуклеотидни замени (single nucleotide polymorphisms, SNPs) в гените, кодиращи тези ензими, водят до получаването на продукти, които са по-малко функционални в процеса на активация и може значително да променят нивата на активния метаболит на КЛД [43].

Ензимът CYP2C19 участва и в двете стопки на метаболизма на КЛД, Като допросная за около 45 % от первые цикл на окисление и 21 % при втория етап, което води до получаване на активен метаболит [44]. Алелните варианти *CYP2C19 *2* и **3* в гена, кодиращ последователността на този ензим, допринасят за повече от 90% от случаите на бавен метаболизъм [27, 45-48].

Последните изследвания показват, че фармакодинамичният отговор към КЛД варира. Между 4-40 % от пациентите са класифицирани като резистентни към терапията с КЛД поради ниската инхибираща активност на тромбоцитите, в резултат на липсата на метаболизиране на неактивното съединение до активен метаболит [47-49]. Негенетичните фактори, които влияят на реакцията на КЛД включват възраст, диабет, бъбречна недостатъчност и др. [38, 47, 48, 50]

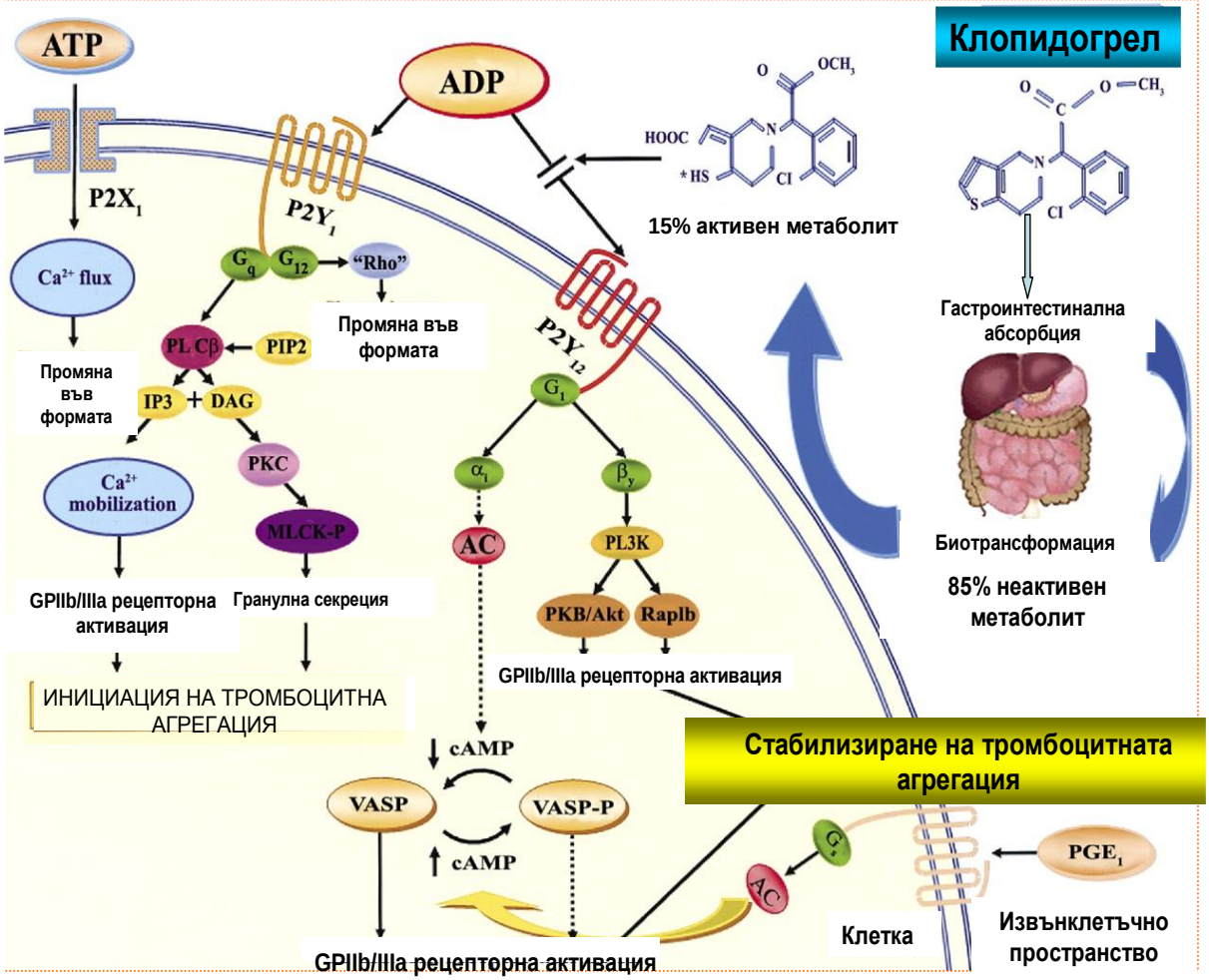
1.5.1.3. Механизъм на действие на клопидогрел

Клопидогрел представлява АДФ антагонист, който възпрепятства директно свързването на АДФ с тромбоцитите, като блокира селективно P2Y12 рецепторите върху тромбоцитната мембрана [17, 34, 51, 52]. Медикаментът има двойно действие върху тромбоцитната функция – от една страна, пряко и трайно инхибира АДФ – зависимия път на активиране на тромбоцитите, а от друга индиректно блокира АДФ – медиираната експресия на GP IIb/IIIa рецепторите за свързване с фибриногена и последващата тромбоцитна агрегация [34, 47, 53].

АДФ е един от най – важните медиатори на физиологичните процеси хемостаза и тромбообразуване. След активиране на тромбоцитите, АДФ се отделя от техните вътреклетъчни, запасни гранули, като по този начин усилва протичащия процес. Съществуват два основни типа пуринергични рецептори в мембраните на клетките: ГТФ – свързани протеинови рецептори, познати още като G – протеин свързващи сайтове (P2Y) и лиганд – зависим йонен канал (P2X1). И двата типа рецептори играят съществена роля в активирането и агрегацията на тромбоцитите [54, 55].

Рецепторът P2X1 използва АТФ като агонист и медиира екстрацелуларен Ca 2+ инфлукс (вливане на Ca 2+ в клетката), което от своя страна води до изменение във формата на тромбоцитите [55].

Познати са два основни вида P2Y рецептори: P2Y1 и P2Y2, които използват АДФ като агонист за осъществяване на своите функции. Активацията на P2Y1 рецептора води до серия от сигнални събития, които инициират слаба неустойчива фаза на тромбоцитна агрегация (**Фиг. 1.12**) [55].



Фиг 1.12. Схематично представяне на механизма на действие на клопидогрел в човешкия организъм (преработено по [55]).

Рецепторите от групата на P2 ясно могат да бъдат диференцирани в две основни подгрупи: ГТФ – свързан протеинов рецептор, познат още като G – протеин свързващ сайт (P2Y1 и P2Y12), и рецептор, представляващ лиганд – зависим йонен канал (P2X1). P2Y1, който е отговорен за промяната на формата на тромбоцитите и мобилизирането на калция в клетката, се свързва към протеин от групата G – Gq и активира фосфолипаза Cb. Фосфолипаза Cb от своя страна е отговорна за активирането на инозитол–(1,4,5)–трифосфат и диацилглицерол. Диацилглицеролът води до активирането на протеин–киназа C. Инозитол–(1,4,5)–трифосфатът

причинява мобилизация на калций във вътрешността на клетката, което води до активиране на рецептора GP Iib/III, инициращ тромбоцитната агрегация. Рецепторът P2Y12 се свързва към протеин Gi, като това води до инхибиране на аденилатциклазата. Последващият спад в нивата на цикличен аденозин монофосфат (цАМФ) води до намаляване на активността на специфични протеинкинази, които вече не могат да фосфорилират вазодилататор-стимулиращ фосфопротеин, което е от решаващо значение за активирането на рецептора GP Iib/IIIa. Субединицата β на Gi протеина активира фосфатидилинозитол 3-киназа, която представлява важна сигнална молекула за P2Y12-медиирана тромбоцитна гранулна секреция и това води до активиране на рецептор GP Iib/IIIa. Накрая, P2X1, който е комплекс от затворен тип и представлява йонен канал, се активира от АДФ. Това активиране води до повишаване на калция вътре в самите тромбоцити, промяна в тяхната форма и стабилизиране на тромбоцитната агрегация. Активният метаболит на КЛД прекъсва активирането на P2Y12 рецептора и това води до потискане на агрегацията на тромбоцитите [55-57].

При нормално физиологично състояние и интактен ендотел тромбоцитите са в неактивно състояние, благодарение на наличните азотен оксид и простациклин [17, 51]. При увреда на ендотелния слой, синтезата на тези медиатори е нарушена и се осъществява адхезия на циркулиращите тромбоцити към колагена, фактора на von Willebrand (vWF) и фибронектина от субендотелния матрикс. Следва процес на активиране на тромбоцитите чрез няколко независими медиатори – колаген, тромбоксан, аденозин дифосфат и тромбин. Активираните тромбоцити претърпяват конформационни промени, дегранулират се и секретират хематоксини, фактори на съсирването и вазоконстриктори, което води до образуване на тромбин, вазоспазъм и допълнително натрупване на тромбоцити и циркулиращи клетки на възпалението. Дегранулирането и освобождаването на аденозин дифосфат и тромбоксан засилва процеса на тромбоцитно активиране [17, 51].

Тромбоксанът засилва тромбоцитната агрегация чрез забавяне на кръвния поток (вазокострикция) и директно стимулиране на тромбоцитната агрегация. Свързването на АДФ с P2Y12 рецептора в крайния етап води до конформационни промени и активиране на GPIIb/IIIa рецептора, който става наличен за свързване с фибриногена и фактора на vWF. Стабилизирането на образувания фибриноген-тромбоцитен тромб се осъществява с участието на коагулационната каскада, като от особено значение е участието на тромбина – мощен стимулатор на тромбоцитната агрегация и катализатор на протеолизата на фибриногена във фибрин. Образуваният съсирек може напълно да прекъсне кръвния поток на мястото на руптурирала атеросклеротична плака и/или да емболизира дистално с последваща микросъдова обструкция, миокардна исхемия и инфаркт [17, 51].

Описаните механизми на тромбоцитна адхезия, активиране и агрегация обуславят смисъла на антиагрегантната терапия с медикамента КЛД при пациентите с остър коронарен синдром [17, 51].

1.5.3.4. Резистентност към клопидогрел

Не всички пациенти имат еднакъв отговор към фиксирана доза антиагрегант. Изследването на тромбоцитната агрегация при ПКИ за определяне на дозата е препоръчително особено при високорискови пациенти и ОКС. Увеличаването на дозата на КЛД до 150 мг. Дневно е ефективно и безопасно при пациенти, при които има слаб отговор към терапията с медикамента [58].

В клиничната практика липсата на отговор към терапията с КЛД се нарича “резистентост към КЛД” [55, 59]. Приблизително 5–10% от пациентите на терапия с този медикамент показват резистентност към неговите ефекти, изследвани чрез стандартни тромбоцитни тестове, и около 25% от пациентите показват частичен отговор към терапията. При различните популации процентите по отношение на резистентността към медикамента КЛД са между 4% и 44% [60].

Докладваната за първи път през 2003 г. От Gurbel [60, 61] вариабилност на отговора към КЛД понастоящем е обект на многобройни разработки, без да са получени категорични доказателства от рандомизирани проучвания, че измерената ex vivo различна стойност на инхибиция на тромбоцитната активация е основна причина за големи кардио – васкуларни

исхемични усложнения [62, 63]. Няма еднозначен отговор и кой ex vivo тест най-точно идентифицира in vivo вариабилността на отговора към КЛД, и с кой тест да се диференцират резистентните индивиди, които са с повишен риск от сърдечно – съдови събития и стент-тромбози [64].

Резистентността или вариабилността на отговора към КЛД зависи от изходната реактивност на тромбоцитите. Тромбоцитната реактивност варира между индивидите и следва нормална гаусова крива на разпределение като честотата на високо реактивните, силно агрегиращи тромбоцити/индивиди не се променя от лечението с антагреганти/КЛД. Честотата на инстент тромбоза при пациенти с намалена чувствителност към КЛД варира между 3 % и 8.6 % .

Изразеният интериндивидуален отговор към КЛД е независим от натоварващата доза. Повишението на натоварващата доза до 600 мг скъсява времето и повишава мощността на максималната инхибиция в сравнение с натоварващата доза от 300 мг [65].

Бързата и прецизна диагноза на антитромбоцитната резистентност е възможна с помощта на разработени нови тестове за диагностика. Въпреки наличието на множество тестове, няма съгласие по отношение на референтните стандарти за оценяване на тромбоцитната активация [62, 63, 66, 67].

Точната причина за резистентността към КЛД не е известна. Тя може да се дължи на различни биологични, генетични и клинични фактори [49, 68, 69].

1.5.1.5. Потенциални механизми за резистентност към клопидогрел

Причините, обуславящи индивидуалния отговор към КЛД, са много и могат да се систематизират в следните групи: генетични, клетъчни, патофизиологични и клинични фактори (**Фиг. 1.13**) [70].



Фиг. 1.13. Класификация на основните причини, обуславящи различен отговор към клопидогрел при отделните индивиди (преработено по [49, 52, 71]).

Клиничните фактори имат основна роля за вариабилността на отговора към терапията с този медикамент [72-74]. Някои клинични състояния, като диабет, ОКС и повишен индексна телесната маса, също са свързани с ограничен отговор към терапията с КЛД[71]. Това обяснява наблюдаваната при тези пациенти повишена предразположеност към развитие на повтарящи се тромботични усложнения, независимо от терапията с КЛД. При ОКС е повишена фракцията на незрели тромбоцити, особено в острата фаза на МИ със ST-елевация, което може да допринася за по-активни процеси на тромбообразуване. Тези състояния изискват по-агресивна

антитромбоцитна терапия с оглед намаляването на перипроцедурните усложнения при пациентите, насочени за ПКИ [61, 75, 76].

Медикаментозните взаимодействия, включително с липофилни статини и омепразол, могат да повлияят фармакодинамичните ефекти на КЛД [57, 77]. Необходимо е провеждането на клинични проучвания, които да определят дали пониженият отговор към терапията с КЛД излага пациентите на повишен риск за тромботични инциденти и дали повишеният отговор към КЛД е асоцииран с повишен риск за настъпване на кръвоизливи.

Генетичните полиморфизми могат да повлияят фармакокинетиката на лекарствата, прицелните молекули на лекарствено действие или изявата на болестно състояние. Многобройни гени кодират ензими, които участват в усвояването и метаболизма на КЛД. Промяна в някой от тези етапи, поради вариации в ензимната активност може да повлияе ефекта от приема на КЛД [77, 78].

Интериндивидуалната вариабилност в отговора към терапията с КЛД се дължи основно на полиморфни варианти, открити в гени от групата на цитохром Р450, коита кодират ензими, участващи в метаболизма на антитромбоцитния медикамент. Установено е, че полиморфни са първите три семейства от тази група, които участват в метаболизма на голям брой екзогенни съединения: токсини от околната среда, лекарствени вещества и карциногени [79, 80].

1.5.1.5.1. *CYP2C19*

Цитохром 2С19 е един от най-важните ензими, взимащ участие в метаболизма на около 5% от лекарствени препарати, използвани в клиничната практика [81]. Субстрати на този ензим са инхибитори на протонната помпа, антидепресанти, антиконвулсанти, седативи, мускулни релаксанти, диазепам, инхибитори на обратното захващане на серотонина, циталопрам и есциталопрам, КЛД, а също така и препарати, прилагани при лечение на малария [82]. Тези субстрати представляват предимно амидни съединения и слаби бази [83].

Генът *CYP2C19* е локализиран върху късото рамо на 10-та хромозома и е с големина 90.21 кб. Притежава 9 екзона, експресиращи се до 1475 б.дв. мРНК (**Фиг.1.14**) [83].

S – мефенитоин – 4 –хидроксилазата (кодирана от гена *CYP2C19*) е един от чернодробните цитохром Р450 ензими, участващи в образуването на активни метаболити на КЛД . Генът, кодиращ неговата синтеза, е високо полиморфен. Генетичните полиморфизми в *CYP2C19* са асоциирани с нарушения в метаболизма на КЛД, както при здрави доброволци, така и при пациенти (**Табл.1.1**) [84].

CYP2C19		
Алел:	**Нуклеотидна замяна:**	**Ензим:**
*1	Див тип	Нормална ензивна активност
*2	681G>A	Неактивен
*3	636G>A	Неактивен
*4	1A>G	Неактивен
*5	1297C>T	Неактивен
*7	19294T>A	Неактивен
*8	358T>C	Неактивен
*17	-806C>T	Повишена ензимна активност

Табл 1.1. Типове алели на гена *CYP2C19* и свързаната с тях ензимна активност [85].

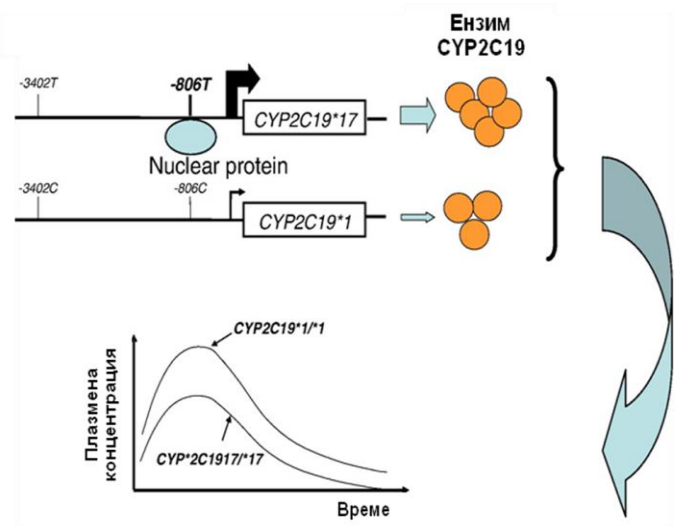
Само някои от тези генотипи са често срещани в европейската популация. Най-често срещаният генотип е *CYP2C19*1*, който има нормална ензимна активност. Генотипите *CYP2C19*2, CYP2C19*3* и *CYP2C19*4* също се срещат с висока честота и всички водят до загуба на ензимна активност [85]. Междуетническата вариабилност в разпределението на тези алели е сравнително висока, вариращa от около 2,8% при хора от европеидната раса до 23% при азиатци [86, 87]. *CYP2C19*2* алелът, съдържащ мутация в сплайсинг мястото в екзон 5

(681G>A), е най-честият алелен вариант във всички етнически групи. Той води до появата на ранен стоп кодон и оттам до продукцията на нефункционален протеин, с липсващ хем-свързващ район [88]. Генетичният вариант *CYP2C19*2*, представляващ замяна на гуанин с аденин в 681 позиция (681 G>A; rs4244285) е бил идентифициран като основна детерминантата на прогнозата при млади пациенти, които приемат КЛД след прекаран инфаркт на миокарда [86]. Този тип вариация в гена определя слабо метаболизиращ фенотип, свързан с повишен риск от сърдечно – съдови събития [86, 87]. Наблюдават се широки междуетнически различия в честотата на разпространение на бавния метаболизиращ фенотип: 2-5% при популации с кавказки произход [86, 89], 13-23% сред азиатски популации [90] и 4-8% при африкански популации [91]. В кавказката популация PM се срещат по – малко от 2-5%. *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* генатипите са отговорни за 99% от бавните метаболизатори (БМ) в Азиатската популация и за 87% от БМ в Кавказката популация [92].

Друг често изследван алел е *CYP2C19*3* (636G>A), определящ появата на стоп кодон в аминокиселинна позиция 212 в екзон 4, но той е рядко срещан сред популациите от кавказки произход, а при азиатските и афро-американските популации обяснява около 20-25% от БМ [93].

Освен това, индивиди, носители на два алела със загуба на функцията в *CYP2C19* (*2, *3 (rs4986893), * 4 (rs28399504), или *5 (rs56337013)) показват повишен риск от усложнения в резултат на терапията с КЛД [94].

През 2004 г. Са идентифицирани два нови генетични варианта в *CYP2C19* [94-96]. Тези варианти са в пълна равновесна скаченост и са локализирани в 5'-съпътстващия регион на гена в позиция -806 и в позиция -3402, като взети заедно, тези варианти представляват *CYP2C19*17* полиморфизъм. Алелната честотата на *CYP2C19*17* е установено, че е 18 % при шведи и етиопци, в сравнение с едва 4% на китайски и 1.3% японски лица. Този полиморфен вариант се асоциира с ултра бърз метаболизъм на ксенобиотици (**Фиг. 1.14**) [88, 94].



Фиг. 1.14. Повишена експресия на ензима CYP2C19 в резултат на носителството на полиморфен вариант *CYP2C19*17*. Замяната -806C>T в гена *CYP2C19* създава елемент, подобен ва GATA, към който се свързват специфично ядрени протеини. Това води до повишени нива на транскрипция на гена и средно 35–40% по-малка площ AUC при терапия с медикаменти, метаболизиращи се от този ензим (преработено по [83, 94]).

Индивидите могат да бъдат класифицирани според техния *CYP2C19* генотип и свързаната с CYP2C19 ензимна активност. По този начин, пациентите, приемащи КЛД, могат да бъдат разделени на следните групи [48]:

- Ултрабързи метаболизатори (УБМ, носители на два мутантни алела *CYP2C19 * 17*)
- Бързи метаболизатори (БРМ, носители на един мутантен алел *CYP2C19 * 17* и един див тип алел)

- Нормални метаболизатори (НМ, носители на два див тип алели),
- Нормални /Междинни метаболизатори (НМ/ММ, носители на един мутантен алел *CYP2C19 *17* и един неактивен алел *CYP2C19*2*)
- Междинни метаболизатори (ММ; носители на един мутантен алел, отговорен за бавен метаболизиращ фенотип – *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3* и един див тип алел),
- Бавни метаболизатори (БМ, носители на два мутантни алела, отговорни за бавен метаболизиращ фенотип *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*)

В сравнение с НМ, БМ в по-малка степен могат да метаболизират CYP2C19 субстрати, както е показано в голям брой ин виво проучвания, свързани с прилагането на класически лекарства като S-мефенитоин, омепразол и клопидогрел [97].

Доказано е, че БМ проявяват три до тринадесет пъти по-висока експозиция на КЛД от НМ. В УБМ бионаличността на антитромбоцитния агент е от два до четири пъти по-ниска в сравнение с НМ. В не малък брой проучвания е доказано, че БМ имат значително по-високи ползи от терапия с КЛД, в сравнение с НМ [97, 98]. От друга страна, БМ страдат по-често от нежелани реакции, предизвикани от употребата на КЛД. Пациенти, носители на алел за намалена функция на CYP2C19, са с много по-ниски нива на активния метаболит, приложен след ПКИ, което води до намалена тромбоцитна инхибиция и по-висока честота на значими нежелани сърдечно – съдови инциденти, включително стент тромбоза [91].

1.5.1.5.2. *CYP3A5*

Ензимите от *CYP3A* подсемейството имат широка субстратна специфичност и са отговорни за окислението на над 50% от всички предлагани в клиничната практика лекарствени средства и структурно – разнообразни химични съединения като стероиди, мастни киселини и разнообразни ксенобиотици от околната среда. Те имат най-голям принос в метаболизма на лекарствени вещества от всички биотрансформационни ензими. Това подсемейство обхваща най – широко експресираните P450 ензими в човешкия черен дроб (около 30% от цялото CYP съдържание) и тънките черва. Подсемейството *CYP3A* включва четири основни форми: *CYP3A5, CYP3A7* и *CYP3A4*, от които *CYP3A4* и *CYP3A5* са с най-голямо значение за лекарствения метаболизъм на КЛД при възрастни пациенти [99](**Фиг.1.16**).

Съществуващата интериндивидуална вариабилност в активността на ензимите CYP3A4 и CYP3A5 се дължи основно на значителен брой полиморфни варианти, открити в кодиращите ги гени [99].

Генът *CYP3A5* е по-хетерогенен. Най-честият във всички етнически групи и функционално важен алелен вариант е 6986A>G (*CYP3A5*3*), намиращ се в интрон 3 на гена. Този некодираща замяна създава алтернативно място на сплайсинг в пре-мРНК, водещо до продукция на анормална мРНК, съдържаща 131 бази от интрон 3. Това от своя страна води до промяна в рамката на четене и поява на стоп кодон. Експресира се протеин, чиято синтеза е прекъсната при 102-ия аминокиселинен остатък и е с липсваща ензимна активност [99].

Честотата на *CYP3A5*3* алела сред популациите с кавказки произход е много висока: около 89-95% Това обяснява и факта защо нивото на ензима CYP3A5 в черния дроб на много голяма част от индивидите от тази раса липсва или е много ниско [100].

1.5.1.5.3. *ABCB1*

Клопидогрел е субстрат на гликопротеин P, който ограничава нивата на негова бионаличност. Установено е, че полиморфен вариант 3435C>T (rs1045642) в гена *ABCB1*, който кодира гликопротеин P, води до понижаване на концентрацията на медикамента и неговия активен метаболит. Въпреки тези резултати, значението на този вариант по отношение на отговора към лекарствена терапия с клопидогрел остава противоречив. Работната група на Mega и сътр. Докладват повишен риск от сърдечно-съдови инциденти при едновременното носителство на *CYP2C19*2* и хомозиготен 3435C>T вариант [101]. От друга страна съществуват и изследвания, които не потвърждават този резултат [102].

1.5.1.5.4. *P2Y12*

Клопидогрел проявява своите фармакологични ефекти чрез инхибиране на рецептора P2Y12, разположен на повърхността на тромбоцитите [103]. Ziegler и сътр.. отчитат четирикратно увеличение на мозъчно-съдови инциденти при пациенти, носители на c.36T>G (rs6809699) вариант, докато друг вариант, c.18 G>A (rs6785930), осигурява добър отговор към терапия с клопидогрел след ПКИ [104] Въпреки това, други изследвания не са успели да покажат подобна тенденция [105].

1.5.1.5.5. *PON1*

Paraoxonase-1 (PON1) представлява ензим с критично значение в биоактивацията на клопидогрел. Често срещаният полиморфен вариант в гена *PON1* (Q192R, rs662) оказва влияние върху скоростта на образуване на активния метаболит от пролекарството. Установено е, че PON1 QQ192 хомозиготни индивиди показват значително по-висок риск от сърдечно-съдови инциденти в резултат на стент-тромбози, имат по-ниска плазмена активност на ензима, по-ниски плазмени концентрации на активния метаболит и недостатъчно инхибиране на тромбоцитната агрегация. Поради тази причина може да се заключи, че PON1 е ключов фактор за биоактивация и клиничната ефикасност на клопидогрел [106].

1.5.1.6. Клинични проучвания, свързани с вариабилността в отговора към терапията с клопидогрел

Проведени са няколко големи, рандомизирани клинични проучвания относно ефекта на: *CYP2C19* генотипа върху фармакокинетиката на активния метаболит на КЛД: CURE и PCI-CURE (2001), CREDO (2002), COMMIT (2005), CLARITY и PCI-CLARITY (2005). Доказателствата от CURE и PCI-CURE обосновават прилагането на КЛД при ОКС без ST-сегмент елевация от 2002 г., а тези от COMMIT и CLARITY – индикацията при СТЕМИ от 2006 г. [44, 107, 108].

Данните от проведените анализи показват, че носителството на алел *CYP2C19*1* отговаря на нормална активност на ензима, а алелите *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* са свързани с намалена функция. Понижената активност на CYP2C19 намалява максималната концентрация на активния метаболит КЛД с 30 до 50% след натоварваща доза от 300 или 600 мг и поддържаща доза от 75 мг. По-ниските нива на активен метаболит водят до намалена тромбоцитна инхибиция и повишена остатъчна тромбоцитна активност [109].

Проучванията по отношение на алелния вариант *CYP2C19*17* и отговара към антитромбоцитната терапията с КЛД все още са твърде малко. Този полиморфизъм в гена *CYP2C19* е открит и проучван едва в последните няколко години и е необходимо провеждането на допълнителни анализи в тази насока.

В своето проучване Frere et al. [110, 111] за първи път предполагат, че полиморфният алел *CYPC19*17* оказва съществено влияние върху тромбоцитния отговор към КЛД независимо от *CYPC19*2* алела. Резултатите от тяхното изследване показват, че *CYP2C19*17* алел допринася за променливостта в тромбоцитния отговор към КЛД при пациенти с НСТЕМИ, лекувани с висока доза медикамент.

Две други изследвания [96], които анализират ролята на *CYP2C19*17* в тромбоцитния отговор при лечението с КЛД, показват, че алелът има значително въздействие върху антитромбоцитния ефект на КЛД, който е свързан с повишен риск от кървене поради увеличаване на активацията на предлекарството.

Данните от шест клинични изпитвания демонстрират, че носители на *CYP2C19*17* вариант имат значително понижен риск от повтарящи се сърдечно-съдови инциденти, в сравнение с неносителите (16% намаляване на честотата на нежеланите сърдечно-съдови усложнения). От друга страна, носителите на *CYP2C19*17* са показали повишен риск от кървене, поради засилване на отговора към медикамента, в резултат на повишена активация на акивния метаболит [112].

Zabalza et al. [113] също докладват, че носителството на *CYP2C19*17* алел е свързано с по-нисък риск от сърдечно-съдови инциденти (OR = 0,75, 95% CI 0.66 – 0.87) и по-висок риск от сериозно кървене (OR = 1,26, 95% CI 1,05 – 1,50).

По отношение на влиянието на полиморфизмите в *CYP3A5* гена върху тромбоцитния отговор към КЛД също са проведени голям брой проучвания

В свое изследване Kim et al. [113] оценяват въздействието на генотип *CYP3A5* върху фармакокинетиката и антиагрегантният ефект на КЛД при 22 здрави доброволци. Разпределението на генотиповете е както следва: *CYP3A5 *1/*1*, N = 6; *CYP3A5 *1/*3*, N = 8; *CYP3A5 *3/*3*, N = 8). След прилагане на натоварваща доза от 300 мг КЛД, последвана от 75 мг веднъж дневно в продължение на 6 дни, са измерени плазмените концентрации на КЛД и неактивния метаболит SR26334 в рамките на 24 часа. Антиагрегантният ефект на КЛД е измерен чрез определяне на инхибирането на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация за 168 часа, според генотипа на *CYP3A5*. Не е установена разлика в профилите на плазмените концентрации на активния и неактивния метаболит на медикамента при отделните генотипи. В допълнение, генотипът на *CYP3A5* не повлиява фармакокинетиката на КЛД и не модулира инхибиторения му ефект върху тромбоцитната агрегация. При здрави индивиди [114].

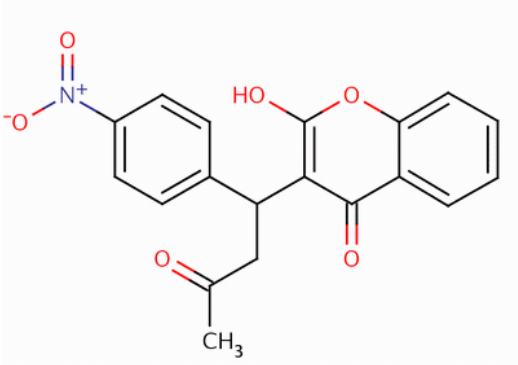
В два други анализа на Namazi et al. [115] и Smith et al. [59, 62] не се установяват значими корелации между отговора към КЛД и полиморфизми в гена *CYP3A5*.

Няма точно предписание за действие при пациенти с намалена биотрансформация на КЛД. Единият вариант е да се увеличи дозата на КЛД, а другият – да се използва алтернативен медикамент (например празугрел) [116].

1.5.2. Фармакогенетика на лекарствения отговор при терапия с индиректния антикоагулант аценокумарол

1.5.2.1. Ползи и недостатъци при терапията с аценокумарол

Аценокумаролът (АЦ) представлява производно на 4-хидроксикумарина, който е широко прилаган за лечение, първична и вторична превенция на различни тромбоемболични заболявания като артериален и венозен тромбоемболизъм, предсърдно мъждене, мозъчен инсулт при смяна на аортна или митрална сърдечна клапа и сърдечна аритмия в много европейски държави като Испания, Холандия, Италия и Франция [117], в това число и България (**Фиг. 1.15**) .



Фиг.1.15. Химична структура на аценокумарол – производно на 4 – хидроксикумарин (Източник: http://en.wikipedia.org).

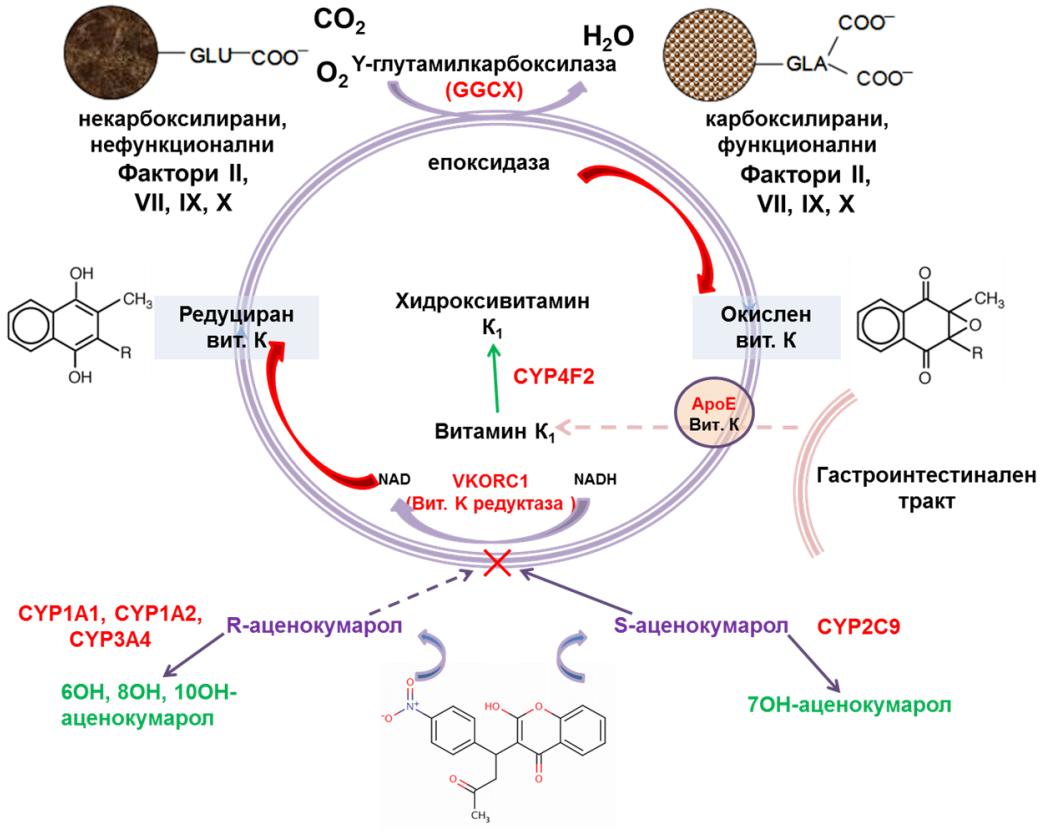
Недостатъкът на терапията с този медикамент е неговия тесен терапевтичен обхват и голямата интер-индивидуална вариабилност в отговор на приложеното лечение. Направени са много усилия за подобряване на лечението с кумаринови антикоагуланти, но въпреки всичко рискът от усложнения остава значителен. Към настоящия момент за мониторинг на антикоагулантния ефект на аценокумарол се използва измерването на т. нар. INR.

Кръвоизливите са най-честите усложнения при антикоагулация с кумаринови производни [118-121], като рискът е по-висок през първите седмици на терапията [122, 123]. При около

12% от пациентите се наблюдават продължителни епизоди на кървене [124]. Около половината от тези инциденти се случват по време на първите 90 дни след започване на терапия с антикоагуланти. В клиничната практика постигането на стабилен INR в началото на терапията с индиректни антикоагуланти е свързано с емпирично определяне на оптималната доза на лекарството и често изисква редовно вземане на кръвни проби с цел избягване на потенциално ниски или високи нива на INR, които могат да доведат до кръвоизливи или тромбози. В някои групи пациенти рискът от кървене е толкова висок, че те не вземат аценокумарол, въпреки потенциалните ползи от това лечение за самите тях.

1.5.2.2. Механизъм на действие на аценокумарол

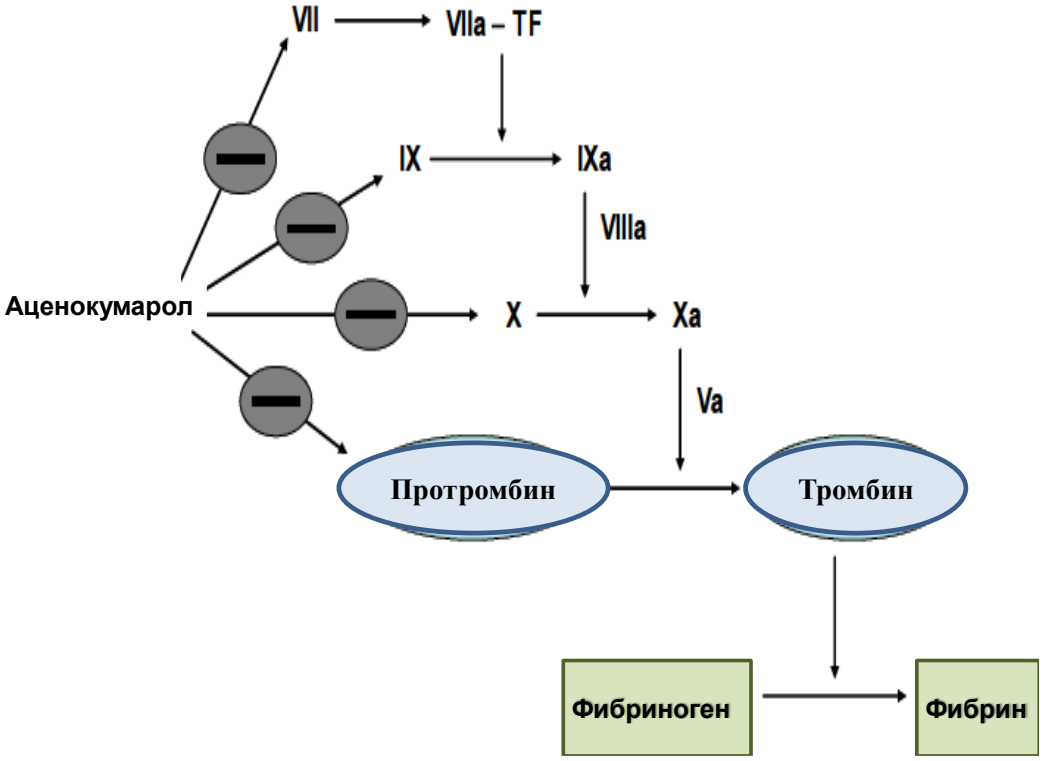
Аценокумарол представлява антагонист на витамин К, мастноразтворим витамин, необходим за активирането на основните фактори на кръвосъсирването, участващи в коагулационната каскада (фактори II-протромбин, VII, IX и X). Тези фактори са гликопротеини с остатъци от глутаминова киселина (Glu), които биват трансформирани посредством γ-карбоксилиране до γ-карбоксиглутаминови (γ-карбокси-Glu) остатъци. Свързването на калций към тези остатъци води до конформационни промени в структурата на факторите на кръвосъсирване, които са необходими за осъществяване на техните функции в коагулационната каскада. Стъпката на γ-карбоксилиране се катализира от витамин К – зависим ензим γ- глутамилкарбоксилаза (GGCX), за която редуцираната форма на витамин К (витамин К хидрохинон) играе ролята на кофактор. По време на стъпката на карбоксилиране витамин К хидрохинонът се окислява до витамин К-2,3-епоксид, който бързо се редуцира с цел предотвратяване на натрупването на витамин К в тъканите. Първата стъпка в този редукционен процес се катализира от витамин К епоксид редуктазният комплекс (VKOR) (**Фиг.1.16**) [16].



Фиг.1.16. Механизъм на действие на аценокумарол посредством инхибиране на цикъла на витамин К (преработено по [125]).

Всички кумаринови производни инхибират VKOR, което е основа на техния антикоагулантен ефект. Това от своя страна води до изчерпване на редуцираната форма на

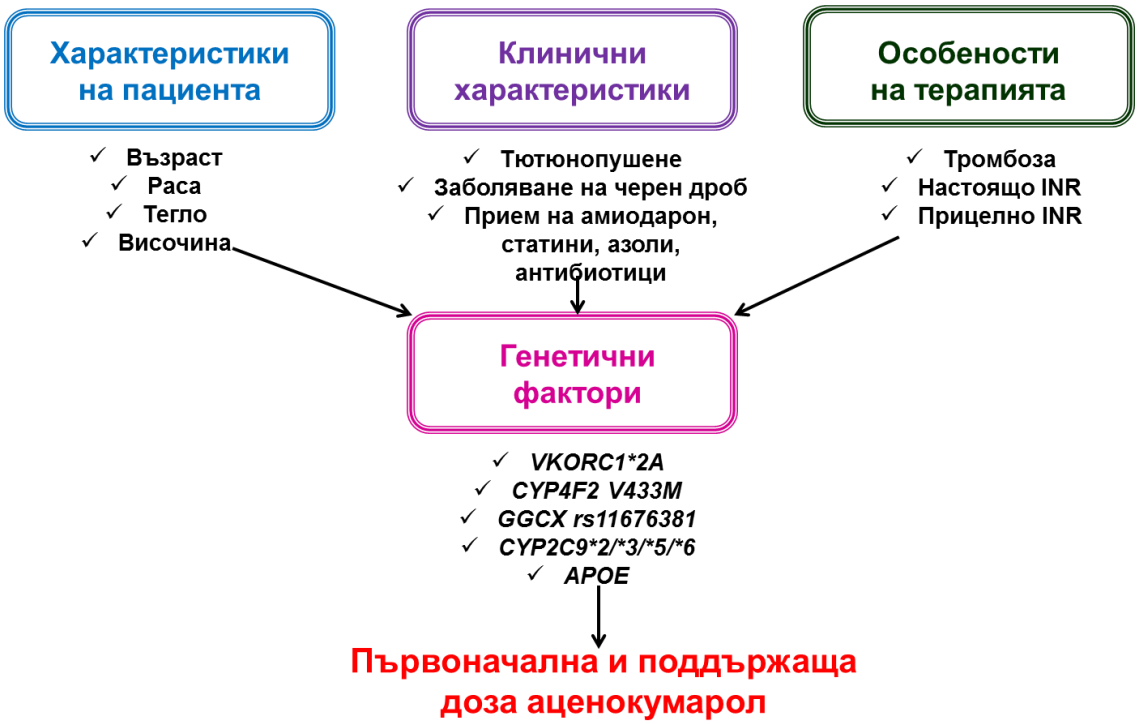
витамин К (витамин КН2). Тъй като витамин К е кофакторът необходим при реакцията на карбоксилиране на N-крайните глутаматни остатъци на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирване, това ограничава процеса на карбоксилиране и последващото активиране на коагулантните протеини. Синтеза на витамин К-зависими коагулационни фактори II, VII, IX, X и антикоагулантните протеини С и S се инхибира, което води до повишаване на нивата на протромбиновото време и понижаване на тромбогенността на образуваните тромби (**Фиг. 1.17**). Пълният ефект на действието на кумарините се проявява след няколко дни, защото понижаването на нивата на факторите на кръвосъсирване до прицелните ниски стойности зависи от техния полуживот, вариращ от ¼ ден за фактор VII до 2 ½ дни за протромбин. [16]



Фиг. 1.17. Инхибиращо действие на аценокумарол върху факторите на кръвосъсирване II, VII, IX и X и потискане на коагулационната каскада (преработено по [100]).

1.5.2.3. Роля на генетичните фактори при оптимизиране на терапията с аценокумарол

Един от главните проблеми на терапията с аценокумарол е тесният му терапевтичен индекс. Съществува голямо разнообразие в отговора към терапията с този медикамент, дължащо се на влиянието на факторите на околната среда, възраст, пол, раса, прием на други медикаменти, заболявания на черния дроб и щитовидната жлеза, ИБС, треска, малигнени заболявания и не на последно място генетични фактори, което прави трудно определянето на оптималната доза антикоагулант [16] (**Фиг.1.18**).



Фиг. 1. 18. Предполагаеми механизми, водещи до вариабилност в индивидуалния отговор към аценокумарол (преработено по [42]).

Добре известно е, че полиморфни варианти в гените *CYP2C9* (цитохром P450 2C9) и *VKORC1* (субединица 1 на витамин К епоксид-редуктазния комплекс) оказват съществено влияние върху поддържащата доза кумаринови антикоагуланти. Генът *VKORC1* кодира субединица 1 на витамин К епоксид-редуктазния комплекс (VKORC1) – ензим, участващ в цикъла на витамин К и обмяната на веществата. Генът *CYP2C9* кодира ензим от групата на цитохром P450 (цитохром P450 2C9). Полиморфните вариантите в тези два гена са отговорни за над 30% от индивидуалните вариации в дозирането на аценокумарол. Други важни фактори, оказващи влияние, са възраст на пациента, хранителен режим, височина и тегло, потенциални лекарствени взаимодействия, като например едновременното приложение на амиодарон и други лекарствени средства, които могат да повишат или понижат активното действие на аценокумарол. Едновременното носителство на генотипите *CYP2C9*2/*3, VKORC1 1173TT* и *VKORC1-1639AA* е свързано с висок риск от тромбози. Тези пациенти изискват изключително ниски дози антикоагулант, като при тях има и значително повишен риск от кръвоизливи [120].

Полиморфни варианти в гени, участващи в транспорта и метаболизма на витамин К и в цикъла на витамин К също биха могли да имат отношение към чувствителността при терапия с аценокумарол. Някои изследователи установяват такъв независим ефект на гена *GGCX*, кодиращ ензима γ-глутамилкарбоксилаза, който катализира процеса на карбоксилиране на факторите на кръвосъсирване от коагулационната каскада. Независимо от това има и изследвания, които не потвърждават този ефект. Някои проучвания предполагат слабото влияние на полиморфни варианти в гените за коагуационни фактори VII и X, в *EPHX1*, кодиращ микрозомална епоксид хидролаза (субединица на VKORC, притежаваща витамин К свързващо място), в *APOE*, кодиращ чернодробния лиганд ApoE (участващ в усвояването на витамин К) и *PROC*, кодиращ деактивиращ протеин С на коагулационни фактори Va и VIIIa. Caldwell et al. Откриват полиморфен вариант в гена *CYP4F2*, отговарящ за приблизително 2% от вариабилността в дневната поддържаща доза аценокумарол [16].

В последните няколко години са разработени няколко фармакогенетични алгоритми за дозиране на аценокумарол при различни популационни групи. Посредством търсене в базата данни PubMed, към юли 2014 год. Бяха идентифицирани осем на брой фармакогенетични алгоритми [126-133]. Всички модели включват както клинични променливи (възраст, пол, индекс на телесна маса – ИТМ, съпътстващо лечение, прием на витамин К), така и генетични

фактори като полиморфни варианти в гените *CYP2C9, VKORC1*, *APOE* и *CYP4F2*. Осемте математически алгоритъма базирани на различни популационни групи, които бяха намерени в медицинската литература са разработени от следните изследователски групи с ръководители: Markatos., Ван Schie et al., Borobia et al., Rathore et al., Cerezo-Manchado et al., Kumar et al., Pop et al. И Wolkanin-Bartnik J. Et al. [126-133].

Всички специфични алгоритми за дозиране на аценокумарол към юли 2014 год. Са изброени в **Табл 1.2.**

Табл 1.2. Основните характеристики на фармакогенетичните алгоритми за дозиране на аценокумарол при различни популационни групи

Изследователска група	Година	Националност	Брой на изследваните пациенти	Полиморфни варианти в различни гени	Клинични фактори	R^2 (%)	MAE (мг/ден) във валидиращата група
Markatos et al. [127]	**2008**	**Гърция**	**98**	*CYP2C9,VKORC1*	възраст, пол, комедиация	55.0%	-
van Schie et al. [133]	**2011**	**Холандия**	**400**	*CYP2C9,VKORC1*	възраст, височина, тегло, пол, комедиация	56.0%	0.52
Borobia et al. [128]	**2012**	**Испания**	**117**	*CYP2C9,VKORC1, CYP4F2, APOE*	възраст, ИТМ, комедиация, комедиация	60.6%	0.54
Rathore et al. [132]	**2012**	**Индия**	**125**	*CYP2C9,VKORC1, CYP4F2, GGCX*	възраст, тегло, височина, BSA, пол, тютюнопушене, диагноза	41.4%	0.71
Cerezo-Manchado et al. [131]	**2013**	**Испания**	**973**	*CYP2C9,VKORC1, CYP4F2*	възраст, BSA, пол	50.0%	-
Kumar et al. [129]	**2013**	**Индия**	**170**	*CYP2C9,VKORC1*	възраст, ИТМ	32.5%	-
Radu Pop et al. [126]	**2013**	**Румъния**	**200**	*CYP2C9,VKORC1*	възраст, ИТМ	41.4%	0.78
Wolkanin-Bartnik et al. [130]	**2013**	**Полша**	**167**	*CYP2C9,VKORC1*	възраст, ИТМ	49.0%	0.63

Тези алгоритми са популационно-специфични и обясняват различен процент от вариабилността в дозата индиректен антикоагулант.

1.5.2.3.1. *CYP2C9*

Генът *CYP2C9* е локализиран върху хромозома 10 (10q24.2). Обхваща регион от 55 кб и съдържа 9 екзона, транслиращи се в белтък от 490 аминокиселини (АК). Генът е високо полиморфен. Към настоящия момент са описани над 30 несинонимни полиморфни варианта, които показват висока междуетническа вариабилност в честотата си. Най-честият алел е *CYP2C9*1* (див тип) и доминира при всички етнически групи. При Кавказките популации други два често срещани алели са *CYP2C9*2* (rs1799853, 430C>T, 8-19%) и *CYP2C9*3* (rs1057910, 1075A>C, 4-16%). Двата варианта са локализирани в кодиращата част на гена и водят до аминокиселинна замяна в изоензима, което понижава метаболитния му капацитет към неговите субстрати [16].

Някои по-късно идентифицирани полиморфизми в този ген водещи до понижена (*CYP2C9*5, CYP2C9*11*) или липсваща (*CYP2C9*6*) ензимна активност са идентифицирани при афроамериканци с ниска алелна честота [16].

1.5.2.3.2. *VKORC1*

Витамин К епоксид редуктазата (VKOR) представлява молекулярна цел за действието на индиректните антикоагуланти, затова идентифицирането и молекулярното характеризиране на гена, кодиращ VKOR (*VKORC1*) е повратна точка в изясняването на фармакогенетиката на оралната антикоагулантна терапия [134]. Ензимът участва в цикъла на витамин К, като

генетични варианти във *VKORC1* са свързани с дефицит на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирване (II, IIV, IX и X) от коагулационната каскада и повишена чувствителност към терапия с кумаринови антикоагуланти. Проведени са голям брой проучвания, които изясняват влиянието на тези варианти и отговора към лекарствена терапия с АЦ. Носителството на полиморфен вариант -1639 G>A в промотора на гена се свързва с изискване за по-ниски дози аценокумарол [131-133, 135-140]. Носителите на полиморфен алел за този маркер се нуждаят от значително по-виска оптимална поддържаща доза антикоагулант, необходима за постигане на прицелно INR в диапазона между 2.0 и 4.5 [131-133, 135-140]. През последните няколко години тази връзка е установена и впоследствие потвърдена в различни групи от населението, като влиянието на тези полиморфизми по отношение на оптималната доза антикоагулант варира в различни проучвания [131-133, 135-140]. Полиморфизмите 1173C>T в интрон 1 и 3730 G>A в 3' UTR на *VKORC1*се намират в неравновесна скаченост с -1639 G>A в промотора на гена, който отговаря за изискването на ниска доза медикамент [134]. Именно затова VKORC1 -1639 G>A се очертава като полиморфен вариант с най-голямо значение по отношение на фармакогенетичния отговор при терапия с кумаринови антикоагуланти. Установено е, че понижената VKOR активност е свързана именно с носителството на този полиморфен вариант [134].

В допълнение към полиморфния вариант в промоторната област на гена VKORC1 (-1639 G> A) такива в некодиращите региони също допринасят значително за определяне на варфариновата и аценокумароловата поддържаща доза [141-143]. Установено е също, че хаплотипите на гена VKORC1 са свързани с голяма вариация в изискуемата доза антикоагулант. Предишни изследвания разглеждат хаплотипи 2B, 3 и 4, като носителите на тези варианти се нуждаят от по-високи дози медикамент в сравнение с носителите на дивия тип [141-143].

1.5.2.3.3. *CYP4F2*

Освен генетични полиморфизми в гените *CYP2C9* и *VKORC1* различни проучвания съобщават, че полиморфни варианти в гена *CYP4F2* (rs2108622; V433M; 1347 C>T) също са важни предиктори на дневната подържаща доза АЦ, като допринасят за 1-2% от вариабилността в дозата на пероралните антикоагуланти [144]. Проведени по-рано изследвания включват и този фактор в създадените от тях фармакогенетични модели за предсказване на оптималната поддържаща доза медикамент [128, 144, 145]. Проучване на целия геном, проведено от Teichert et al.. [146, 147] показва, че освен клинични променливи, като възраст, пол, индекс на телесна маса и прицелно INR, генетични полиморфизми в гените *CYP2C9, VKORC1, CYP4F2* и *CYP2C18* определят 48,8% от вариабилността в дозата аценокумарол. Въпреки това влиянието на *CYP2C18* е едва 1,2%, като това влияние не е определено като значимо. Други изследвания в тази насока показват, че ефектът на *CY2C18* е свързан с изискване на по – ниски доза от медикамента [148, 149].

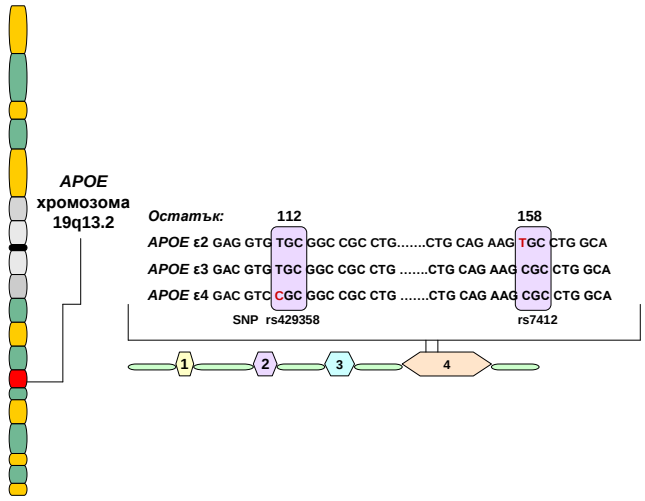
1.5.2.3.4. *APOE*

Генът за аполипопротеин ε (*APOE*) се намира върху дългото рамо на 19 хромозома в район 13.2. Той е член на аполипопротеиновото мултигенно семейсво, включващо още гените *APOA-I, APOA-II, APOC-I, APOC-II* и *APOC III*. Кодиращите региони на тези гени са съставени от тандемни повтори на 11 кодона, което предполага, че те са се развили посредством дублиране на прекурсорен ген [150].

Генът за АроЕ се състои от четири екзона и три интрона, обхващащи 3 597 нуклеотида, и кодира полипептид от 299 аминокиселини. Протеинът се синтезира предимно в черния дроб, но също така и в мозък, далак, бъбреци, полови жлези, надбъбречни жлези и др. [151]

Генът *APOE* е високо полиморфен с три общи алела: * ε2, * ε3, и * ε4. Тези алели могат да бъдат обединени в шест различни генотипи: *APOE *ε2/*ε2, APOE *ε3/*ε3, APOE *ε4/*ε4, APOE *ε2/*ε3, APOE *ε3/*ε4* и *APOE *ε2/*ε4* (**Фиг. 1.19**) [152]. Трите алела произвеждат три изоформи на аполипопротеина – Е2, Е3 и Е4, които се различават по аминокиселините в позиции 112 и 158 на белтъчния продукт. Изоформата АроЕ 3 съдържа цистеин в 112 и аргинин

в 158 позиция. Изоформата ApoE 2 има цистеин в двете позиции, докато ApoE 4 има аргинин на двете места [153]. Полиморфизмите в *APOE* оказват значителен ефект върху нивата на аполипопротеините в кръвта: алелът *ε2 се свързва с по-високи концентрации на ApoE, докато алелът *ε4 определя по-ниски концентрации на генните продукти [154].



Фиг 1.19. *APOE* е локализиран върху хромозома 19 и притежава три различни алела, които са сравнително често срещани при различните популации (*APOE* *ε2, *APOE* *ε3 и *APOE* *ε4) [152].

Трите алела на гена *APOE* са представени с различна честота при отделните популации. При населението от Северна Европа (финландци, немци) се наблюдават по-високи честоти (~ 14-19%) на * ε4 алел в сравнение с населението на Южна Европа (французи, италианци) (~ 7-12%). Нигерийци, японци и финландци имат относително ниски честоти (~ 3-4%) на * ε2 [154]. Американските мексиканци и американските индианци също имат ниски честоти (~ 2-4 %) на *ε2 алел. В група, състояща се от девет племена на Южно – американски индианци няма нито един случай на *ε2 [154].

Ефектът на генотипа на *APOE* би могъл да бъде частично обяснен с промяна на транспорта и усвояването на витамин К от гастроинтестиналния тракт към черния дроб (ЧД): лица, носители на алела ApoE*ε4 показват по-бързо усвояване на липопротеините в ЧД и по-ниски нива на циркулиращ витамин К в сравнение с носителите на алели *2 и *3. Следователно пациенти, носещи *ε4 алел имат ускорено поемане на витамин К в черния дроб и се нуждаят от по-висока доза аценокумарол. Този модулиращ ефект е потвърден при афро-американци, но не и сред представители на европеидната раса. Това предполага, че е възможно ефектът на ApoE да бъде популационно специфичен [155].

1.5.2.3.5. *GGCX*

Човешката γ-глутамил корбоксилаза (GGCX) е идентифицирана преди почти 30 години. В гена, кодиращ този ензим, са установени три редки мутации, водещи до дефицит на всички витамин К-зависими фактори на кръвосъсирването. При японските пациенти на терапия с кумаринов антикоагулант микросателитен маркер интрон 6 на *GGCX* 6 (CAA повтор), е независимо свързан с повишена чувствителност към лечение с този тип медикаменти. Хетерозиготите за 13, 14, 15 или 16 повтора или хомозиготите за 13 повтора, се нуждаят от по-високи поддържащи дози, в сравнение с пациенти, носители на по-малък брой повтори. В допълнение, е установен полиморфизъм в интрон 2, който определя необходимостта от по-високи дози индиректен антикоагулант. Наскоро несинонимен вариант Arg325Glu в рамките на екзон 8 на *GGCX*, е свързван с междуетническа вариабилност в антикоагулантната доза. Полиморфизмът се намира в областта, където са разположени аминокиселинните остатъци 343-355, които посредничат при взаимодействието на ензима с неговия субстрат. Въпреки това са

необходими по-големи проучвания при различни етнически групи, за да се изясни влиянието на *GGCX* по отношение на терапията с кумаринови производни [156].

1.5.2.3.6. *CALU*

Резистентността към терапия с кумаринови производни е свързана с повишена експресия на калуменин, протеин от групата на шапероните. Генът, кодиращ калуменин при човека е разположен върху хромозома 7 (7q32) и се състои от 6 екзона, като кодира протеин с дължина от 315 аминокиселини. Калуменин е член на CREC подсемейство на Ca2+ свързващите протеини (Cab-45, ретикулокалбин, ERK-45 и калуменин), при които Efhand мотив участва във свързването на Ca2+. Въпреки, че е хидрофилен, водоразтворим, киселинен протеин, калуменин се свързва с мембранни протеини. Експресията на калуменин в COS-1 клетки инхибира активността на VKOR и е причина за резистентност към варфарин Калуменин се свързва с голям протеинов комплекс като шаперон и регулира дейността и чувствителността към индиректни антикоагуланти на витамин К-зависимата система за карбоксилиране. [156].

1.5.2.3.7. *mEH*

Човешката микрозомална епоксид хидролаза (mEH) представлява ксенобиотик-метаболизиращ ензим, който детоксикира реактивни епоксиди до по-водоразтворими съединения. Предполага се, че това е една от субединиците на комплекса VKOR и вероятно се закрепя в мембраната на ендоплазматичния ретикулум с един трансмембранен домен. По-ранни проучвания показват, че mHE представлява свързващ сайт във витамин К епоксид редуктазния комплекс. В кодиращия регион на гена *mHE* са идентифицирани два полиморфни варианта. Единят е T612C, който води до замяна на тирозин с хистидин в 113 позиция в белтъчната молекула (Tyr113His). Другият полиморфизъм (A691G) води до замяна на хистидин с аргинин в 139 позиция (His139Arg). Установено е, че вариантът T612C оказва влияние върху дозирането на варфарин.

1.5.2.3.8. *MDR1*

След като се абсорбира в тънките червата, варфарин се транспортира до хепатоцитите от мембранния транспортер ABCB1 (означаван още като; MDR1). Получени са положителни резултати за връзката на варианта C3435T в гена *ABCB1* с отговора към лекарствена терапия с кумаринови производни при кавказката раса. Протеинът има ниска активност в хепатоцитите, което води до високи нива на варфарин в прицелните клетки, което обяснява защо пациенти, носещи алел 3435T имат повишена чувствителност към медикамента [156].

1.6. Генетични изследвания при сърдечно-съдовите заболявания

1.6.1. Исхемична болест на сърцето и инфаркт на миокарда

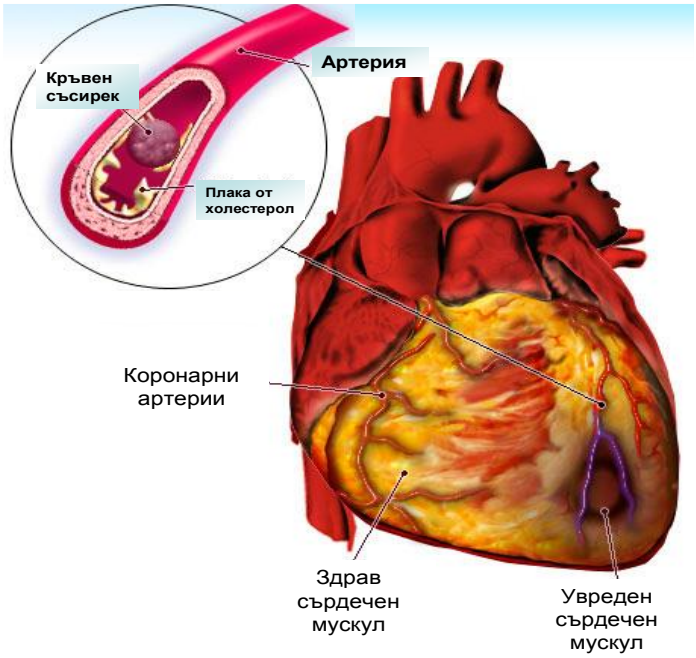
Исхемичната болест на сърцето (ИБС) и нейното най-често усложнение – инфаркт на миокарда (ИМ) представляват най-честата причина за заболеваемост, инвалидизация и смъртност в индустриалните страни, включително и у нас. Исхемичната болест се дължи на стеснение или запушване на една или повече епикардни коронарни артерии, в резултат на което достъпът на кислород към сърцето е прекъснат и настъпва миокардна исхемия (Фиг. 1.20). Най-честата причина за миокардната исхемия е атеросклерозата (90-95% от всички случаи) на големите и средно големите епикардни коронарни артерии с или без прибавен коронарен артериален спазъм, с или без прибавена коронарна тромбоза [174].

Това е мултифакторно заболяване, чието проявлението зависи от сложното взаимодействие на влиянието на средата и множество генетични компоненти. Основните рисковите фактори, оказващи съществено влияние за развитие на ИБС, са повишеното съдържание на холестерол в

кръвта, артериалната хипертония (АХ), тютюнопушенето, наднорменото тегло, обездвижването, захарния диабет и др. Не на последно място важна роля имат и наследствените фактори. В зависимост от тежестта на запушване на коронарните артерии и от времето, което то продължава, функционирането на сърцето може да бъде увредено обратимо или небратимо [175]

ИБС се провокира най-често от наличието на частично оклузиращ (запушващ) вътрекоронарен тромб, който води до остър дисбаланс между кислородните нужди и консумации на миокарда от една страна и коронарния кръвоток от друга. В резултат на описаното запушване до клетките на сърцето достигат по-малко хранителни вещества и кислород (възниква т.нар. исхемия), което води до нарушаване на функциите му [157].

Миокардният инфаркт представлява остро възникнала некроза (смърт) на миокардни клетки, която се развива под въздействие на различни причини, провокиращи остра исхемия на миокарда. Най-често това става при атеросклеротично засягане на една или повече коронарни артерии с остро развитие на интракоронарна тромбоза. В резултат на тези изменения настъпва временно или трайно запушване на един или повече кръвоносни съдове съдове (Фиг.1.20) [157].



Фиг 1.20. Схематично представяне на пораженията, настъпили в резултат на запушване на коронарна артерия и последващ миокарден инфаркт (преработено по [157]).

Най-голяма честота на клинично изразената ИБС се наблюдава след 60-тата година при мъжете и след 70-тата година при жените [278]. България е сред страните с най-висока смъртност в Европа от атеросклеротични увреждания на съдовете, кръвоснабдяващи сърцето. Особено тревожен е фактът, че през последните години се засягат все по – млади индивиди. Епидемиологичните наблюдения показват, че мъжете в България имат най – високо нарастване на сърдечно – съдовата смъртност в световен мащаб. Така сърдечно – съдовата смъртност сред българските мъже сама по себе си надвишава средната обща смъртност сред мъжете в Европейския съюз.

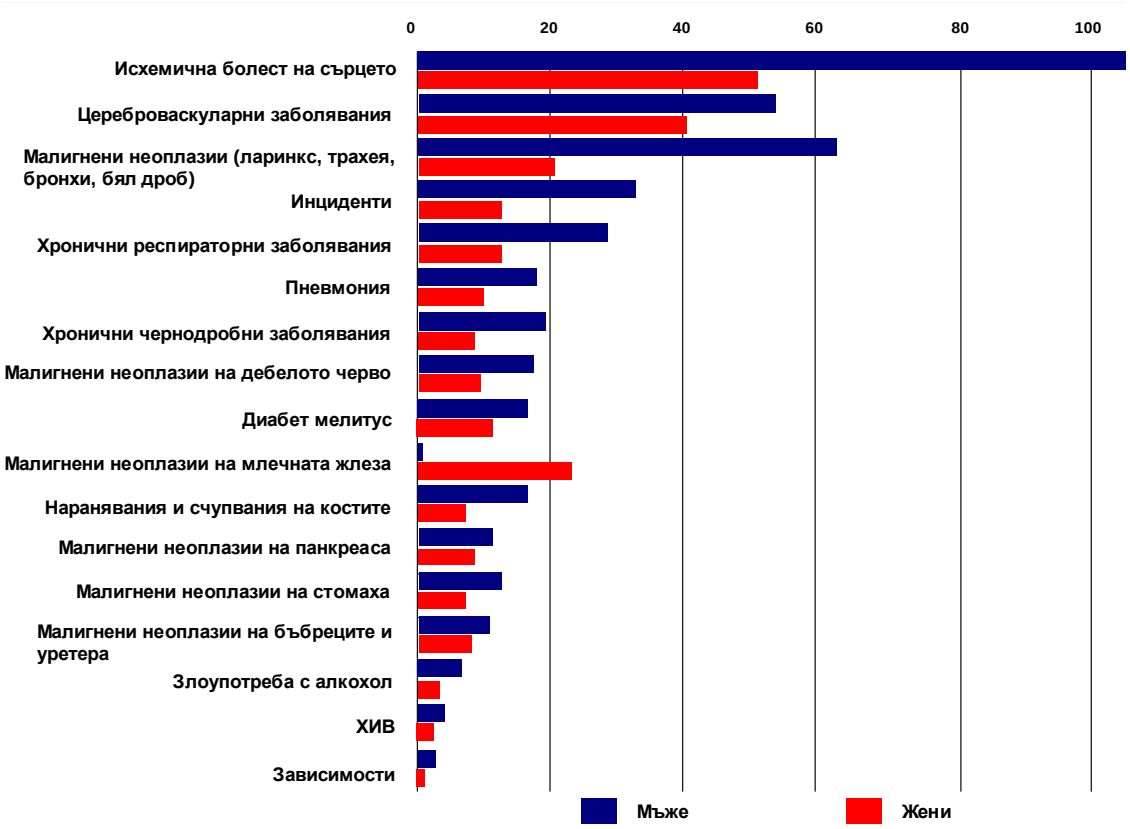
1.6.1.1. Епидемиология на исхемична болест на сърцето и инфаркт на миокарда

По данни на Световната Здравна Организация ССЗ представлявят водеща причина за смърт в Европа, Северна Америка и Азия – повече от 15 000 000 смърни случая през 2014 г., което

представлява 29.6% от всички починали. Преждевременната смъртност от ССЗ сред мъжете варира почти 10-кратно с честота <65 на 100 000 под 75 годишна възраст в Сан Марино, Франция, Израел и Швейцария, до над 560 на 100 000 души в Руската федерация и Беларус. Сред жените, смъртността е сходна, като пет страни показват честота по-малка от 25 смъртни случая на 100 000 под 75 години (Франция, Исландия, Швейцария, Израел и Испания) и 10 страни – над 200 на 100 000 случая годишно. Наблюдава се понижаване на долната възрастова граница със засягане на пациенти дори под 30-годишна възраст с повишен леталитет. Рискът при жените преди менопаузата е по-нисък от този при мъжете за всички възрастови групи в този диапазон. След менопауза при жените рискът за двата пола се изравнява, а след 70 год. Рискът за жените нараства в по-голяма степен [158].

Сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ) продължават да бъдат водеща причина за инвалидизация и смъртност и сред страните от Европейския съюз като са причина за смъртта на повече от 4 милиона души годишно (половината от всички смъртни случаи в Европа). Като цяло, сърдечните заболявания са причина за 51% от смъртните случаи сред жените и 42% сред мъжете, в сравнение със съответно 19 и 23% при злокачествените заболявания. Страните с най-висока смъртност от заболявания на ССС сред представителите от мъжки пол са Белгия, Дания, Франция, Израел, Люксембург, Холандия, Португалия, Словения, Испания и Сан Марино. Тютюнопушенето, неправилното хранене, намалената физическа активност и злоупотребата с алкохол повишават риска за ССЗ, като се очаква през 2030 година смъртните случаи от това заболяване да достигнат 23 600 000 годишно [158].

От своя страна, исхемичната болест на сърцето е причина за 876 017 смъртни случая в ЕС през 2014 г (20% от всички смъртни случая годишно). Държавите — членки на ЕС с най-високи коефициенти на смъртност от ИБС са тези от балтийския регион, Словакия, Чехия, Хърватска и Унгария, като през 2014 г. Във всяка от тях има над 200 смъртни случая на 100 000 души население. На другия край на скалата Франция, Португалия, Холандия и Испания имат най-ниски коефициенти на смъртност от ИБС — под 70 смъртни случая на 100 000 души население през 2014 г [158].



Фиг 1.22. Брой смъртни случаи от ИБС на 100 000 население в световен мащаб (2010) (Eurostat Statistics Database, http://ec.europa.eu/eurostat/help/new-eurostat-website).

Петгодишната преживяемост при пациенти с едноклонова коронарна артериална болест (КАБ) е 92%, с двуклонова КАБ – 65%, а с триклонова КАБ – 55%. При установяването на значими лезии (≥75%) прогнозата е по-лоша-преживяемост съответно 91%, 59% и 45% за едно-, дву- и триклонова КАБ. Пациентите със стволова стеноза са с по-лоша прогноза спрямо групите, посочени по-горе, но липсват данни за преживяемостта за петгодишен период. Наличието на сърдечна недостатъчност (СН) или АХ допълнително влошават прогнозата. От пациентите с ИБС и СН само 38% преживяват 5 години, а тези с АХ – 61% [159].

В България средно между 60 и 70% от всички смъртни случаи се дължат на сърдечно-съдови заболявания. През 2010 г. Са починали 74 392 души (67,5% от всички случаи), през 2009 г. Броят им е бил с 3 086 по-малко (66%), а през 2012 г. Починалите представляват 65% от общата смъртност. По данни на Националния център по здравна информация, най-голям брой от хоспитализираните случаи в България поради ССЗ се дължат на болестите на коронарните съдове – 748,3 на 100 000 души от населението, като водеща причина за смъртност при тях е МИ – 91,2 на 100 000 души от населението. Статистическите данни показват тенденция към нарастване на заболеваемостта от миокарден инфаркт в България – 200.57 през 2007 г., 208.3 през 2008 г., 216 през 2009 г. И 223.8 през 2010 г. На 100 000 души от населението. Същевременно се наблюдава известна тенденция към понижаване на смъртността от МИ – 83,7 през 2007 г., 83,3 през 2008 г., 82,9 през 2009 г. И 82,5 през 2010 г. На 100 000 души от населениетоПострадалите във възрастовата група от 35 до 55 години са малко над 4 300. И въпреки, че рискът е по-голям за хората в по-напреднала възраст, случаи на инсулт сред младите хора до 35 години също има – близо 200 през 2012 г.

Над 60% от общата смъртност в България през последните години се дължи на ССЗ, в това число остър инфаркт на миокарда, хипертонични болести и мозъчно-съдови болести. В България през 2012 г. Има 50 783 получени инсулта, от които смъртните случаи са 7 535. Всяка година близо 6000 българи умират от остър инфаркт на миокарда и други форми на ИБС. Общо около 13 – 15 хиляди са инфарктите, които се регистрират годишно в България. В България сърдечносъдовите заболявания са причинител на половината от смъртните случаи сред мъжете преди 75-годишна възраст. Във възрастовата група до 65 години те причиняват смъртните случаи на около 43% при мъжете и 38% при жените (Национален статистически институт, 2014).

1.6.2. Първична артериална хипертония

Артериалната хипертония (АХ) представлява основен количествен, сърдечно-съдов рисков фактор, отговорен за над 50% от сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност по целия свят, особено в бързо развиващите се страни. Повишените стойности на артериалното налягане (АН) се наблюдават по-често при мъжете в сравнение с жените, както и при хората с нисък социално-икономически сатус [160]. Епидемиологичните данни от голям брой проучвания в тази насока показват, че възникването на АХ се дължи на едновременното и комбинирано влияние на генетични фактори и фактори на променящата се околна среда, както съществено значение оказва и конкретния начин на живот на индивида [161]. Именно поради тази причина, хипертонията е определена като комплексно, мултифакторно заболяване, при което делът на генетичния компонент е между 30% и 50% [162].

Артериалната хипертония се подразделя на два основни типа: първична (наречена още есенциална) и вторична. Около 90–95% от случаите на повишено артериално налягане се отнасят към категорията „първична хипертония“. При този тип хипертония няма явно установена здравословна причина за наличието на високи стойности на артериално налягане [160, 163-165]. Останалите 5–10% от случаите се причисляват към т. Нар. Вторична хипертония, дължаща се на заболявания, които засягат основно бъбреците, коронарните артериите, сърцето или ендокринната система [160, 163-165].

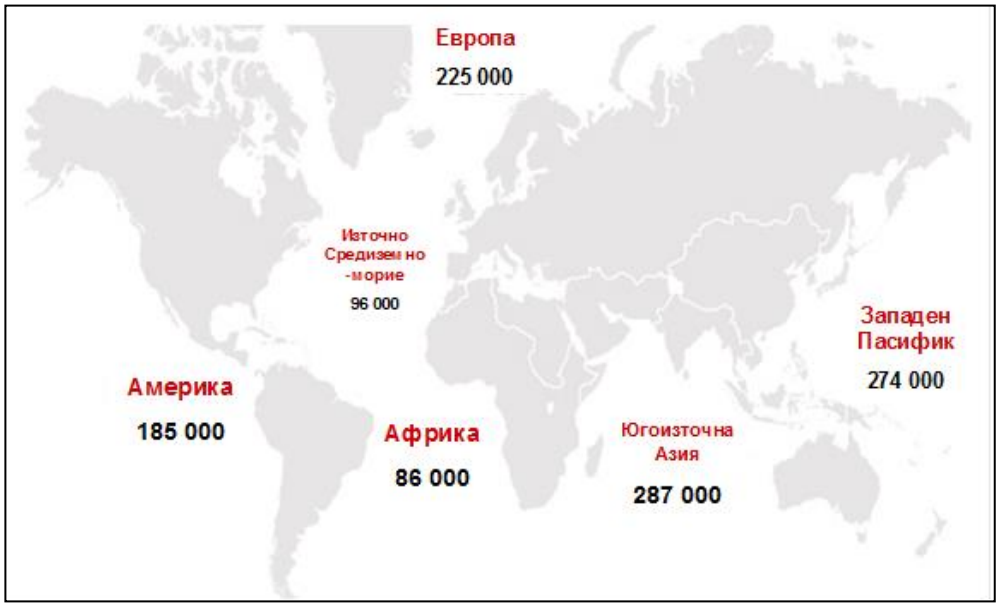
Много патофизиологични фактори и механизми са замесени в произхода на първичната артериална хипертония (ПАХ). В това число се включват: повишена активност на симпатиковата нервна система, вероятно свързана с продължително излагане или повишен отговор на организма към психосоциален стрес; свръхпроизводство на хормони, потискащи

секрецията на натрий в организма и вазоконстриктори; повишен прием на натрий; неадекватен хранителния прием на калий и калций; увеличена или неподходяща секреция на ренин с последващо увеличаване на производството на ангиотензин II и алдостерон; недостатъчно производство на вазодилататори, като например простациклин, азотен оксид (NO) и натриуретични пептиди; промени в експресията на системата каликреин – кинин, която повлиява съдовия тонус и преработката на сол от бъбреците; аномалии като резистентни съдове, включително селективни лезии в малките кръвоносни съдове на бъбреците; захарен диабет; инсулинова резистентност, затлъстяване; повишена активност на съдовите растежни фактори; промени в адренергичните рецептори, които оказват влияние върху сърдечната честота, инотропни свойства на сърцето и съдовия тонус, както и промени в клетъчния транспорт на йони [164].

В последните години значително нарастна подкрепата на теорията, според която повишеното АН се предшества от структурни и функционални аномалии в съдовата мускулатура [164]. Според някои автори ендотелната дисфункция, повишената съдова реактивност, както и съдовото ремоделиране представляват по-скоро възможни причини, отколкото последици от повишаването на стойностите на АН, като повишената твърдост на кръвоносните съдове допринася за изолирана систолична хипертония при възрастни [164].

1.6.2.1. Епидемиология на първичната артериална хипертония

АХ е едно от най – честите и масови социално – значими заболявания. Според последните проучвания в нашата страна 42,8 % от мъжете и 39,7 % от жените в България на възраст от 25 до 64 години имат АХ. Клиничните епидемиолози считат, че 30-31% от българското население или около 2 250 000 души имат повишено артериално налягане (**Фиг 1.23**) [166].



Фиг 1.23. Брой смъртни случаи в резултат на артериална хипертония в световен мащаб, 2010 (http://directorsblog.nih.gov/high-blood-pressure-a-global-health-threat)

Честотата на АХ има възрастова зависимост. Тя нараства с увеличаването на възрастта и около 50 % от хората над 50 години са с повишено АН. Наблюдава се неблагоприятна тенденция в епидемиологията на АХ – заболяват все повече хора в млада и активна възраст. Едновременно с това се увеличава значението й за възникване на основните сърдечно – съдови заболявания с атерогенно – свързана генеза, които са основна причина за по-голямата преждевременна смъртност сред хипертониците. Въпреки забележимия напредък във фармакотерапията и възможностите за профилактика на АХ, тяхната ефективност все още не е висока. По-голяма част от болните трудно постигат контрол на повишеното АН. Това е

причина за ранни увреждания на жизнено важни органи (мозък, сърце, бъбреци и др.), за сериозно влошаване на качеството на живот на болните и за по-високата смъртност на хипертониците. Повечето от болните с АХ са с неадекватно контролирано АН, включително и в страните, в които болните имат по-големи икономически възможности за лечение. В България само при около 6 – 10% от болните с АХ е постигнат добър контрол върху повишеното АН. Увеличаването на разходите за болните с АХ не се съпровожда с по-добри медицински и медико – социални резултати, което е един от най-сериозните и актуални проблеми на медицината и здравеопазването [167].

Независимо от това е трудно да се постигнат сравними ефекти върху АН в различните страни с течение на времето. Ето защо е предложено да се използва сурогатен маркер на хипертоничния статус като смъртността от инсулт. Въз основа на статистически данни на СЗО, западноевропейските страни показват тенденция към намаляване на смъртността от инсулт, докато източноевропейските страни показват ясно изразено увеличение. Базирайки се на 21 публикации от последното десетилетие, хипертонията обхваща 30-45% от възрастното население и нараства с напредване на възрастта. Явно е, че са налице значими разлики в средните нива на АН в различните страни без системна тенденция за промени на АН през последното десетилетие [168].

1.6.3. Роля на геномните, асоциативни проучвания при определяне на риска за развитие на сърдечно-съдови заболявания

Завършването на човешкия геномен проект (The Human Genome project) и проекта Hap-Map , както и развитието на високоефективни технологии, направи технически възможно и финансово изгодно провеждането на широко мащабни асоциативни проучвания (Genome Wide Association Studies – GWAS). Геномните асоциативни проучвания се позовават на хипотезата "чести заболявания, чести генетични варианти", която предполага, че генетичното влияние върху често срещаните заболявания се дължи на голям брой алелни варианти, които се наблюдават при над 1% от индивидите в дадена популацията [169]. Поради своето изобилие и гъстота в човешкия геном, тези варианти представляват идеални полиморфни маркери при провеждането на асоциативни изследвания при комплексните заболявания и се използват за установяване на гени, отговорни за дадено заболяване.

Проучванията на много водещи европейски центрове са насочени към откриване на рискови генетични варианти чрез асоциативни проучвания на целия геном. Засега резултатите от многобройните GWAS, позволяващи едновременното тестване на стотици хиляди единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в целия геном и в голям брой проби, потвърждават факта, че генетичната предразположеност към атеросклероза на коронарните съдове е комплексна и включва множество хромозомни локуси в различни части на човешкия геном. Най-значими са резултатите за свързаност в и около белтък-кодиращи гени, но има и такива в некодиращи региони на генома. Това предполага, че причините за появата на това усложнение са свързани както с регулацията на гените, така и с тяхната кодираща функция [170]. Счита се, че предразположението към атеросклероза се дължи на комбинирания ефект от полиморфизми и мутации в гени с ниска пенетрантност.

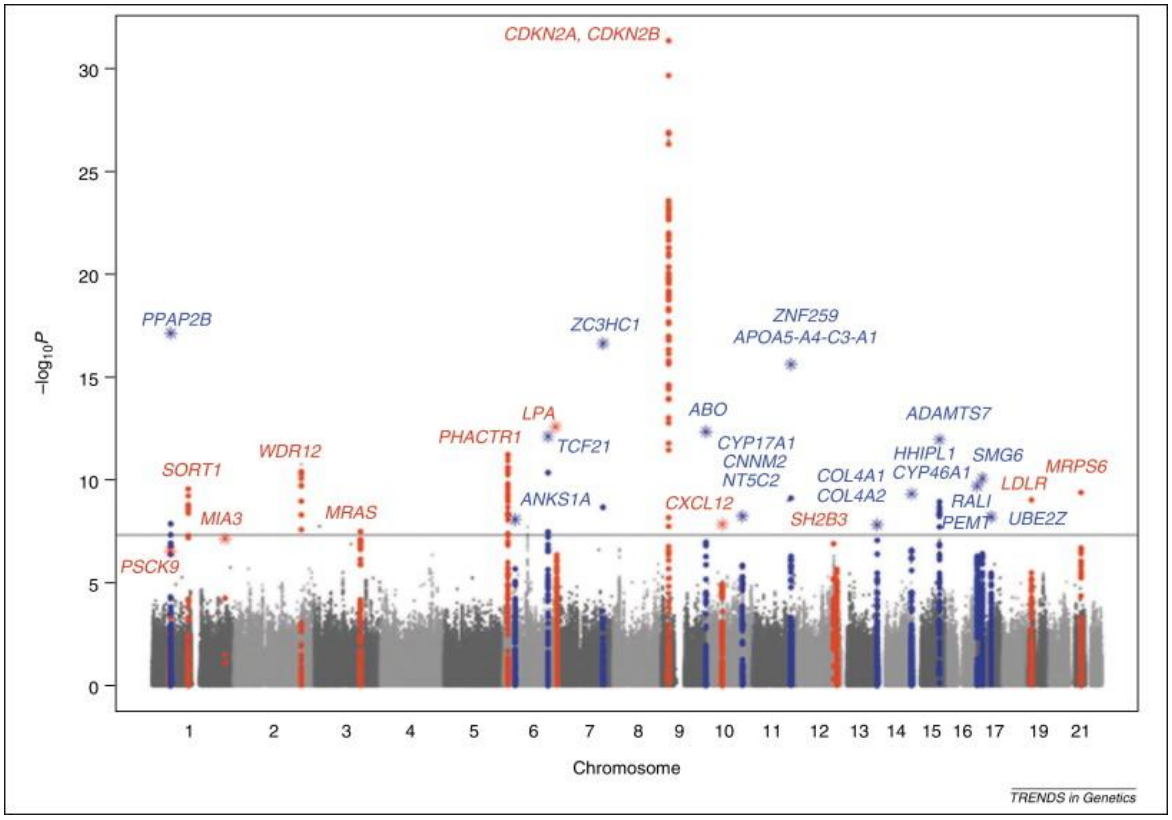
Гените, за които се смята, че имат връзка с развитието на атеросклероза, могат да бъдат разглеждани в няколко групи свързани с различни системни нарушения [171]:

- липидния метаболизъм (аполипопротеини, липолитични ензими, рецептори за липопротеини);
- системата за коагулация и фибринолиза (фибриноген, тромботични фактори, инхибитор на плазминогенния активатор тип 1);
- системата за тромбоза и тромболиза (гликопротеини на повърхността на тромбоцитите – GPIIb/IIIa, GPIa/Iia);
- ренин-ангиотензин-алдостероновата система (ангиотензиноген, ангиотензин – конвертиращ ензим, AT1 рецептор, алдостерон синтетаза);
- системата на съдоактивиращите фактори (ANP, BNP, CNP);
- системата на адхезия и миграция на моноцити и макрофаги;

- системата на възпалението (цитокини, тумор-некротичен фактор);
- системата на пролиферация на съдови гладкомускулни клетки;
- ендотелната дисфункция;
- захарен диабет;
- контрол на АН.

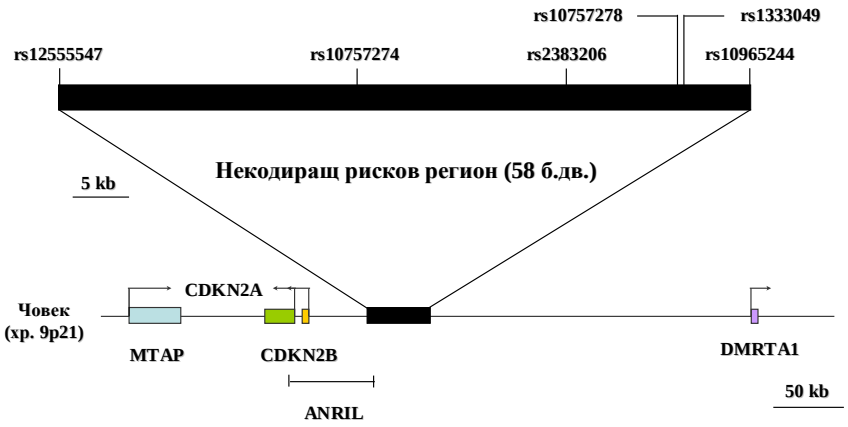
1.6.3.1. Роля на геномните асоциативни проучвания при определяне на риска за развитие на исхемична болест и миокарден инфаркт

Първите резултати от GWASs относно ИБС и нейното най-често усложнение–ИМ са получени през 2007 год. Изследователите от двата консорциума Ottawa Heart Genomic Study и de-CODE едновременно и независимо идентифицират рисков генетичен вариант (rs1333049) за ИБС, локализиран върху хромозома 9, локус 9p21 (**Фиг 1.24**) [172, 173]. Интересното в случая е, че въпросният участък е лишен от белтък–кодиращи гени. В съседство на този регион са разположени тумор–супресорните гени *CDKN2A* и *CDKN2B* [174].



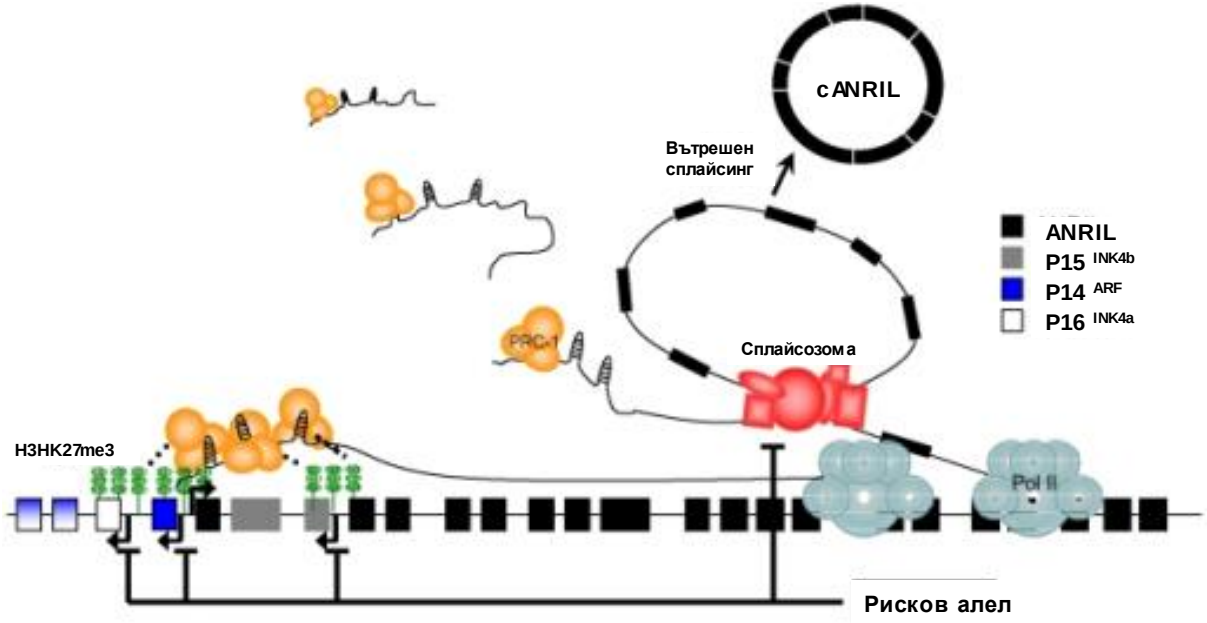
Фиг 1.24. Сигнали за асоциация на SNPs с повишен или понижен риск за ИБС и ИМ при провеждане на геномни, асоциативни проучвания сред представители от Кавказката раса [175].

По–късно откритите в този локус полиморфни варианти в близост до rs1333049 (**Фиг 1.25**) показват силна статистически значима асоциация с ИБС при репликативни проучвания на групи болни и здрави контроли от различни популационни групи [176-180].



Фиг 1.25. Единични нуклеотидни полиморфизми в локус 9p21 (преработено по [181]).

Рисковият за ИБС регион в късото рамо на девета хромозома се припокрива с екзони 13-19 от CDKN2B антисенс РНК, известна като ANRIL, която представлява голяма некодираща РНК, идентифицирана за първи път през 2007 г (**Фиг 1.26**). Районът обхваща общо над 126 000 б.дв [174]. При хората с понижен риск от сърдечно-съдово увреждане вероятно се извършва снаждане на дългата РНК в два по-малки фрагмента: къса, линейна РНК и кръгова РНК (cANRIL). За разлика от тях, при хората с повишен риск от заболяване е установена по – дълга ANRIL РНК, която по-ефективно потиска генната експресия на INK4/ARF локуса. Експресията на свързаните с INK4/ARF гени предпазва от образуване на атеросклеротични плаки и следователно хора, при които този локус е потиснат, са по-предразположени към сърдечно-съдови заболявания [182]. Генът *CDKN2B* се намира в непосредствена близост до *CDKN2A*, като и двата гена кодират циклин-зависими киназни инхибитори. В действителност, последователността на ANRIL съвпада с тази на гена *CDKN2B*. Този район е обект на изследване при редица ракови заболявания, защото гените, които регулират клетъчния растеж, са именно *CDKN2A* и *CDKN2B* [183].



Фиг 1.26. Генетичните варианти, свързани с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания като ИБС и ИМ, са локализирани в последователност от генома, която произвежда дълга, некодираща РНК, наречена ANRIL.

При провеждането на редица асоциативни проучвания 9p21 показва връзка с редица допълнителни характеристики на сърдечно-съдовите заболявания, включително формиране на атеросклеротични плаки в сънната артерия, мозъчен инсулт, аневризма, периферна артериална болест, сърдечна недостатъчност и сърдечно-съдовата смъртност [184-189].

Някои проучвания предполагат, че локус 9p21 участва при инициирането на процеса на атеросклероза, а не е свързан с неговото развитието или тежестта на заболяването [190], докато други твърдят точно обратното [191, 192]. Всички проучвания обаче показват, че полиморфни варианти в 9p21 определят по-висок риск за развитие на ИБС или ИМ в по-млада възраст (до 55 години при мъжете и до 60 години в жените) [190].

През 2011 год. The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium провежда цялостно геномно изследване, с цел идентифицирането на гени и генетични локуси асоциирани с ИБС. Изследването включва 8 424 пациенти с исхемична болест от европейски произход , както и 6 996 пациенти от азиатски произход (главно от Пакистан и Индия). Като цяло, 81% от болните, включени в проучването, са с преживян поне един ИМ, а останалата част са с потвърдена диагноза за симптоматична стенокардия или коронарна реваскуларизация на артериите със средна възраст на първото събитие под 60 години. Пет варианта в новоасоциираните локуси постигат предварително определен праг за репликация ($P<8{,}5\times10^{-4}$) В допълнение към тези локуси, полиморфният вариант rs9349379, разположен в интронната област на гена *PHACTR1*, показва значителна връзка с ИБС при геномния скан (P = 9.9×10-10) и при репликацията (P = 8.7 × 10-26) [193].

Отново през 2011 год. Изследователската група на Schunkert и съавт. Провежда мета-анализ на 14 геномни проучвания за ИБС, включващи общо 22 233 болни и 64 762 контроли от европейски произход. Един от локусите, който дава силна асоциативна връзка с ИБС е rs12526453. Въпросният маркер е локализиран в гена *PHACTR1*, хромозомен регион 6p24.1, което е в съответствие с откритието на The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium от 2011 год [194]. Подобни проучвания са проведени и за други популационни групи, като напр. Афро-американци, при които също е установена подобна асоциация [195].

През 2012 год. Колективът на Reilly и съавт. Провежда две GWAS проучвания с добре охарактеризирани и ангиографски диагностицирани с ИБС пациенти от европейски произход. За да установят локусите, които предразполагат към заболяването, авторите сравняват 12 393 болни с 7 383 здрави контроли. При съпоставяне на пациенти с ИБС, които са прекарали ИМ с такива с ИБС, но без ИМ, авторите откриват хромозомен регион 9q34.2 в рамките на гена *ABO,* кодиращ кръвно – груповите антигени ($p = 7{,}62\times10^{-9}$), асоцииращ се с МИ. Причината за тази асоциация вероятно се дължи на дефицит на ензима глюкотрансфераза. В резултат на предишни изследвания е установено, че кръвни групи А, В и АВ показват по-висока честота на инфаркт при пациенти с ангиографски доказана ИБС в сравнение с тези, които имат кръвна група О [196]. При провеждане на мета-анализ на наличните в литературата данни, Wu и съавт. Докладват 1.79 пъти по – висок риск от сърдечно заболяване за носителите на кръвни групи А, В и АВ, в сравнение с носителите на кръвна група 0 [197].

През 2011 год. Изследователската група на Schunkert провежда мета-анализ на 14 GWAS проучвания на исхемична болест, включващи 22 233 пациенти и 64 762 контроли от европейски произход, последван от определяне на генотипа на най-силните сигнали за асоциациия в 60 738 допълнителни лица. Един от локусите в това проучване, който дава силна асоциативна връзка с коронарната атеросклероза, е rs579459. Въпросният маркер е локализиран в гена *ABO,* хромозомен регион 9q34.2, което е в съответствие с откритието на Muredach и съавт. От 2011 год и на Reilly и съавт. От 2012 год. [194].

През 2012 год. Общо 2 099 пациенти с ОКС, включени в общия регистър за остри коронарни инциденти (the GRACE Genetics Study), Великобритания, са проспективно проследени за период от 5 години (1668 дни). В резултат на проведеното проучване е установено, че носителите на алел С на вариант rs579459, който се намира upstream от гена *ABO* и корелира с кръвна група А, показват по – висок риск от развитие на МИ [(OR) 2.25, CI = 1.37-3.71; P = .001], както и повишен риск от повторен сърдечно – съдов инцидент или внезапна сърдечна смърт [(OR) 1.80, CI = 1.09-2.95; P = .021] в рамките на 5 години след диагностицирането на коронарния синдром. Асоциацията на rs579459 е реплицирана при 1250 пациенти от полски произход при проследяване за 6 месеца [(OR) 2.70, CI = 1.26-5.82, p = 0.011

за повторен МИ]. На базата на получените резултати авторите изказват предположението, че полиморфен вариант rs579459 е независим рисков фактор за сърдечно – съдови инциденти след ОКС [198].

През 2012 год. Davies и колектив провеждат мета-анализ на 5 проучвания от типа GWAS, с участието на 13 949 лица (7123 случаи, 6826 контроли), при които са генотипирани над 5 милиона SNP. Всички силни локуси са проследени в допълнителни 5 проучвания, включващи общо 11 032 лица (5211 случаи, 5821 контроли). В резултат на проведените изследвания е установен нов маркер, чувствителен за ИБС, разположен в хромозомен регион 1q21.3. Въпросният генетичен вариант (rs2229238), е локализиран в 3' UTR на гена *IL6R* и дава асоциация със статистическа значимост с исхемичната болест (P<7*10-7, OR 1.45) [199].

За първи път през 2009 год. Wellcome Trust Case – Control Consortium (WTCCC) идентифицират хромозомни локуси, които са силно свързани с ИБС посредством GWAS. В изследването участват 1 926 пациенти и 2 938 контроли. Последващото репликативно проучване за най – силните асоциативни сигнали е проведено в кохорта от 875 германски пациенти с ИМ и 1644 контроли. Комбиниран анализ на двете проучвания определя четири нови локуса, значимо асоцииращи се с ИБС ($P<1,3\times10^{-6}$) и висока степен на вероятност (> 80%) за истински асоциация на хромозоми 1p13.3 (rs599839), 1q41 (rs17465637), 10q11.21 (rs501120), и 15q22.33 (rs17228212). Всички участници в двете проучвания са от европейски произход [200].

Хромозомен локус 6q25.1 съдържа гена *MTHFD1L* [201, 202]. Генетични варианти в *MTHFD1L,* като например rs6922269, могат да допринесат за промяна в плазмените нива на хомоцистеина [201, 203], което повишава възможността за връзка между MTHFD1L и този рисков за коронарно артериално заболяване фактор [204]. Предварителният анализ на данните от 1070 пациенти в AtheroGene study не потвърждава връзката между rs6922269 и плазмените нивата на хомоцистеин [205], но независимо от това са необходими по-нататъшни проучвания с по-големи извадки, както и изследвания при нови популационни групи, за изясняване на ролята на въпросния локус в етиологията и патофизиологията на коронарното заболяване [200].

1.6.3.2. Гени, имащи отношение към регулацията на инсулиновата секреция, чувствителност и резистентност и глюкозната обмяна

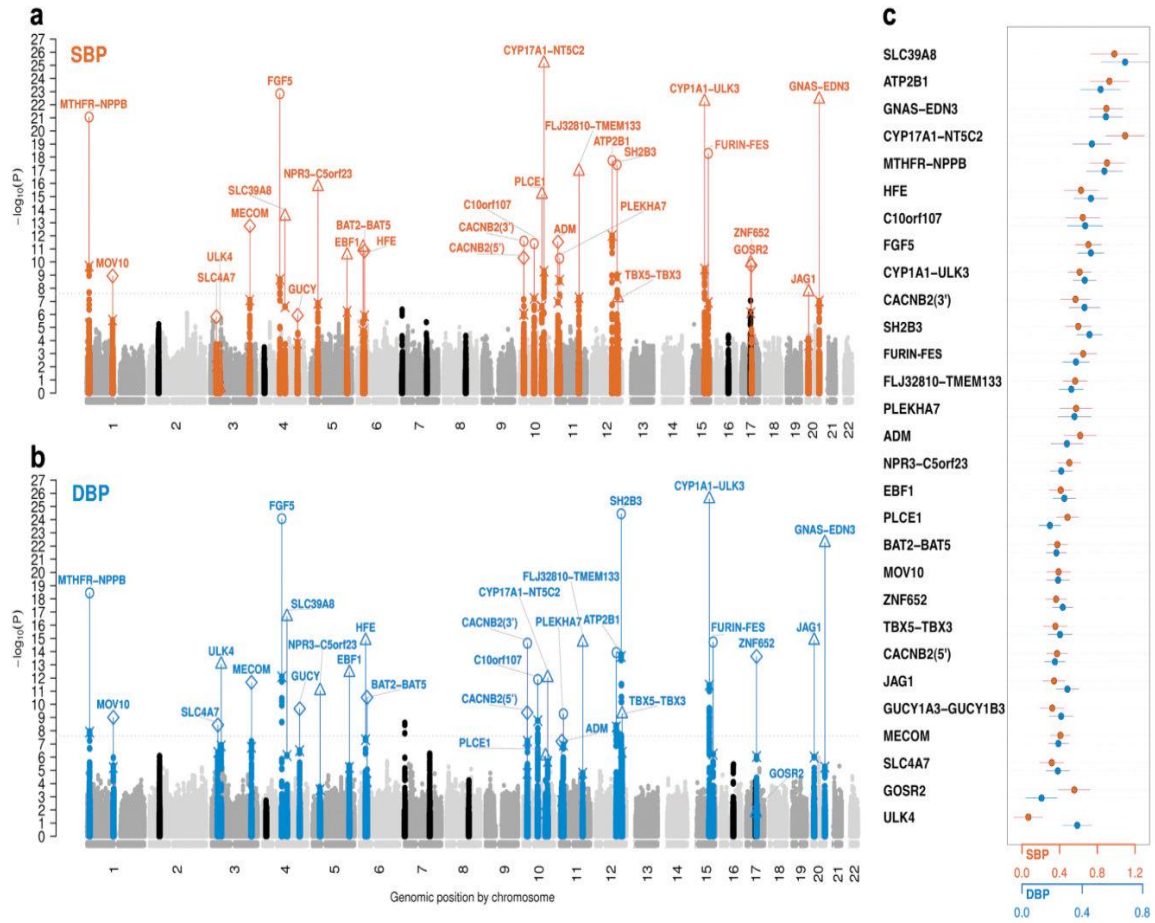
Инсулиновата резистентност има съществена роля в развитието на АХ, дислипидемия и диабет тип 2 (Т2ЗД) и е допринасящ фактор за ранното развитие на ИБС. Събраните до момента данни показват, че много от полиморфните варианти, свързани с повишен риск от поява на Т2ЗД са свързани и с предразположение към атеросклероза на коронарните съдове. Сред кандидат – гените, представляващи най-голям интерес, могат да се посочат *TCF7L2, IRS-1, FTO, ADIPOQ, LEP* и *MBL2 [206]*.

1.6.3.3. Роля на геномните асоциативни проучвания при определяне на риска за развитие на артериална хипертония

Проучванията на много водещи центрове в Европа са насочени към откриване на рискови варианти за АХ чрез асоциативни проучвания на целия геном при големи групи пациенти и контроли (Genome Wide Association Studies – GWAS). Засега резултатите от многобройните GWAS потвърждават факта, че генетичната предразположеност към АХ е комплексна и включва множество хромозомни локуси в различни части на генома. Най-значими са находките за свързаност в и около гени, но има и такива в генетично бедни региони на генома. Това ни води до извода, че причините за появата на това заболяване са по-скоро свързани с регулацията на гените, отколкото с кодиращата им функция.

Проведени са няколко големи проучвания, покриващи целия човешки геном, като са идентифицирани над 50 на брой рискови варианта в различни хромозомни локуси, свързани с промени в стойностите на систоличното и диастоличното артериално налягане (САН и ДАН) или АХ като цяло. По – голяма част от въпросните изследвания са проведени при европейски популации. Такива проучвания са CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic

Epidemiology), Global BP Gen (Global BP Genetics) consortium и ICBP (International Consortium for BP GWAS). Проведени са подобни проучвания и при азиатци (Korea Association Resource consortium and the Asian Genetic Epidemiology Network) и африканци (African origin the CARe (Candidate-gene Association Resource) consortium). Към днешна дата най-голям принос по отношение на броя открити локуси, свързани с САН, ДАН и АХ е изследването, проведено от ICBP през 2011 год. [207, 208]. Интересното е, че всички алели, увеличаващи стойностите на САН/ДАН (**Фиг 1.27**), също така увеличават и риска от развитие на АХ като цяло.



Фиг 1.27. Сигнали за асоциация на SNPs с повишен или понижен риск от есенциална артериална хипертония при провеждане на геномни асоциативни проучвания сред представители от Кавказката раса [209].

Вероятно поради мултифакторния характер на заболяването идентифицирането на чувствителни локуси и гени, имащи отношение към риска от развитие на АХ, представлява голямо предизвикателство за изследователите, работещи в тази област. След въвеждане в практиката на новите техники за молекулярно сканиране на човешкия геном през последните няколко години вече стана възможно провеждането на широкомащабни проучвания, обхващащи голям брой пациенти с конкретно заболяване и здрави контролни индивиди без данни за същото или свързани с него заболявания. Първият опит за провеждане на такъв тип широкомащабно геномно изследване, имащо за цел да идентифицира гени и генни локуси, асоциирани с АХ, е направен през 2007 год. От Welcome Trust Case Control Consortium, но въпросното проучване не успява да идентифицира генетични варианти, повишаващи предразположеността към високи стойности на АН при европейци [209, 210].

През 2009 г. Най-голямото геномно, асоциативно проучване (GWAS), извършено от Global Blood Pressure Genetics consortium, включващо 34 433 индивиди от европейски произход, идентифицира осем нови хромозомни локуса (*CSK* rs1378942, *CYP17A1* rs11191548, *MTHFR* rs17367504, *FGF5* rs16998073, *ZNF652* rs16948048, *PLCD3* rs12946454, *c10orf107* rs1530440,

SH2B3 rs653178), свързани едновременно с вариации в стойностите на САН, ДАН и АХ като цяло [211]. През същата година е проведено друго геномно изследване при европейци от групата на Levy и съавтори., в рамките на което отриват два свързани с хипертонията варианти: rs381815 в гена *PLEKH7* (хромозома 11p15.1, p=5.8×10-7) и rs3184504 в гена *SH2B3* (хромозома 12q24; p=5.7×10-7) [207]. През 2012 г. The International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies допълва вече откритите полиморфни варианти асоциирани с АХ с rs13139571 в локус *GUCY1A3*-*GUCY1B3* [209].

В своите първоначални анализи Ehret и съавт. Оценяват асоциациите между 2,5 милиона генотипа или единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) и САН и ДАН при 69 395 лица от европейски произход от 29 различни проучвания. След провеждане на мета-анализ на резултатите, получени от GWAS, авторите осъществяват три последователни етапа на валидация на най-добрите сигнали при 133 661 индивида от европейски произход. Двадесет и девет независими SNPs в 28 локуса показват статистически значима асоциация със САН и/или ДАН. Всички 29 SNPs постигат асоциация P <5 × 10-9, един порядък извън стандарта за GWAS. В това голямо геномно асоциативно проучване за rs1173771 в близост до кандидат гена *NRP3* е получен един от най-силните статистически значими резултати за асоциация P = 2.0 × 10-10. Носителството на G алел за този полиморфен вариант води до понижаване на кръвното налягане с 0.062 единици. Положителните резултати получени при изследване от такъв мащаб говорят, че генетични промени в локуса на този вариант – 5p14-p13, вероятно имат протективна роля по отношение на развитието на АХ [209].

Отново в геномното асоциативно проучване на Ehret и съавт. От 2011 г. за rs6015450 в близост до гените *GNAS* и *EDN3* е получен статистически значим резултат за асоциация с P = 4.0 × 10-14. Носителството на G алел за този полиморфен вариант води до понижаване на кръвното налягане с 0.11 единици. Това е най-силният сигнал, получен за АН до този момент за всички проведени геномни проучвания в световен мащаб. Положителните резултати, получени при изследване от такъв мащаб, отново показват, че генетични промени в локус 20q13.32 могат да водят до увеличена предразположеност към развитие на АХ. Все още обаче липсват репликационни проучвания за този полиморфизъм и връзката му с АХ в научната литература. Репликационни анализи при различни популационни групи биха изяснили ролята на въпросния локус в етиологията и молекулните механизми на регулация на артериалното налягане и съответно АХ [209].

През 2009 г. Org и съавт. Идентифицират нов локус в генома, асоцииран с АН и хипертонията като цяло (хипертония, OR 1=28, p=5.30×10−8, САН, p=5.55×10−5) при провеждане на GWAS. Проучването е проведено при кохорта от 1644 пациенти, от южните области на Германия. Изследователите установяват асоциация между нивата на АН и полиморфен вариант rs11646213 (T/A), разположен в близост до гена CDH13 (16q23.3). Първоначалната асоциация е потвърдена при две други независими популации от немци и естонци. Установено е, че носителите на полиморфния алел А имат повишен риск от развитие на хипертония в сравнение с останалите пациенти [212].

През 2012 г. Salvi и съавт. Провеждат скрининг на целия геном за откриване на полиморфни варианти, имащи потенциално участие в молекулните механизми на АХ. Фазата на първоначално откриване включва 1865 случаи и 1750 контроли, чийто генотип е определен с 1M Illumina чип. Най-добрите сигнали са валидирани в панел от 1385 случаи и 1246 контроли, които са генотипирани с масив от 14 055 подбрани маркера. В резултат на това проучване е идентифициран нов локус, асоцииран с АХ (rs3918226), в района на промотора на гена, кодиращ ендотелната NO синтаза (*eNOS*) (OR 1,54, 95% CI 1.37-1.73 комбинирано p = 2.58.10-13). Количествен анализ на АН разкрива ефект с размер от 1.91 (95% CI 0.16-3.66) за систолично и 1.40 (95% CI 0.25-2.55) за диастолично кръвно налягане [213].

Изследователската група на Salvi идентифицира in-silico потенциален свързващ сайт за транскрипционния фактор ETS близо до rs3918226, който вероятно има участие в модулацията на експресията на eNOS. Биологичните данни свързват eNOS с хипертонията като критичен медиатор на сърдечно – съдовата хомеостаза и контрола на АН посредством регулация на съдовия тонус. Това откритие подкрепя хипотезата, че вероятно наличието на генетични полиморфизми в този локус оказват съществено влияние върху развитието на хипертонията [213].

През 2009 г. Консорциумите на Global Blood Pressure Genetics (Global Bpgen) [208] и The Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology (CHARGE) [207] докладват на научната общественост за откриването на нови локуси, чувствителни за АХ. Сред 14-те основни локуса, свързани с АН, които достигат статистическата значимост за GWAS и при двете проучвания, резултатите за единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP) в гена за транспортиращата калций АТФаза 1, локализирана в плазмената мембрана (*ATP2B1*) е потвърден впоследствие в различни големи мащабни изследвания, включително Japanese Millennium Genome Project [214-216], две корейски проучвания [217] и скорошен мета-анализ на GWAS при източноазиатци [218].

1.7. Обобщение

Тромбозата представлява основна причина за заболеваемост и смъртност в световен мащаб. Терапевтичното лечение на тромбоемболичните заболявания силно зависи от тяхната патофизиология и генеза. В условия на висок кръвоток (при артериална тромбоза), доминиращата роля на тромбоцитите в образуването на тромби е основа за използване на антитромбоцитните медикаменти като аспирин и клопидогрел при първичното третиране на заболяването. От друга страна, коагулационната каскада играе по-важна роля в условията на нисък кръвоток (при венозна тромбоза) и в този случай по-уместна е антикоагулантната терапия с аценокумарол или варфарин. Неспазването на оптималните терапевтични интервенции, целящи да се намалят рисковете от исхемичен инсулт, миокарден инфаркт и тромбоемболизъм, несъмнено ще бъде значителна тежест за здравеопазването, особено в слаборазвити държави, каквато е и България.

Известно е, че терапията и с двата типа медикаменти, клопидогрел и аценокумарол, има своите негативи. По отношение на терапията с клопидогрел част от пациентите показват частична или пълна резистентност към провежданото лечение, което увеличава риска от последващи сърдечно-съдови инциденти в това число инсулт и инфаркт. От своя страна, индиректните антикоагуланти, като варфарин и аценокумарол, показват широка междуиндивидуална и междуетническа вариабилност, което затруднява тяхното дозиране. Към настоящия момент мониторирането на отговора към лечението с аценокумарол в България се извършва на базата на измерване на протромбиновото време веднъж 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 се извършва това. Необходимо е да се намерят методи, които да позволят оптимизирането на терапията с тези медикаменти, целящо предотвратяване или намаляване на страничните реакции от лечението с тях. Изключително важно е тези методи да бъдат надеждни, да отчитат с голяма точност индивидуалния отговор на всеки пациент към съответната терапия и получените резултати да не се променят с времето.

Фармакогенетиката е наука, която изучава влиянието на генетичните фактори върху терапевтичния отговор към различни медикаменти, за които се знае, че съществува разлика в начина, по който всеки отделен пациент се повлиява от провежданото с тях лечение.

Научните изследвания в България във връзка с фармакогенетиката на аценокумарол се ограничават с изследване на асоциацията между полиморфни варианти на *CYP2C9* и дозите аценокумарол, необходими за достигане на прицелни нива на антикоагулация. Установено е, че *CYP2C9*1/*3* (асоцииран с умерена ензимна активност), *CYP2C9*2/*2* и *CYP2C9*2/*3* генотипите (свързани с ниска ензимна активност) са по-чести сред пациенти, изискващи ниски дози аценокумарол. Честотата на *CYP2C9*1/*1* генотип, свързан с висока ензимна активност, е по-висока сред пациенти, изискващи високи дози аценокумарол. В допълнение, *ABCB1 2677GG/3435CC* хаплотип е свързан с ниска терапевтична доза аценокумарол, докато хаплотипите *2677TT/3435TT* и *2677GT/3435TT* са асоциирани с по-висока доза кумаринов антикоагулант (P = 0.03) [210]. Асоциацията между полиморфизми във *VKORC1* и терапевтични дози индиректен антикоагулант при български пациенти все още не са изследвани.

По отношение на влиянието на генетичните фактори върху отговора към лекарствена терапия с клопидогрел, в България все още не са провеждани подобни анализи. Работата по настоящия дисертационен труд представляват първи стъпки в тази насока.

От друга страна, 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 все още остава доста неясно. Необходими са задълбочени изследвания за установяване на основните генетични детерминанти с рискова или протективна стойност по отношение на съдовата атеросклероза и повишените стойности на АН, което допълнително би улеснило тяхната профилактика и терапия.

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 мултифакторните заболявания. Затова подобни проучвания при различни популационни групи стоят в основата на изясняване на сложната генетична архитектура на ССЗ като ИБС и АХ и определяне на онези генетични маркери, които да позволят ранното диагностициране на заболяването, както и откриването на нови, терапевтични мишени в близко или по- далечно бъдеще. По – голям дял на проучванията, валидиращи или отхвърлящи асоциацията на новооткрити полиморфни варианти с тези заболявания са предимно при индивиди от азиатски произход. Данните за репликативни изследвания при европейци са доста оскъдни.

Всичко изложено до тук ни насочим към основната цел на настоящия дисертационен труд. Част от обясненията на получените резултати представляват само предположения по отношение на вероятния механизъм на влияние, които в последствие е необходимо да се потвърдят чрез функционални, протеомни или други видове по-задълбочени анализи.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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:**

2.2.1 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.

2.2.2 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.

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

2.2.4 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.

2.2.5 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.

2.2.6 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.

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

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

2.2.9 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. 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). Пациентите са насочени от Клиника по кардиология на УМБАЛ ”Александровска”-гр. София; Клиника по кардиология, МФ, МУ-гр. Плевен; Клиничен център по ендокринология и геронтология, МФ, МУ-гр. София; Клинична лаборатория към УСБАЛ „Св. Екатерина”- гр. София и Лаборатория по диагностика към Национална кардиологична болница – гр. София. Популационните контроли, използвани при асоциативните проучвания, са подбрани от ДНК биобанката на Центъра по молекулна медицина (ЦММ), катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – гр.София.

3.1.1. Исхемична болест на сърцето и миокарден инфаркт

Към настоящия момент в ЦММ, катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – гр.София е изградена биобанка, съдържаща 324 броя проби от пациенти с ИБС, от които 199 броя са от пациенти с прекаран миокарден инфаркт. Критериите за подбор на пациенти с коронагографски доказана ИБС и/или инфаркт на миокарда бяха следните:

Включващи критерии:

1 Възраст между 18 и 75 години;
2 Систолично артериално налягане ≤ 120 mmHg;
3 Диастолично артериално налягане ≤ 80 mmHg;
4 Коронарографски доказана ИБС;
5 Хоспитализирани, диспансеризирани и/или амбулаторни пациенти;
6 Подписано декларация за информирано съгласие от всеки участник в изследването.

Изключващите критерии:

1. Възраст под 18 и над 75 години;
2. Липса на коронарографско доказване на ИБС;
3. Отказ от подписване на декларация за информирано съгласие;
4. Диагностична неуточненост;
5. Остра бъбречна недостатъчност;
6. Пациенти с краен стадий на бъбречна недостатъчност или на хрониодиализа;
7. Остра или напреднала хронична чернодробна недостатъчност; декомпенсиран хипер- или хипотиреоидизъм (изследване на щитовидни хормони през последните 6 месеца в норма);
8. Епилепсия; тежък анемичен синдром или кръвозагуба, налагаща кръвопреливане.

Основните характеристики на на пациентите с исхемична болест и миокарден инфаркт са обобщени в **Табл. 3.1.**

Табл. 3.1. Основни характеристики на на пациентите с ИБС и ИМ.

Показател	**Пациенти с ИБС стойност±SD /брой(процент)**	**Пациенти с ИМ стойност±SD /брой(процент)**
Възраст (години)	66.27±8.81	66.34 ± 10.39
Пол (мъже)	60 (55.56)	92 (60.53)
ИТМ (кг/м2)	29.66 ± 5.72	28.36 ± 4.89
Общ холестерол (ммол/л)	5.64±1.04	5.94±0.75
Триглицериди (ммол/л)	1.32±0.67	2.07±0.56
LDL (ммол/л)	4.23±1.06	4.14±0.79
HDL (ммол/л)	1.22±0.37	1.39±0.28
Систолично артериално налягане (САН) (ммHg)	147.86±21.83	135.92±10.96
Диастолично артериално налягане (ДАН) (ммHg)	87.50±13.64	83.64±6.60

3.1.2. Първична артериална хипертония

Към настоящия момент в ЦММ, катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – гр.София е изградена биобанка, включваща 300 броя ДНКи от пациенти с първична АХ. Критериите за подбор на пациенти с АХ бяха следните:

Включващи критерии:

1. Възраст между 18 и 70 години;
2. Доказана първична АХ;
3. Давност на първичната АХ поне една година;
4. Провеждане на антихипертензивно лечение със съответните медикаменти;

Изключващи критерии:

1. Възраст под 18 и над 70 години;
2. Давност на първичната АХ по-малко от една година;
3. Отказ от подписване на декларация за информирано съгласие в генетично изследване;
4. Остър коронарен синдром със или без елевация на ST сегмента, с показания за спешна коронарография;
5. Остър исхемичен или хеморагичен мозъчен инсулт, или до 6 месеца след преживяването му;
6. Остра сърдечна недостатъчност;
7. Хронична сърдечна недостатъчност с фракция на изтласкване ≤ 35%;
8. Остра бъбречна недостатъчност;
9. Пациенти с краен стадий на бъбречна недостатъчност или на хемодиализа;
10. Остра или напреднала хронична чернодробна недостатъчност; декомпенсиран хипер- или хипотиреоидизъм (излседване на щитовидни хормони през последните 6 месеца в норма);
11. Епилепсия; тежък анемичен синдром или кръвозагуба, налагаща кръвопреливане;
12. Известен дефицит на вит. B12 – некомпенсиран;
13. Лошо контролиран захарен диабет с данни за чести хипо-или хипергликемии, както и хипо-или хипергликемична кома;
14. Тежък или умерено тежък астено-адинамичен синдром;
15. Установена алкохолна злоупотреба; известно психиатрично заболяване;
16. Поставена диагноза болест на Алцхаймер или деменция от друг тип;
17. Паренхимни увреждания на бъбреците или черния дроб;
18. Декомпенсирани тиреоидни заболявания;

19. Хипофизарни нарушения.

Подборът на пациенти с първична АХ е осъществен така, че да се изключат случаите с вторична (симптоматична) АХ, дължаща се на на ендокринни, бъбречни или друг тип нарушения, водещи до повишени стойности на АН.

Основните характеристики на на пациентите с първична АХ са обобщени в **Табл. 3.2.**

Табл. 3.2. Основни характеристики на на пациентите с първична артериална хипертония.

Показател	**Стойност±SD /брой(процент)**
Възраст (години)	51.91±17.01
Пол (мъже)	72 (33.49%)
ИТМ (кг/м2)	28.31±6.5
Общ холестерол	5.24±1.15
Триглицериди (ммол/л)	1.71±1.35
LDL (ммол/л)	3.79±1.11
HDL (ммол/л)	1.16±0.37
Систолично артериално налягане (САН) (ммHg)	143.40±18.33
Диастолично артериално налягане (ДАН) (мм Hg)	89.09±12.05

3.1.3. Пациенти с повишен риск от тромбози

3.1.3.1. Пациенти, подложени на антитромбоцитна терапия с клопидогрел

Към настоящия момент в ЦММ, катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – гр.София е изградена биобанка, съдържаща 104 броя ДНКи от пациенти с поставен коронарен стент и повишен риск от тромбози, подложени на терапия с клопидогрел.

Клиничният материал и всички кръвни проби от изследваните пациенти са събрани през 2011 год. Кръвните проби са взети между 14-я и 72-я час след натоварващата доза с КЛД и включване на поддържаща доза при имплантиране на стент след ПКИ. Кръвта е събирана във вакутейнери от 3.0 мл с антикоагулант (25 мг/мл, Hirudin, Dynabyte) и е престояла 30 мин. По протокола на изследването преди да бъде определена функцията на тромбоцитите.

Всички пациенти са получили първоначално 300/600 мг натоварваща доза и впоследствие 75 мг поддържаща доза КЛД от 2 до 14 часа преди провеждането на ПКИ и са били на хронична терапия със 100 мг/ден аспирин до този момент. Пациентите с висока остатъчна тромбоцитна агрегация със стойности от АДФ-теста над 45.5U (BOTA) в първите 24 часа от лечението получаваха двойно по–висока доза от медикамента при поддържащата терапия (150 мг/д) КЛД (n=12) или бяха превключени на 10 мг/д празугрел (n=38) с контролен АДФ-тест до 3-ти ден (72-ри час) от началото на терапията.

Мониторирането на терапевтичния отговор на пациентите към клопидогрел беше извършен чрез определянето на тромбоцитната функция след 30-тата минута след приема на медикамента, съгласно протокола за валидиране на този тест в лабораторията на Националната Кардиологична Болница (НКБ) [219, 220]. Остатъчната тромбоцитната агрегация след натоваващата доза антиагрегант беше измерена чрез множествена импедансна агрегометрия (multiple electrode platelet aggregometry – MEA) с АДФ-тест, който отчита инхибирането на АДФ P2Y12 рецепторите при лечението с клопидогрел или празугрел.

АДФ тестът включва прибавяне на 6.5 мкМ $л^{-1}$ АДФ към 0.3 ml антикоагулирана кръв и измерване на тромбоцитната реактивност при използването на апарат Multiplate (Dynabyte GmbH. Munich. Germany). Активираните тромбоцити под действие на АДФ агрегират и

прилепват към сензорните електроди. Във всяка самостоятелна тест-единицата (кювета) се намират две двойки електроди (общо 4 електрода). Промяната в импеданса се измерва от двата независими сензора и се представя като две криви на агрегация. Площта под кривите на агрегация (AUC) отразява агрегационния отговор за времето на измерване (AU*min). Резултатите се съобщават в условни единици U, като 1U = 10 AU*min. Двете сензорни двойки служат и като вътрешна контрола на теста.

На базата на дозово – и времево-зависимата инхибиция на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация под действие на клопидогрел,. Пациентите бяха разделени на две основни групи (**Фиг.3.1, Табл 3.3**):

- Пациенти с добър отговор към терапията с клопидогрел – при регистриране на стойности на АДФ теста под 45.5 U (AU*мин./10).
- Пациенти с недостатъчен или липсващ отговор към терапията с клопидогрел – при регистриране на стойности на АДФ теста над 45.5 U (AU*мин./10).



Фиг. 3.1. Ход на анализа, водещ до разделяне на пациентите в две основни групи на базата на отговора им към приложената антиагрегантна терапия.

Табл 3.3. 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*мин/10)	22	72	27	42
Станд. Откл. (AU*мин/10)	8	10	11	11
Минимална (AU*мин/10)	5	53	12	27
Максимална (AU*мин/10)	44	89	33	56
P (t-test)		t=28.01, F=102	t=2.39, F=90	t=5.96, F=64

Като разграничителна точка е използвана стойността, получена от ROC кривата на АДФ-тестовете, измерени с импедансната агрегометрия на анализатор Multiplate при специфичност 0.84 и чувствителност 0.789. Площта под кривата на измерването (area under the curve, AUC) е определена на 0.864 (95% CI 0.772-0.957), p < 0001. За недостатъчното инхибиране на АДФ индуцираната агрегация са приети стойности на АДФ тест над 45.5 U (AU*мин/10) – „слаб (недостатъчен) отговор", „low response". Адекватен тромбоцитен отговор към АДФ P2Y12 рецепторното блокиране е дефиниран като АДФ-тест под 45U (455 AU*min). АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация е извършена в клиничната лаборатория на НКБ по предварително описан протокол [219, 220].

АДФ-индуцираната агрегация беше определена в Лабораторията за диагностика с ръководител Проф. Ива Паскалева, Националната кардиологична болница – гр. София.

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

Основните характеристики на на пациентите, лекувани с клопидогрел са обобщени в **Табл. 3.4.**

Табл. 3.4. 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)**	**χ^2**	**P стойност**
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 х 10^9/l	278 ± 84	331±10	-	<0.001

3.1.3.2. Пациенти, подложени на антикоагулантна терапия с аценокумарол

Към настоящия момент в ЦММ, катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет, Медицински университет – гр.София е изградена биобанка, включваща 172 броя ДНКи от пациенти с повишен риск от тромбози, подложени на терапия с аценокумарол. От всички пациенти, 122-ма са събрани в периода 2012-2014 год. Като всички са лекувани с оралния антикоагулант АЦ за период най-малко три месеца в УСБАЛ „Св. Екатерина"- гр. София. Останалите 50 пациента са събирани в периода 2005-2006 год. И са насочвани към

ЦММ от Лабораторията по диагностика на Национална кардиологична болница, гр. София. Мониторирането на антикоагулантния ефект на АЦ е осъществяван чрез измерване продължителността на протромбиновото време (ПВ), представено чрез INR (International Normalized Ratio).

INR (International Normalized Ratio) е международна система за представяне на резултатите от тестовете за коагулация на кръвта, установена от Международната здравна организация и Международния Комитет по тромбоза и хемостаза. Всички резултати са стандартизирани чрез международния индекс за чувствителност (ISI) за основния тромбопластинов реагент в комбинация с използвания инструмент за осъществяване на теста. Повечето лаборатории използват анализатори, които автоматично изчисляват INR.

$$INR = \left(\frac{\text{време на съсирване на плазмата на болен}}{\text{време на съсирване на плазмата на здрав индивид}}\right)^{ISI}$$

$$ISI = \frac{\text{време на съсирване на контролната плазма с работен тромбопластин}}{\text{време на съсирване на контролна плазма с референтен тромбопластин СЗО}}$$

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.

Дизайнът на планирания експеримент е представен на **Фиг. 3.2.**



Фиг. 3.2. Дизайн на планирания експеримент, свързан с проучване на ролята на клинични и генетични фактори при определяне на оптималната доза антикоагулант.

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 (**Табл. 3.5**).

Табл. 3.5. 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 стойност**
Възраст (години) (mean±SD)	58.04 ± 14.13	59.80 ± 14.56	0.41*
Пол			
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^2)	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**
Причина за прием на аценокумарол			
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

3.1.4. Популационна група от здрави индивиди с български произход, без данни за сърдечно-съдови заболявания

Поради невъзможността за събиране на контролна група от здрави индивиди, съответстващи на болните по пол, етнос и възраст, за контролна група при проведеното асоциативно проучване е използвана популационна извадка от индивиди с български произход, подбрани от ДНК биобанката на ЦММ, МУ-София. Недостатък на този тип контролна група е значително по-ниската възраст на индивидите в нея, което не изключва вероятността в тази група да попаднат и индивиди, които все още не са развили сърдечно заболяване или артериална хипертония. Поради тази причина подбраната от нас в хода на изследването контролна група включва два пъти повече индивиди в сравнение с групата на пациентите със ССЗ. По този начин използването на достатъчно голяма извадка от популационни контроли с български произход ни осигурява коректно определяне на честотата на съответните полиморфни варианти в тази група, която най-точно да отговаря на популационната честота на подбраните варианти за българската популация. В такъв случай очакваме честотата на рисковите алели в групата на пациентите със ССЗ да е значимо по – висока в сравнение с популационната честота на същите тези варианти при българи.

Минимумът на Световната Здравна Организация (СЗО) за определяне на сърдечно-съдов риск като стойности на кръвна захар, холестерол, триглицериди, HDL , креатинин, урея, аланин аминотрансфераза (АЛАТ), аспартат аминотронсфераза (АСАТ), гамаглутамил-транспептидаза (ГГТ) и хормонални изследвания за инсулиноподобен фактор на растежа (IGF-

1) и тироиден стимулиращ хормон (ТСХ) е изпълнен само за 1/3 от популационните контроли, поради по-горе изброените съображения.

Изключващи критериите за здравите контролни индивиди бяха:

1. Отказ от подписване на декларация за информирано съгласие;
2. Диагностицирано хронично или остро заболяване към настоящия момент на взимане на биологична проба.

Основните характеристики на популационните контроли, използвани при провеждане на асоциативните проучвания, са обощени в . **Табл. 3.6.**

Табл. 3.6. Основни характеристики на популационните контроли, използвани при провеждане на асоциативните проучвания.

Показател	**Стойност±SD /брой(процент)**
Възраст (години)	36.08±12.99
Пол (мъже)	241 (48.59)
ИТМ (кг/м2)	25.66±4.91
Общ холестерол	4.99±0.94
Триглицериди (ммол/л)	0.93±0.56
LDL (ммол/л)	3.18±0.88
HDL (ммол/л)	1.62±0.40

На всеки пациент е обяснена същността на изследването, като всеки е подписал доброволно информирано съгласие за участие в проучване. Всички пациенти са на възраст над 18 години. Провеждането на наблюдението е одобрено от Комисия по етика към МУ-София, Комисия по етика към НКБ и . Комисия по етика към МУ-Плевен.

3.2. Биологичен материал

3.2.1. Преданалитична обработка на биологичния материал

Всички кръвни проби са взети в пластмасови епруветки с K_3EDTA (етилен диамин тетраацетат) или хирудин (25 мкг/мл) като антикоагулант, половин до един час след прием на храна с цел увеличаване на броя на левкоцитите в кръвта. Кръвните проби са съхранявани при +4°C до 48 часа, а при невъзможност за обработка в този интервал, са замръзявани при –20°C и съхранявани за продължителен период от време.

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв

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

Етапите на екстракция на ДНК при този метод са следните:

<u>Получаване на клетъчно-ядрен лизат:</u>

За целта от 3 до 10 мл венозна кръв се прехвърлят в конична епруветка от 50 мл и се добавя до 40 мл 1Х лизиращ буфер. Пробите се инкубират около 30 мин. Върху лед и след това се центрофугират за 10 мин. При 3000 rpm на 4 ºС или 18 ºС. В резултат на тази обработка ядрата на левкоцитите падат на дъното, а в супернатанта остават клетъчните компоненти. Супернатантата се отстранява внимателно без да се нарушава целостта на утайката, след което се добавят 20 мл 1Х лизиращ буфер и се центрофугира при същите условия (10 мин. При 3000

rpm на 4 ºC или 18 ºC). Ако получената утайка е с бледо-червен цвят, предходната стъпка се повтаря отново до получаване на утайка с бял цвят.

Разграждане на ядрените мембрани, белтъците и РНК в получените лизати:

Към утайката, получена в предходния етап се добавят 5 мл нуклеолизиращ буфер (SE буфер), 35-40 мкл протеиназа К и 400 мкл 10% SDS. Компонентите се ресуспендират внимателно и сместа се инкубира на 37 ºC за 12 часа или на 55 ºC за 5 часа. При добър лизис разтворът се избистря и не опалесцира.

Преципитация на пречистената ДНК:

След протеолизата се добавят 2 мл 6 М NaCl, разбърква се на Vortex за около 15 сек. И се центрофугира за 15 мин. На 3000 rpm при стайна температура. ДНК остава в супурнатанта, а примесите се утаяват. Супернатантата с ДНК се прехвърля в нова епруветка и се прибавят два обема студен абсолютен алкохол. След внимателно разклащане ДНК видимо преципитира и се отделя на повърхността. Преципитиралата ДНК се изважда с пастьорова пипета и след промиване с 80 % етанол се оставя да изсъхне на въздуха. Изсушената ДНК се разтваря в ТЕ буфер с обем между 300 мкл. И 1500 мкл. Епруветката се затваря много добре, поставя й се етикет с код и се оставя на клатачна машина за една нощ, за да се разтвори добре изолираната ДНК. След изсъхване екстрахираната ДНК се разтваря в ТЕ буфер или се прехвърля в 96 % етанол за дългосрочно съхранение в ДНК биобанка.Очакваният добив от 10 мл венозна кръв е 300-800 нг/ мкл ДНК.

Реактивите, използвани при изолирането на ДНК по солевия метод са представени в **Табл 3.7:**

Табл 3.7. Реактиви използвани при солевото изолиране на ДНК.

Реактив:	**Изходни реактиви**	**Количество изходен реактив**	**ddH2O**
Еритроцитлизиращ буфер pH 7.4	155 мМ NH_4Cl 10 мМ $KHCO_3$ 0,1 мМ Na_2EDTA	82,9 г 10 г 0.34 г	до 1000 мл
Нуклеолизиращ буфер pH 8.0	75 мМ NaCl 25 мМ Na_2EDTA	4,39 г 8.41 г	до 1000 мл
Преситен NaCl	6 М NaCl	360 г	до 1000 мл
10% натриев додецил сулфат	SDS (Sodium odecyl sulfate)	10 г	до 100 мл
Протеиназа К	10 мг/мл	0.1 г	1 мл
96% етилов алкохол	100% абсолютен алкохол	96 мкл	до 100 мл
80% етилов алкохол	100% абсолютен алкохол	800 мл	до 1000 мл
Стерилен ТЕ буфер pH 7.4	10 мМ Tris 0.1 мМ EDTA	1.21 г 0.04 г	до 1000 мл

Ако кръвта е с малък обем, стара или съсирена, се прави допълнително пречистване. Към разтвора с ДНК се добавя равен обем фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:25:1) и се вортексира добре, след което се центрофугира за 15 мин. / 10000 rpm/ на 22 ºC. Горния слой внимателно се прехвърля в нова епруветка. Добавя се 1/10 обем 3 М натриев ацетат с pH 5.9 и 2 обема леден абсолютен алкохол. Вместо натриев ацетат, може да се добави амониев ацетат до крайна концентрация 2.5 М и вместо 2 обема студен леден етанол може да се добави 1 обем изопропилов алкохол. Оставя се да престои 2 ÷ 3 часа или цяла нощ на – 20 ºC, след което се центрофугира за 15 мин./ 3000 rpm/ на 22 ºC. Изолираната ДНК се промива с 200 мкл 80 % етанол и се оставя да изсъхне на стайна температура при отворен капак на епруветката.

След изсъхване екстрахираната ДНК се разтваря в ТЕ буфер или се прехвърля в 96 % етанол за дългосрочно съхранение в ДНК биобанка.

Използвана апаратура:
- Хладилна центрофуга **Centifuge 5810R** (**Eppendorf**);
- Устройство за разбъркване – **Vortex – Press-to-mix (Snijders);**
- Сух стерилизатор **MMM (Ecocell).**

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

Тази методика за изолиране на високомолекулна ДНК беше използвана в случаите, при които кръвта е хемолизирана или съсирена. Изолирането на геномна ДНК се осъществи чрез разрушаване на клетъчната мембрана на клетките и ядрените мембрани и освобождаване на ДНК молекулите от белтъци и други примеси. Целта беше да се получи високомолекулна, неувредена ДНК с минимално количество примеси от белтъци, РНК и др. нежелани компоненти.

Ходът на процедурата по изолиране на високомолекулна ДНК е следният:

вВ 50 мл конична пластмасова епруветка се наливат 3-10 мл венозна кръв и към тях се добавят до краен обем 40 мл еритроцит – лизиращ буфер. Така полученият хипотоничен разтвор разрушава мембраните на кръвните клетки, като се оставя да действа в продължителност на 30 мин. Върху лед като периодично се разбърква чрез разклащане. След това се центрофугира при 3000 rpm за 10 мин. При 18 °С. Получава се плътна червена утайка, съдържаща ядрата на белите кръвни клетки, хемолизирани еритроцити, както и съсиреци. Супернатантата се излива внимателно и ако утайката не е достатъчно плътна се оставят 5 мл от нея. След това се прибавят следните реагенти:

- 5 мл нуклеолизиращ SE буфер
- 25 мкл протеиназа К (концентрация 10 мг/мл)
- 400 мкл 10 % SDS

Клетъчните ядра се лизират чрез нуклеолизиращ буфер. Присъствието на детергента натриев додецилсулфат (SDS), благоприятства дисоциацията на протеините от молекулата на ДНК и създават условия за действието на протеиназа К. Суспензията се разбърква и се инкубира при 37 °С за цяла нощ или при 55 °С за 5 часа. При необходимост би могло до се добави допълнително количество протеиназа К до пълно разграждане на белтъците. Лизирането на клетките се контролира визуално, като при добър лизис утайката се разтваря.

След инкубацията се прибавя равен обем фенол, еквилибриран с TRIS до pH = 8,0. Центрофугира се при 3000 rpm за 15 мин. При 18 °С. Супернатантата внимателно се отпипетира в нова епруветка, като се внимава да не се взима от бялата утайка между двете фази. Към супернатантата се добавят ½ обем фенол, ½ обем хлороформ и изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Сместа се размесва на клатачка за около 10 мин. И след това се центрофугира отново при 3000 rpm за 15 мин. При 18 °С. Горният слой се прехвърля внимателно в нова епруветка и се добавят следните реагенти:

- 1/10 обем натрив ацетат с pH=5,9, размесва се добре;
- 2 обема леден абсолютен етанол.

Преципитацията на пречистената ДНК се извършва по следната схема: супернатантата се прехвърля в нова епруветка и се прибавят 2 обема леден абсолютен етанол. ДНК видимо преципитира, като се навива на кълбо и изплува на повърхността. Ако екстрахираната ДНК ще бъде съхранявана в ДНК биобанка, на този етап тя се прехвърля в епруветка с 96% етанол.

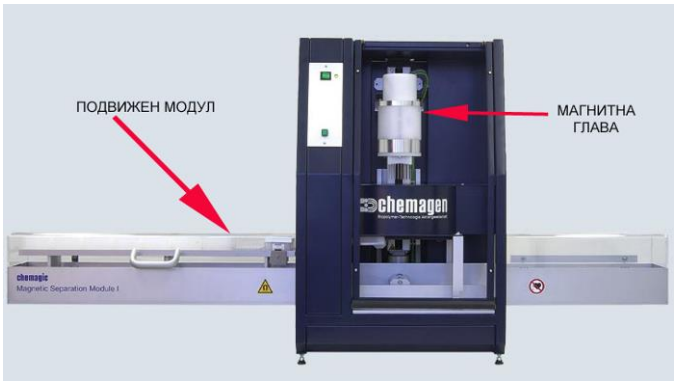
Утаената ДНК се изважда с чиста запоена пастьорова пипета и след промиване с 1 мл 80 % етанол се оставя да изсъхне на въздуха при стайна температура. В зависимост от полученото количество, изолираната ДНК се разтваря в ТЕ буфер в обем между 300 мкл и 1.5 мл. Очакван добив: от 10 мл венозна кръв – 300 до 800 мг ДНК.

Използвана апаратура

- Хладилна центрофуга **Centifuge 5810R** (**Eppendorf**);
- Устройство за разбъркване **Vortex – Press-to-mix (Snijders);**
- Водна, термостатична вана **MGV MT**
- Хоризонтални електрофоретични вани **(Pharmacia®).**

3.2.1.1.3. Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез полуавтаматизирана система chemagic magnetic separation module i (chemagen)

Основни компоненти на системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)-(**Фиг 3.3**) са подвижен модул и магнитна глава. Върху подвижния модул се поставят: контейнер с чисти накрайници , епруветки с проби и епруветки с поредица от буфери. Магнитната глава носи метални пръчици (родове), които имат способността да се намагнитизират. За изолиране на ДНК се използва специален набор от реактиви, който включва различни буфери, както и магнитни частици (M–PVA Magnetic Beads).

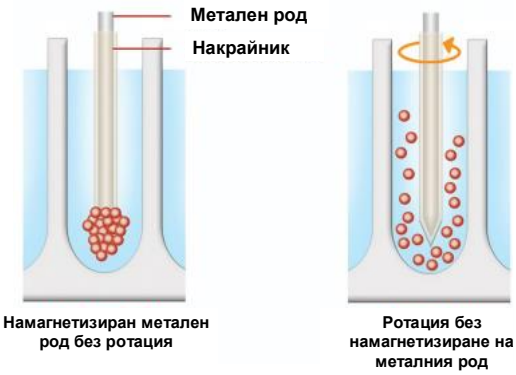


Фиг 3.3 Общ вид на полуавтоматизираната система **Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen**).

Отделянето на ДНК молекулите от останалите клетъчни компоненти става с помощта на магнитни частици. Магнитните частици се свързват с ДНК молекулите в пробата. При включване на електромагнита на апарата, родовете се намагнитизират и привличат магнитните частици от разтвора. Всеки от е снабден с накрайник и магнитните частици (заедно с ДНК молекулите) полепват по външната им страна.

Принципът на действие на магнитните частици е следният: магнитните частици съдържат матрица от поливинилов алкохол, който в последствие се карбоксилира, за да може лесно да свързва белтъци, нуклеинови киселини и други амино- лиганди. Магнитните частици с –COOH групи могат да се свързват с полимерни или неполимерни молекули, които съдържат амино групи. Първо задължително условие е активирането на –COOH матрицата. За тази активацияpH на средата трябва да бъде между 4.7 и 6. Среда с pH>7.5 е необходимо да бъде избягвана.

Намагнитизираните родове прехвърлят магнитните частици (и свързаните с тях ДНК молекули) през различни промиващи буфери. При потапяне в определен буфер, електромагнитът се изключва, при което магнитните частици се отделят от накрайниците. След това се включва електромоторът, родовете започват да се въртят и по този начин магнитните частици (заедно с ДНК) се диспергират в целия обем на разтвора. След това електромоторът се изключва, а електромагнитът се включва и магнитните частици (заедно с ДНК) отново полепват по външната страна на накрайника (**Фиг 3.4**). По този начин свързаната с магнитните частици ДНК се промива в няколко промиващи буфери, след което започва етапа на елуиране на ДНК.



Фиг 3.4 Принцип на действие на полуавтаматизирана система Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) за изолиране на ДНК от венозна кръв.

Елуирането протича по следния начин: по време на въртенето на металните родове ДНК молекулите се отделят от магнитните частици и остават в елуиращия буфер. Впоследствие магнитните частици отново полепват по външната страна на накрайниците. Последният етап се състои в автоматично отделяне на използваните накрайници от металните родове. Крайният резултат е получаване на чиста геномна ДНК с висока концентрация.

Таб. 3.8. Използвани реактиви при изолиране с полуавтаматизирана система Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen):

Етап	**Компоненти**	**Количество за 1 реакция (мл)**
1	венозна кръв	6-8
	Лизиращ буфер	7-9
	Протеаза	25 мкл
2	Свързващ магнитни частици буфер	25
	Магнитни частици	800 мкл
Промиване	Миещ буфер 3	15
	Миещ буфер 4	15
	Миещ буфер 5	15
	Миещ буфер 6	22.5
Елуиране	Елуиращ буфер – съдържа 10 мМ Tris – HCl pH=8.0. TE буфер pH=8.0.	500 – 1000 µl

Съдържанието на реактива за изолиране на ДНК чрез полуавтоматизираната система Chemagen е следното:

- **Елуиращ буфер** – съдържа 10 мМ Tris – HCl pH=8.0. TE буфер pH=8.0.
- **Свързващ буфер 2** и **промиващи буфери 3 – 6** съдържат етанол.
- **Магнитни частици**

Етапи:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (натриев додецил сулфат – детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действие на протеиназата);
- Свързване на освободената от ядрата ДНК към магнитните частици;
- Отделяне на комплекса ДНК-магнитни частици от кръвно-клетъчния лизат;
- Няколкократно промиване с етанол съдържащи буфери;
- Освобождаване на пречистената ДНК от магнитните частици;

Процедура

- Получаване на клетъчен лизат –във всяка 50 мл епруветка се смесват определени количества венозна кръв с лизиращия буфер до 15 ml
- Прибавяне на 25 µl Протеаза. Разрушаване на клетъчните стени- активно смесване 20 мин
- Прибавяне на Свързващ буфер (25ml) и магнитни частици (800 µl). Активно смесване 10 мин.
- Промиване на комплекса ДНК-магнитни частици последователно в Буфери от 3 до 6.
- Елуиране на ДНК е елуиращ Буфер ЕВ (в зависимост от 500 до 1000µl)

Позициите на подвижния модул са номерирани във възходящ ред и в различните позиции се поставят епруветки със съответния буфер

Използвана апаратура:

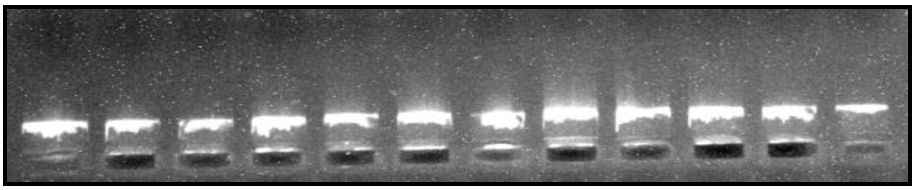
- Хладилна центрофуга Centifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex – Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell).
- Системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)

3.2.1.2. Оценка на качеството и концентрацията на изолираната ДНК

За оценка на качеството на изолираната геномна ДНК се беще използвана агарозна гел електрофореза (виж. "**Хоризонтална агарозна гел електрофореза**").

Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено посредством тестване на агарозна гел електрофореза върху 0,8 % агарозен гел и 1X TBE (трисборатен буфер). Визуализацията на фрагментите е осъществена посредством използване на етидиев бромид с концентрация 0.05 мкл/мл.

Чрез електрофорезата се определя цялостта на геномната ДНК и полуколичествено нейната концентрация като се използват и контроли. Може да се наложи допълнително пречистване на високомолекулната ДНК от неотстранени при процеса на изолиране белтъци и соли. При наличие на "пътека" (smearing), съставена от множество фрагменти, се прави изводът, че ДНК е деградирала и не може да се използва за анализ (**Фиг. 3.5**).



Фиг 3.5. Агарозна електрофореза (0.8%) на геномна ДНК.

За приблизителна оценка на дължината на ДНК фрагментите е използван молекулен маркер (ladder) – смес от ДНК фрагменти с известна дължина и концентрация. За целта е необходимо преди началото на електрофорезата маркерът да се нанесе успоредно с анализираните проби. Методът дава възможност и за приблизителна оценка на количеството ДНК в анализираната проба.

Концентрацията на изолираната ДНК е измерена чрез апарат NANODROP (Thermo Scientific). Отношението на абсорбциите, измерени съответно при λ 260 и λ 280, показва

чистотата на ДНК – използвахме само ДНК проби, за които това съотношение бе между 1.7 и 2.0. Стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2.0 – примеси от РНК.

Отношението $\mathbf{A_{260}/A_{280}}$ дава представа за съдържанието на белтъци и РНК и трябва да бъде в диапазона от 1.6 до 2.0 (стойности под 1,6 показват наличие на остатъчни белтъци, а над 2.0 – наличие на остатъчна РНК).Отношението $\mathbf{A_{230}/A_{260}}$ дава представа за съдържанието на захари и трябва да бъде в диапазона от 0.3 до 0.9 (стойности над 0.9 показват наличие на остатъчни захари).

Концентрацията на работните ДНК разтвори варира между 10 -30 нг/мкл в зависимост от изискванията на съответния молекулярно-генетичен анализ. Тези разтвори се приготвят чрез разреждане на определен обем от изходния концентриран ДНК разтвор с дестилирана вода (стерилна) или стерилен ТЕ буфер до краен обем 200 мкл.

Използвана апаратура:

- Спектрофотометър – **NanoDrop ND-1000**

За подготовката на работни разтвори на ДНК са използвани 96 ямкови плаки (Greiner). Всяка ямка съдържа ДНК от различни проби. Целта е в ямките да има еднакви по концентрация разтвори на ДНК-и. Нормализирането на концентрациите на работните разтвори е извършено посредством използване на стерилен, прясно приготвен ТЕ буфер като разтворител на изходните стокове ДНК (виж **Табл 3.1**).

3.3. Аналитична обработка на получената ДНК

3.3.1. Полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод в молекулярната биология и молекулната диагностика. Методът е разработен от K. B. Mullis през 1985 г. и представлява ензимно амплифициране (намножаване) на специфична ДНК последователност в *ин витро* условия. В рамките на няколко часа е възможно да се синтезират милиони копия от желаната ДНК последователност, като за целта се използват специфични олигонуклеотидни праймери и ензим ДНК полимераза.

Във всяка амплификационна реакция участват:

- **Едноверижна ДНК матрица** – едноверижна матрица за осъществявания процес, получена след топлинна денатурация на геномната ДНК при 94 ^{0}C.

- **Термостабилна ДНК полимераза (Taq полимераза)** – осъществява процес на намножаване на желаната ДНК-последователност. За първи път е изолирана от бактерията **Termophylus aquaticus**. Ензимът Taq- полимераза е термостабилен и запазва активността си 45 до 60 мин. При 94˚C – т.е. през целия амплификационен процес. Оптималната температура за синтез с Taq – полимеразата е 72˚C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е от 1 до 5 U. Катализира синтеза на нови ДНК вериги в посока 5′→3′.

- **Двойка праймери (прав (forward, F) и обратен (reverse, R)** – представляват двойка къси, синтетични олигонуклеотиди, които са комплементарни на участъците, разположени от двете страни на интересуващата ни ДНК последователност. След като праймерите се свържат с матрицата, полимеразата започва да синтезира нова ДНК верига, комплементарна на матричната ДНК. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0,1 – 1,0 мкМ.

- **Дезоксирибонуклеозид трифосфати (дНТФи, dNTPs)** – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно по принципа на комплементарност на базите в структурата на ДНК. Задължително условие е четирите типа дНТФ да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес.

Оптималната концентрация за всеки нуклеотид е 20 до 200 мкМ.

- **Реакционен буфер** – осигурява подходящо pH=8,3 – 9,0 на средата и необходимите йони за действие на полимеразата. В състава си включва 10-50 мМ Tris-HCl, pH=8,3-9,0 ; до 50мМ KCl и 0,5-5,0 мМ $MgCl_2$. Възможно е да съдържа също така и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти, като диметил сулфооксид (DMSO), и други. Компонентите на буфера могат да варират по качество и количество в зависимост от използваната Taq – полимераза.

Полимеразната верижна реакция започва с първоначална продължителна термична денатурация за разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК. На геномната ДНК (2 до 5 мин. При 92 до 95°C). Амплифицирането на желания участък се осъществява чрез провеждане на 30–40 цикъла, всеки от които се състои от 3 последователни стъпки:

- **Термична денатурация (denaturation)** – целта е да настъпи пълна денатурация на двойноверижните ДНК молекули до получаване на едноверижни матрици необходими за процеса на амплификация. Продължителността на тази стъпка обикновено е 10 сек. До 1 мин., а необходимата температура -90 до 98°C.

- **Хибридизация (annealing)** – осъществява се между праймерите и комплементарните им участъци от матричната, едноверижна ДНК. Темпертурата на това взаимодействие е строго специфична и се определя от базовия състав и дължината на използваните праймерни последователности.

Емпирично температурата на хибридизация на праймерите може да бъде изчислена по следната формула: **T°C хибридизация = (A+T)x2+(G+C)x4-5°C**

- **Синтез (elongation)** – под действието на полимеразата се осъществява синтез на нова ДНК верига, комплементарна на матричната ДНК верига. Новата ДНК-верига е синтезирана в посока 5'→3'. Температурата се определя от особеностите на използвания ензим, като целта е да се осигури оптимална полимеразна активност. Обикновено тази температура е 72 до 74°C. Продължителността на тази стъпка се определя от очакваната дължина на PCR продукта (1 мин. За PCR продукт с големина 1 кб, при използване на *Taq* полимераза).

- Полимеразната верижна реакция завършва с ***краен продължителен синтез*** (5 до 10 мин. При 72°C), с цел да се осигури цялостно изграждане на някои частични ДНК фрагменти.

Методът на полимеразна верижна реакция е изключително чувствителен и изисква само няколко ДНК молекули в една реакция. Затова е много важно да се избягва контаминация с чужда ДНК, присъстваща в лабораторията (бактерии, вируси или човешки източници).

Поради възможността от контаминация на т.нар. master mix със случайно попаднала чужда ДНК, е необходимо да се заложи отрицателна контрола. Тя съдържа всички компоненти на реакционната смес с изключение на ДНК, която е заместена с ddH_2O. Липсата на амплификационен продукт в отрицателната контрола показва, че реакционната смес не е била замърсена със случайно попаднала чужда ДНК.

След завършване на амплификационната реакция се прави оценка на получените продукти върху агарозен гел (вж. "**Хоризонтална агарозна гел електрофореза**").

Секвенциите на праймерите за амплификация на прицелните участъци, съдържащи изследваните полиморфизмни варианти в са дадени в **Табл 3.9 -3.10.**

Табл.3.9. Секвенции на праймерите за амплификация на участъците, съдържащи целевите полиморфизми в локус 9p21.

ПОЛИМОРФЕН ВАРИАНТ	СЕКВЕНЦИИ НА ПРАЙМЕРИТЕ	ДЪЛЖИНА НА ФРАГМЕНТА (б.дв.)	ТЕМПЕРАТУРА НА ХИБРИДИЗАЦИЯ (^{0}C)
9p21_rs7865618 A>G	**F: 5'- ACA GGG GAT GGA TTC TTG TG-3'** **R: 5' – TGC ATT GTG AAG GTG ACA TAT AC -3'**	**224**	**59**
9p21_rs1537378 C>T	**F: 5' – CAT AAT CAA AAT CAA GCC TGT T – 3'** **R: 5' – ACA CCT TGT AAG GGC TGG GA – 3'**	**187**	**60**
9p21_rs7857345 C>T	**F: 5'- CGG TGG CAG AGG ACA GTA TAG -3'** **R: 5'- AGG CAT TTC TGA AAA ATA AGC -3'**	**207**	**57**
9p21_rs10757274 G>A	**F: 5'- GTT TCT GCA CAT GGT GAT GG -3'** **R: 5' – CTT CTG CCT CAC TCT CCA GTT -3'**	**253**	**59**
9p21_rs2383206 G>A	**F: 5'- AAT TCT CCC TTA CTA TCC TGG -3'** **R: 5' – CAA ACT AAA GAG GTC ATG CAC -3'**	**290**	**60**

Табл.3.10. Секвенции на праймерите за амплификация на участъците, съдържащи целевите полиморфизми в гените *CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, VKORC1* и *APOE.*

ПОЛИМОРФЕН ВАРИАНТ	СЕКВЕНЦИИ НА ПРАЙМЕРИТЕ	ДЪЛЖИНА НА ФРАГМЕНТА (б.дв.)	ТЕМПЕРАТУРА НА ХИБРИДИЗАЦИЯ (0C)
CYP2C19*2 (681G>A rs4244285	**F: 5'- AGA TAT GCA ATA ATT TTC CCA CT-3' R: 5' – ATA AAG TCC CGA GGG TTG TT -3'**	**161**	**60**
CYP2C19*17 (-806 C>T) rs12248560	**F: 5' – AAA TTT GTG TCT TCT GTT CTC AAA – 3' R: 5' – TAG CTG GCA GAA CTG GGA TT – 3'**	**100**	**58**
CYP3A5*3 (6986A>G) rs776746	**F: 5'- ACC ACC CAG CTT AAC GAA TG-3' R: 5'- ACA GCA AGA GTC TCA CAC AGG A -3'**	**150**	**62**
CYP2C9*2 (430C>T) rs1799853	**F: 5'- CCT GGG ATC TCC CTC CTA GT-3' R: 5' – TTC CAA GAA TGT CAG TAG AGA AG-3'**	**257**	**60**
CYP2C9*3 (1075A>C) rs1057910	**F: 5'- TTG AAC GTG TGA TTG GCA GA-3' R: 5' – TCG AAA ACA TGG AGT TGC AG -3'**	**210**	**60**
VKORC1 -1639G>A rs9923231	**F: 5'- AGT TTG GAC TAC AGG TGC CTG-3' R: 5' – GCC AGC AGG AGA GGG AAA TA -3'**	**290**	**60**
VKORC1 1173C>T rs9934438	**F: 5'- GGG TGG AAC CAG GTT AGG AC-3' R: 5' – AAA GCA GGG CCT ACG GAG T -3'**	**234**	**58**
VKORC1 (3730G>A) rs7294	**F: 5'- CTG GGC AAT GGA AAG AGC-3' R: 5' – CAG GGC AAG GCT AAG AGG -3'**	**263**	**59**
VKORC1 (497T>G) rs2884737	**F: 5'- CAT CAC GCA CAG CCA GAC-3' R: 5' – CAA GGG ACC AGA CAG TGC T -3'**	**208**	**65**
VKORC1 (698C>T) rs17708472	**F: 5'- AGG CTG GTC AAC TCC TGA-3' R: 5' – GTC TGG CTG TGC GTG ATG -3'**	**271**	**66**
APOE (g.7903T>C) rs429358	**F: 5'- GCC TAC AAA TCG GAA CTG GA-3' R: 5' – CAG CTC CTC GGT GCT CTG -3'**	**183**	**65**
APOE (g.8041C>T) rs7412	**F: 5'- GCC AGA GCA CCG AGG AG -3' R: 5' – CCG GCC TGG TAC ACT GC -3'**	**115`**	**65**
APOE	**F: 5'- TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA -3' R: 5' – GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'**	**218**	**65**

Реактивите, необходими за протичане на PCR реакцията, използвани в хода на изследването, са представени в **Табл. 3.11**.

Табл.3.11 Реактиви за PCR реакцията, използвани в хода на изследването (отнася се за всички изследвани в хода на анализа полиморфизми):

РЕАКТИВИ:	**КОЛИЧЕСТВА ЗА ЕДНА ПРОБА:**
Дейонизирана вода	16.30 мкл
Буфер (1X)	2.50 мкл
$MgCl_2$ (50 мМ)	0.75 мкл
дНТП (5 мМ)	1.00 мкл
Праймер F (10 мкМ)	0.60 мкл
Праймер R (10 мкМ)	0.60 мкл
Багрило Syto 9 (50 мкМ)	0.60 мкл
ДНК (10 нг/мкл)	2.50 мкл
Краен обем на реакцията:	25.00 мкл

Условията за протичане на PCR реакцията, използвани в хода на изследването, са представени в **Табл. 3.12**.

Табл.3.12. Условия на PCR реакцията, използвани в хода на изследването (отнася се за всички изследвани в хода на анализа полиморфизми):

ЕТАП:	**ТЕМПЕРАТУРА:**	**ВРЕМЕ:**
Начална денатурация	95°C	3 мин.
Денатурация	95°C	15 сек.
Хибридизация (анийлинг на праймерите)	57-65°C	15 сек
Елонгация (синтез)	72°C	20 сек.
Крайна елонгация	72°C	10 мин.
Hold	4°C	-

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. За положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, за която е известно, че се амплифицира за даден маркер. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. От друга страна в отрицателната контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се замества с ddH2O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

Използвана апаратура:

- Апарат за PCR-амплификация в реално време **RotorGene 6000 (Qiagen).**

3.3.1.2. Хоризонтална агарозна гел електрофореза

Реактивите, използвани при агарозната електрофотеза, са представени в **Табл. 3.13.**

Табл. 3.13. Състав и количество на използваните реактиви и разтвори при работа с агарозна гел електрофореза

Реактив:	**Изходни реактиви**	**Количество изходен реактив**	**ddH2O**
ТВЕ буфер (5х) pH 8.0: **90мМ TrisHCl** **90мМ борна киселина** **1мМ Na_2EDTA**	TrisHCl борна киселина Na_2EDTA	54.0 г 27.5 г 4.76 г	до 1000 мл
0.8% агарозен гел	агароза 5х ТВЕ буфер	0.8 г 20 мл	до 100 мл
2.0% агарозен гел	агароза 5х ТВЕ буфер	**4.** г 20 мл	до 100 мл
Етидиев бромид – 10мг/мл	етидиев бромид	1.0 г	до 100 мл

Принцип:

Хоризонталната агарозна гел електрофореза представлява метод за разделяне, идентификация и пречистване на ДНК фрагменти. Методът позволява ДНК фрагментите да се разделят един от друг в зависимост от тяхната молекулна маса. Тази техника е използвана за определяне качеството и количеството на амплификационните продукти. За приблизителна оценка на дължината на ДНК фрагментите се използва молекулен маркер (ladder). Това е смес от ДНК фрагменти с известна, точно определена дължина. За целта е необходимо преди началото на електрофорезата маркерът да се нанесе успоредно с анализираните проби. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално pH ДНК фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анод). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите зависи от молекулната им маса, от концентрацията на агарозния гел, температурата, състава и йонната сила на използвания буфер и др. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минамално и ДНК фрагментите се придвижват по бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва ТВЕ буфер. След приключване на електрофоретичното разделяне, е необходима визуализация на ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид (0.5 мкг/мл) се интеркалира между базите в молекулата на ДНК и позволява визуализиране на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина с дължина на вълната λ = 315 нм. Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор.

Етапи:

- Приготвяне на необходимия % агарозен гел
- Нанасяне на пробите върху него
- Протичане на електрофоретичното разделяне на амплифицирания продукт
- Визуализация на разделените по молекулна маса на амплифицирани продукти

Процедура:

- Приготвяне и отмерване на необходимите количества стартови реактиви и разтвори- агароза и 5хТВЕ буфер. Разтапяне на агарозата.
- Прибавяне на етидевият бромид при достигане на подходяща температура на хомогенната смес.

- Изливане на сместа в подходящо сглобена вана с поставени пластмасови гребени, оформящи стартовете.
- След като гела е стегнал и изстинал се отделя от ваната за изливане и се поставя във ваната за електофоретично разделяне напълнена с пресен 1xTBE буфер.
- Смесване на 3µl PCR продукта с 3µl разтвор за нанасяне на пробите 10x и нанасянето им на гела. В един от стартовете на гела се нанася и молекулен маркер. Дължината на продуктите от PCR реакцията се идентифицират с помощта на ***молекулни маркери***. В настоящата работа бяха използван 1 молекулен маркер с дължина 100-1000 б.дв за PCR (New England BioLabs).
- Електрофоретично разделяне при 140 V за до 30 мин.
- Визуализиране на разделените фрагменти чрез UV- визуализираща система.

При изработването на настоящия дисертационен труд, хоризонталната агарозна електрофореза е използвана за:

1. Установяване на наличието на амплификационни продукти след провеждането на PCR реакция и наличието или отсъствието на допълнителни, нежелани фрагменти, както и преценка за количеството на намножените продукти – за целта е използвана 2% агарозен гел и 1X TBE буфер. При успешно проведена амплификация, върху гела се визуализира само една ивица, като фрагментите са с предварително очакван размер. Липсват неспецифични (допълнителни) ивици (респ. Продукти).

2. Оценяване на целостта на изолираната геномна ДНК – за целта се използва 0,8% агарозен гел и 1xTBE буфер. При наличие на "пътека" (smearing), съставена от множество фрагменти, се прави изводът, че ДНК е деградирала и не би могла да се използва за анализ.

Използвана Апаратура:

- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27**);**
- Нивелирана маса за изливане на гела;
- Вана за хоризонтална гел електрофореза (Science-Plus-UK);
- Стартови гребени с размер на зъбците 5 x 1mm;
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фото-документационна система и UV–трансилюминатор с дължина на вълната 315nm (MiniBisPro – Bio Imaging Systems)

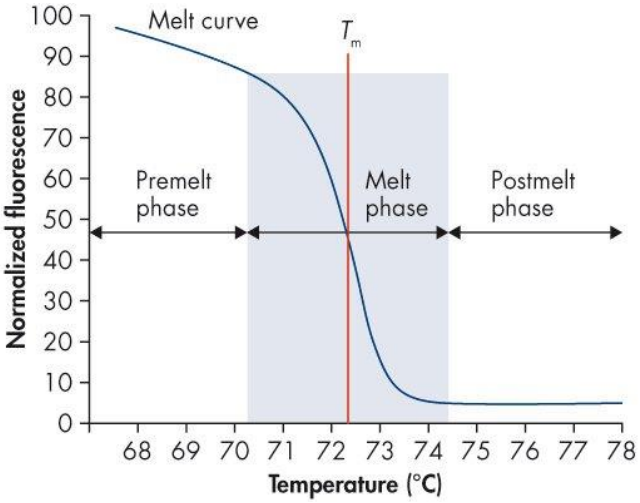
3.3.2. Анализ чрез топене с висока резолюция на ДНК (High Resolution Melting Analysis, HRMA)

Анализът чрез топене с висока резолюция (HRMA) представлява високо ефективен и бърз метод за детекция на мутации, полиморфизми и епигенетични промени в двойноверижната структура на ДНК. Техника се основава на поведението на дисоциация на ДНК при постепено повишаване на температурата. Профилът на топене на ДНК зависи от съдържанието на цитозин и гуанин и общото разпределение на базите в нуклеотидната секвенция. Районите, които са богати на аденин и тимин, се топят по-бързо, в сравнение с тези, които са богати на цитозин и гуанин (**Табл.3.14 и Фиг. 3.5**).

Табл.3.14. Основни класове единични базови замени и процентното им рапределение в човешкия геном.

Клас SNP :	**Базова замяна:**	**Разлика в температурата на топене на хомозиготните проби:**	**Процентно разпределение при човек:**
I	**C/T и G/A**	**Голяма: >0.5°C**	**64%**
II	**C/A и G/T**	↓	**20%**
III	**C/G**		**9%**
IV	**A/T**	**Много малка: <0.2°C**	**7%**

При анализът чрез топене с висока резолюция прицелният участък от геномната секвенция се генерира чрез амплификация и след това се подлага на топене при условия на постепенно повишаване на температурата през малки интервали. Това се прави в присъствието на флуоресциращо багрило, което интеркалира в двойноверижната структура на ДНК. При провеждане на анализа, температурата се увеличава постепенно от ниска към висока. Флуоресценцията на третото поколение флуоресциращо багрило (**SYTO 9**) се измерва непрекъснато и се представя графично срещу повишаване на температурата. Повишена флуоресценция се измерва само тогава, когато багрилото е свързано с ДНК. При по-ниски температури флуоресценция е висока, тъй като ДНК е двойноверижна. При повишаване на температурата ДНК започва да се денатурира в резултат на топене двойноверижната структура. При този процес, багрилото се освобождава и флуоресценцията постепено намалява. При анализа температурата на топене (Тт) на дадена проба се наблюдава в т. Нар. Фаза на топене, флуоресценцията е най – висока. Когато ДНК се стопи напълно, се наблюдава рязък спад в нивото на флуоресценция (**Фиг.3.6**).



Фиг.3.6 Основни фази при топенето на двойноверижна ДНК.

Промяната във флуоресценцията на багрилото е показател за увеличаването на концентрацията ДНК по време PCR реакцията, а също така се използва и за проследяване профила на топене на ДНК по време на HRM анализа.

HRMA позволява откриването на много фини разлики между две ДНК секвенции на ниво дори един нуклеотид.

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

В настоящето изследване са използвани **TaqMan®** проби за качествено определяне на нуклеотидни последователности. Наличието на две сонди във всяка реакция, позволява генотипирането на двата варианта на еднонуклеотидните полиморфни замени в изследваната секвенция. Всеки **TaqMan®** експеримент се състои от два основни компонента:

5. Два специфични праймера, заграждащи интересуващия ни фрагмент ДНК, съдържащ варианта, който ще бъде изследван;

6. Две алел-специфични TaqMan® MGB сонди, за детекция на алелите на полиморфния вариант.

Алел специфичната TaqMan® MGB сонда включва:

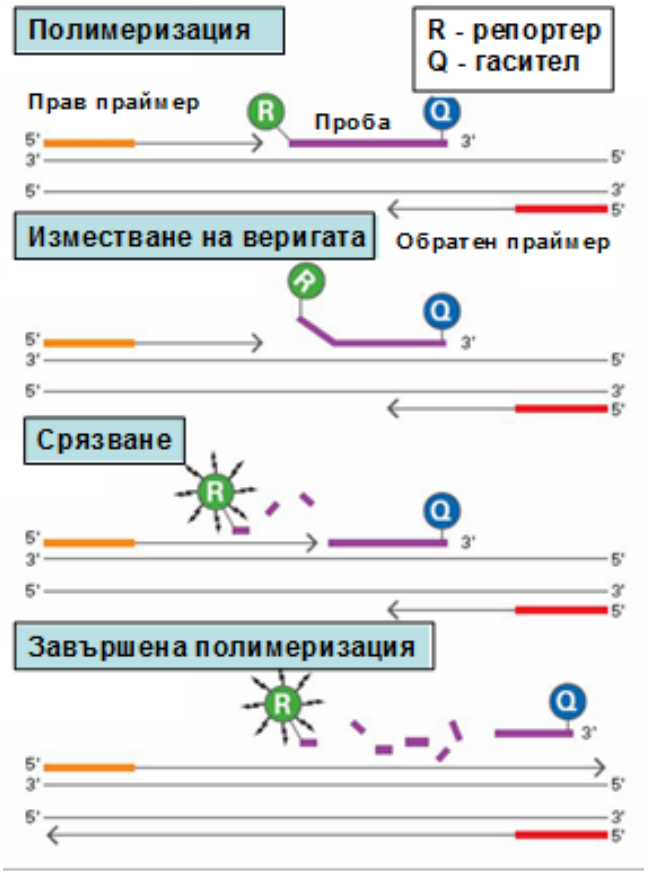
7. **Маркерна боя (флуорохром)** в 5'края си – обикновено VIC® багрило е свързано към 5'края на сондата за алел 1, а FAM™ багрилото е свързано към 5' края на сондата за алел 2. Алел 1 VIC® флуоресцентно белязаната сонда отговаря на единия алел на полиморфизма, а Алел 2 FAM™ флуоресцентно белязаната сонда – на другия. Когато

бъде възбудена под действие на енергията на лазерен лъч, всяко от тези багрила излъчва светлина с определена дължина на вълната;

2) MGB (Minor groove binder), който повишава температурата на топене (Tm) за конкретната дължина на сондата, позволява дизайн на по-къси сонди. По-късите сонди повишават ефикасността на генотипиране;

3) Нефлуоресцентен гасител (NFQ) в 3'края, който позволява отчитането на макерния флуоресцентен сигнал.

Етапите на реакцията при PCR в реално време са представени на **Фиг. 3.7.**



Фиг. 3.7. Етапи на полимеразната верижна реакция с използване на TaqMan проби

- Всяка TaqMan® MGB сонда се свързва специфично за комплементарната ѝ секвенция между правия и обратния праймер. Когато сондата е интактна, близостта на гасителя до репортера действа, така че подтиска флуоресценцията на репортера.
- По време на реакцията, залепената сонда разделя репортера и гасителя. Натрупването на PCR продукти се детектира директно, като се следи увеличаването на флуоресценцията на репортера и се отчита с лазер, като обработката на резултатите се извършват чрез компютър. Поради наличието на праймер, Taq полимеразата започва изграждането на комплементарната верига, като спазва 5'->3' полимеразната и екзонуклеазната активност По този начин Taq полимеразата започва да добавя нуклеотиди по растящата верига и премахва Taqman® нуклеотидите от прицелната ДНК. Този процес отделя репортера от гасителя като по този начин репортера се активира. На база дължината на вълната на флуоресцентния сигнал, отделен от всяка проба, се определя кои алели присъстват в нея.

Първичната обработка на данните от проведената полимеразна верижна реакция в реално време е направена с програмния продукт на фирмата Applied Biosystems – SDSv2.2.2.

Реактивите, които са използвани и тяхното количество са представени в **Табл. 3.15.**.

Табл. 3.15. Реактиви и тяхното количество използвани при HT Fast Real-Time PCR

Компоненти	Количество (µl)
PCR MIX	2.5
40x SNP mix	0.125
dH2O	1
DNA (20ng/µl)	1.5

Термален профил за всички амплификации:

Стъпка 1: 95°C за 10 мин. – 1 цикъл
Стъпка 2: 95°C за 15 сек. – 40 цикъла
60°C за 60 сек. – 40 цикъла

Използвана апаратура и помощни технически средства
- Хладилна центрофуга **5810R (Eppendorf)**;
- Устройство за разбъркване **Press–to–mix (Snijders)**;
- Сух стерилизатор **MMM (Ecocell)**;
- Автоматизирана система **Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)**.
- Спектрофотометър **Spectrophotometer NanoDrop1000**.
- **7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)**.

Автоматизирана лабораторна система (**Backman BIOMEK®FXp)** е използвана за разкапване на работните ДНК и реактиви за амплификационната реакция в 384 ямкови плаки.

За контрол на качеството на генотипирането бяха използвани няколко подхода:

- за успешно проведени са приемани само експерименти, при които е наблюдавана амплификация при над 95% от пробите;
- десет случайни проби са генотипирани двукратно в два независими експеримента, за да се докаже възпроизводимостта на метода. По този начин се гарантира надеждността и повторяемостта на получените резултати;
- след определяне на генотипните и алелни честоти за даден маркер, данните са анализирани за наличие на отклонения от уравнението на Харди-Вайнберг – тази проверка има за цел да установи присъствие на проби от близко родствени индивиди, проби от индивиди с различна етническа принадлежност и др.
- нулеви контроли – във всяка плака са включвани по четири контролни проби. Които не съдържат ДНК. За да се провери наличието или отсъствието на замърсяване.

Полиморфните варианти, изследвани в настоящия дисертационен труд, чрез използване на TaqMan метод, са представени в **Табл. 3.16.** .

Табл. 3.16. Полиморфни варианти, изследвани в настоящия дисертационен труд, чрез използване на TaqMan метод.

Хромозома	Позиция	Ген или междугенно пространство	Идентификационен номер	Замяна	Вид замяна	Локализация на полиморфния вариант	Честота на рисковия алеле при контроли	TaqMan кит	VIC	FAM	
6p24.1	**12903957**	***PHACTR1***	**rs9349379**	**A>G**	**Транзиция**	**intron**	**0.39**	**C___1756707_10**	**A**	**G**	**20X**
9q34.2	**136154168**	***ABO***	**rs579459**	**C>T**	**Транзиция**	**missense**	**0.19**	**C__26744819_10**	**C**	**T**	**20X**
1q21.3	**154437896**	***IL6R***	**rs2229238**	**C>T**	**Транзиция**	**UTR-3**	**0.18**	**C__16172164_10**	**C**	**T**	**20X**
6q25.1	**151252985**	***MTHFD1L***	**rs6922269**	**A>G**	**Транзиция**	**intron**	**0.26**	**C__29894051_10**	**A**	**G**	**20X**
1p32.3	**55496039**	***PCSK9***	**rs11206510**	**T>C**	**Транзиция**	**intron**	**0.84**	**C__32221221_10**	**C**	**T**	**20X**
5p13.3	**32815028**	***NPR3 – C5orf23***	**rs1173771**	**A>G**	**Транзиция**	**intergenic**	**0.51**	**C___8809478_10**	**A**	**G**	**20X**
20q13.32	**57751117**	***GNAS – EDN3***	**rs6015450**	**A>G**	**Транзиция**	**intergenic**	**0.10**	**C___1362126_20**	**A**	**G**	**20X**
16q23.3	**82642651**	***CDH13***	**rs11646213**	**A>T**	**Трансверсия**	**intergenic**	**0.59**	**C__10076324_10**	**A**	**T**	**20X**
7q35-36	**150690176**	***eNOS***	**rs3918226**	**C>T**	**Транзиция**	**Intragenic**	**0.12**	**C__30245515_10**	**C**	**T**	**20X**
12q21.33	**90008959**	***ATP2B1***	**rs2681472**	**A>G**	**Транзиция**	**intron**	**0.88**	**C__16057071_10**	**A**	**G**	**20X**
10	**114758349**	***TCF7L2***	**rs7903146**	**C>T**	**Транзиция**	**intron**	**0.33**	**C__29347861_10**	**C**	**T**	**40x**
10	**114923825**	***TCF7L2***	**rs290481**	**G>A**	**Транзиция**	**intron**	**0.15**	**C___1349537_10**	**C**	**T**	**40x**
2	**227660544**	***IRS1***	**rs1801278**	**C>T**	**Транзиция**	**missense**	**0.09**	**C___2384392_20**	**C**	**T**	**40x**
7	**127878783**	***LEP***	**rs7799039**	**G>A**	**Транзиция**	**UTR-5**	**0.49**	**C___1328079_10**	**A**	**G**	**40x**
3q27.3	**186570892**	***ADIPOQ***	**rs2241766**	**T>G**	**Транзиция**	**synonymous**	**0.11**	**C__26426077_10**	**G**	**T**	**40x**
3	**186571123**	***ADIPOQ***	**rs1501299**	**G>T**	**Транзиция**	**intron**	**0.30**	**C___7497299_10**	**G**	**T**	**40x**
3	**186559474**	***ADIPOQ***	**rs266729**	**C>G**	**Трансверсия**	**UTR-5**	**0.30**	**C___2412786_10**	**C**	**G**	**40x**
16	**53820527**	***FTO***	**rs9939609**	**T>A**	**Трансверсия**	**intron**	**0.08**	**C__30090620_10**	**A**	**T**	**40x**
1	**60392494**	***CYP2J2***	**rs890293**	**C>A**	**Транзиция**	**UTR-5**	**0.04**	**C___9581699_80**	**A**	**C**	**20X**
10	**96798749**	***CYP2C8***	**rs10509681**	**T>C**	**Транзиция**	**missense**	**0.12**	**C__25625782_20**	**C**	**T**	**20X**
9	**22124477**	***CDKN2B-AS1***	**rs10757278**	**A>G**	**Транзиция**	**UTR-5**	**0.45**	**C__11841860_10**	**A**	**G**	**20X**
10	**54531235**	***MBL2***	**rs1800450**	**C>T**	**Транзиция**	**missense**	**0.14**	**C___2336609_20**	**C**	**T**	**40x**

3.3.4. Директно секвениране

Секвенирането на PCR продуктите е референтен метод за директен ДНК анализ. При него, определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин, те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да синтезира ДНК. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатуриращa полоакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията.

Етапи

- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR
- Пречистване на продукта с ExoSAP
- Секвенционна реакция
- Преутаяване на секвенционните продукти
- Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции
- Анализ на получените резултати

1. Амплификация на изследвания ДНК фрагмент чрез PCR реакция

PCR реакцията се провежда при оптималните условия за съответния участък.. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел. За да се премине към секвениране. Получените продукти трябва да са чисти. Без наличие на неспецифични продукти.

2. Пречистване на амплификационния продукт

Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP, с цел премахване на dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – екзонуклеаза I и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP). Екзонуклеазата разгражда неизползваните праймери и едноверижни ДНК фрагменти, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извърва чрез смесването му в съотношение 1:1 с стерилен TE буфер (0.6µl ExoSap+0.6 µl TE буфер) и директното му добавяне към PCR продукта в съотношение 15 µl PCR продукт:1.2 µl смес ExoSAP + TE буфер.

Пречистените проби могат да се съхраняват на –20 ºC.

Табл. 3.17. Приготвяне на ExoSAP.

Ензим	**Обем [µl]**
Екзонуклеаза I (ExoI) – 20 U/µl	20
Алкална фосфатаза (SAP) – 1 U/µl	80

Табл. 3.18. Необходими компоненти. Както и техните количества. За провеждане на ExoSAP реакция.

Компонент	**Обем [µl]**
PCR продукт	1.50
ExoSAP	0.75
Краен обем	**2.25**

Табл. 3.19. Условия за инкубация на пробите при провеждане на ExoSAP пречистване.

Етап	**Температура [°C]**	**Време [min]**
Действие на ензимите	37	30:00
Инактивиране на ензимите	80	15:00

3. Провеждане на секвенционна реакция

Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1, (Appilied Biosystems), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. ДНК-полимеразата е термостабилна ДНК-полимераза, толерантна към високи солеви концентрации и с висока процесивност. Към 3'-края на всеки от четирите вида дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при λ=488 nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери (Таблица 3.10.). Следва намножаване на фрагмента.Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация. Условията за тази PCR реакция са:

Необходимите компоненти. Както и техните количества. За провеждане на секвенционна реакция са дадени в **Табл. 3.20**. Пробите се инкубират в PCR апарат по определена програма (**Табл. 3.21)**.

Табл.3.20. Необходими компоненти. Както и техните количества. За провеждане на секвенционна реакция.

Компонент	**Обем [µl]**
Пречистен PCR продукт (ДНК матрица)	2.25
5 X Секвенционен буфер	2.0
Big Dye Terminator v3.1	0.8
Праймер (F или R) – 20 µM	0.1
Дестилирана H_2O	4.85
Краен обем	**10.0**

Табл. 3.21. Условия за инкубация на пробите при провеждане на секвенционна реакция.

Етап	**Температура [°C]**	**Време [min]**	**Брой цикли**
Начална денатурация	96	05:00	
Денатурация	96	00:20	30
Хибридизация	55	00:20	
Синтез	60	02:00	
Краен синтез	60	05:00	

4. Пречистване на секвенционните продукти (преципитация с етанол. ЕДТА и натриев ацетат)

Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависивост от броя проби, преутавяването може да се направи в епруветки или на плака. Включва два етапа:

1. Преутаяване – към пробите се добавя натриев ацетат, ЕДТА и 95% етанол. Така приготвените проби се оставят да инкубират за 15 минути на тъмно. След това се центрофугират на 3 000 rcf за 30 мин. И се отстранява супернатантата.
2. Пречистване – пробите се промиват със 70% етанол. Цетрофугират се на 1650 rcf за 20 мин, отсранява се супернатантата. Така приготвените утайки се изсушават на стайна температура и се разтварят с 14µl високо дейонизиран формамид.

5. Разтваряне на секвенционните продукти и подготовка на пробите за електрофоретично разделяне в 12 µl HI–DI Formamide.

6. Електрофоретично разделяне на секвенционните продукти (в автоматичен секвенатор) и обработка на получените данни.

Секвенционните реакции се обработват и отчитат след нанасяне на автоматичния секвенатор ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosistem). Крайният резултат е файл, съдържащ информация за анализираната проба и електрофореграма, съдържаща ДНК секвенцията.

Използвана апаратура и помощни технически средства:

- Хладилна центрофуга **5810R (Eppendorf)**;
- Устройство за разбъркване **Press–to–mix (Snijders)**;
- Сух стерилизатор **MMM (Ecocell)**;
- Автоматизирана система **Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)**.
- Спектрофотометър **Spectrophotometer NanoDrop1000**.
- Апарати за PCR амплификация **BIOER XP (ELTA) и QB–96 (LKB)**.
- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата;
- Нивелирана маса. Вана за изливане на гелове. Стартови гребени;
- Стартови гребени с размер на зъбците 5x1мм;
- Токоизправител (**Science-Plus-UK**);
- Фотодокументационна система и UV-трансилюминатор с дължина на вълната 312 nm (**MiniBisPro-Bio Imaging Systems**);
- Вана за хоризонтална електрофореза **(Science–Plus–UK);**
- Фотодокументационна система и UV–трансилюминатор **MiniBIS Pro (Bio–Imaging Systems).**
- Автоматичен секвенатор **ABI 3130*xl* Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems)**

3.4. Статистически методи

Всички данни бяха въведени и обработени с Microsoft®Office Excel 2003 (Microsoft Office Professional Edition 2003, Copyright©1985-2003, Microsoft Corporation). Създадените електронни таблици бяха проверени за коректен запис на информацията. За обработка на данните от проучванията, свързани с дисертационната работа, беше използвана версията на SPSS – SPSS v20.0.

За статистическия анализ на данните изпозлвахме следните статистически методи:

А. Описателни методи.

1. Вариационен анализ на количествени променливи – средна стойност, стандартно отклонение, минимум, максимум.

2. Честотен анализ на качествени променливи (номинални и рангови), който включва абсолютни честоти, относителни честоти (в проценти), кумулативни относителни честоти (в проценти).

3. Графични изображения – хистограма, boxplot.

Б. Методи за проверка на хипотези.

1. Параметрични.

1.1 Т-тест за две независими извадки – проверка за равенство на две средни.

2. Непараметрични методи.

2.1 Методи на Колмогоров-Смирнов и Shapiro-Wilk – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива.

2.2 Методи Chi-square или Fisher's exact test – търсене на връзка между две качествени променливи.

Хипотезите се приемат за статистически достоверни по общовъзприетите норми – $p<0,05$. Във всички случаи, в които в материала се цитират статистически достоверни разлики или се приемат работните хипотези, трябва да се разбира, че равнището на статистическа значимост е по-малко от 0,05. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато P стойността (P-value) е по-малка. При $p\geq0,05$ се приема нулевата хипотеза, т.е. между променливите в популацията, от която е направена случайна извадка на данните, не съществува статистически значима разлика.

За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. За сравнение на разпределението на непрекъснати величини между две групи болни беше приложен непараметричният тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney U тест), а при повече от две групи за сравнение беше прилаган анализа на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis). За ниво на статистическа значимост бе приета стойностза $p<0.05$.

Резултатите, съдържащи генотиповете на контролната и клиничните групи, бяха подложени на статистически анализ за асоциация и проверка на нейната статистическа значимост. Беше използвана програмата **PLINK** – отворен набор от инструменти за цялостна геномна асоциация [221].

3.4.1. Изчисляване на алелни и генотипни честоти

За автозомен локус *A* с два алела *A1* и *A2* са възможни точно три генотипа: *A1A1*. *A1A2* и *A2A2*. Изчисляването на генотипните честоти в извадката (пациенти. Контроли) става чрез разделяне на броя на индивидите с конкретен генотип на общия брой изследвани индивиди. Например изчисляването на f(*A1A1*) (честотата на генотипа *A1A1*) става по следната формула:

$$f(A1A1) = \frac{\text{брой индивиди с генотип } A1A1}{\text{общ брой изследвани индивиди}}$$

Алелните честоти могат да се представят в десетичен вид или в проценти. Сумата на всички алелни честоти в извадката е равна на 1 (100%).

Генотипните честоти могат да се представят в десетичен вид или в проценти. Сумата на всички генотипни честоти в извадката е равна на 1 (100%). Изчисляването на алелните честоти f(*A1*) и f(*A2*) в изследваната извадка става с помощта на следните формули:

$$f(A1) = \frac{(\text{брой индивиди с генотип } A1A1 \times 2) + \text{ брой индивиди с генотип } A1A2}{\text{общ брой изследвани индивиди } \times 2}$$

$$f(A2) = \frac{(\text{брой индивиди с генотип } A2A2 \times 2) + \text{брой индивиди с генотип } A1A2}{\text{общ брой изследвани индивиди} \times 2}$$

В числителя броят на хомозиготните индивиди се умножава по 2, тъй като хомозиготите притежават по 2 еднакви алела в изследвания локус. В знаменателя общият брой на изследваните индивиди се умножава по 2, тъй като всеки индивид притежава по 2 алела в изследвания локус.

Честотите могат да бъдат представени в десетичен вид или като проценти.

Тъй като стойността на стандартното отклонение на изследваните популации обикновено не е известно, може да се използва съответната извадкова оценка, чрез която се определя стандартното отклонение на извадковото разпределение (стандартната грешка на средната).

Стандартната грешка се изчислява по следната формула:

$SE = \sqrt{\frac{f(1-f)}{2n}}$, където:

f е честотата на алела в извадката;

2n е броят изследвани хромозоми.

В интервала f ± SE се намират истинските популационни алелни честоти.

3.4.2. Изчисляване на хетерозиготност

Хетерозиготността (H) е мярка за степентта на полиморфност на изследвания автозомен локус. Тя изразява вероятността случайно избран индивид от популацията да е хетерозиготен по отношение на даден локус. Очакваната хетерозиготност (H) се изчислява при предположение. Че популацията е в равновесие със закона на Харди-Вайнберг. Използва се следната формула:

$H = 1 - \sum (p_i)^2$. Където p_I е честотата на I^{тия} алел.

3.4.3. Закон на Харди-Вайнберг

Основното положение залегнало в закона на Харди-Вайнберг е. Че в една голяма. Свободно кръстосваща се популация алелните и генотипните честоти в даден локус са постоянни. Математическият израз на закона може да се представи чрез следната формула:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2.p.q + q^2 .$$

Където p е честотата на алела [A]. А q е честотата на алела [a]. Като [A] и [a] са двата алела срещащи се в изследвания локус и p+q=1.

Когато това съотношение между алелните честоти е спазено в популацията и съответно в представителната извадка. Която се изследва. То това означава. Че съществува генетично равновесие за изследвания локус.

Могат да бъдат наблюдавани отклонения от закона на Харди-Вайнберг. Които най-често се изразяват в повишена хомозитотност. Това може да се дължи на следните причини:

- Извадката не е подбрана добре и може да съдържа родствено свързани индивиди;
- В популацията липсва свободно кръстосване и в нея могат да съществуват отделни субпопулации. В които алелните честоти да се различават значително от тези характерни за общата популация;
- Върху популацията могат да действат селективни фактори;

- Методът на изследване на генотипните честоти в извадката не е достатъчно прецизен и това води до грешки при отчитането.

3.4.5. Неравновесна скаченост

Неравновесната скаченост между изследваните маркери (D^2/r^2) е изчислена с помощта на програмата HaploView 4.0 (Broad Institute of MIT & Harvard). A LD – блоковите структури са конструирани по метода "confidence interval of LD" (HaploView 4.0). Хаплотипният анализ е извършен с помощта на горепосочената програма.

3.4.6. Основни етапи на проверка на статистически хипотези

3.4.6.1. Формулиране на нулевата (H_0) и алтернативната (H_1) хипотези

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни. Приема се, че според нея не съществува статистически значима разлика между сравняваните групи. Получените разлики в експерименталните резултати се обясняват с действието на случайни фактори. Алтернативната (или още експериментална) хипотеза (H_1) е противоположна на нулевата хипотеза. В общия случай не се уточнява какъв е типът на зависимостта – т.е. дали присъствието на даден алел/генотип повишава или понижава риска за развитие на заболяването.

Първоначално трябва да се определи нивото на значимост – α (т.нар. Significance Level), което представлява вероятността (риска) да отхвърлим $\mathbf{H_0}$ хипотезата, дори ако тя е вярна. Най-често използваното ниво на значимост е α=0.05 или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли, когато всъщност е вярна. След това се изчислява вероятността (P) за получаване на наблюдаваните данни (или на данни с още по-голяма разлика между двете групи) при положение, че нулевата хипотеза е вярна и двете групи всъщност не се различават.

- При $P>\alpha$ H_0 не се отхвърля, което означава. Че между сравняваните групи не съществува доказуема (в случая) статистически значима разлика.
- При $P<\alpha$ H_0 се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи съществува статистически значима разлика.

Нулевата хипотеза може да бъде проверена с различни статистически методи - $\chi 2$, Ман-Уитни U тест, анализ на Крускал-Уолис и др.

3.4.6.2. Избор на тест за проверка на хипотезата

1) според вида на разглежданата променлива – непараметрични тестове при слаби скали (при категорийни/качествени или ординални стойности на разглежданата променлива) и параметрични тестове при силни скали (при интервални или количествени променливи);

2) според вида на разпределението на стойностите на променливата – параметричните методи имат изисквания към параметрите на разпределението (например изискват нормално/гаусово/ разпределение), докато при непараметричните част от параметрите нямат значение (или се толерира определено отклонение в стойностите им);

3) според наличието на зависимост между извадките, от които се получават сравняваните параметри, т.е. дали стойностите на променливата получени от едната група (извадка) се влияят от тези на другата. Извадките са независими, ако се сравняват стойностите на признака X в две групи, които нямат връзка помежду си и не споделят външни условия (коварианти), които биха повлияли на признака X в определена посока. Пример: Две групи пациенти без роднински връзки помежду си. При наличие на роднински връзки резултатите от сравнението се изкривяват в полза на нулевата хипотеза (тъй като роднините най-често имат сходни стойности на изследваните променливи). Ако са налице фактори на средата, които влияят на променливата (ковариванти), влиянието им може да бъде неутрализирано чрез групиране на стойностите на променливата според стойността на ковариванта.

4) според броя на сравняваните параметри (с колко променливи се работи) – два или повече.

3.4.7. Метод χ^2 (хи-квадрат)

Методът χ^2 се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни, произлизащи от някой естествен закон или с предварително приета хипотеза. Статистическият критерий χ^2 за всяка конкретна проверка има една емпирична (χ^2_{EM}) и една теоретична (χ^2_T) стойност. Въз основа на съотношението между тях се приема или отхвърля H_0. Сравнението се извършва между разпределените в матричен вид по колони и редове изследвани индивиди или обекти, според принадлежността им към една от разглежданите групи и наличието или отсъствието на разглежданите фактори/състояния. Клетките на матрицата са основата на изчислението на χ^2.

Определяне на теоретичната стойност на критерия χ^2 (χ^2_T)

Теоретичната стойност се определя чрез готови таблици (или с компютърни програми), като се има предвид нивото на значимост (α) и броя на степените на свобода (degrees of freedom, df). Стойностите на χ2 зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били възприети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по формулата:

$$df = (n-1)$$

където n е броят на сравняваните класове. При разглеждане на матрица с определен брой редове и колони броят на степените на свобода се изчислява по следната формула:

$$\mathbf{df} = (r-1)(c-1)$$

където:
r – брой на редовете в таблицата (най-често r = 2);
c – брой на колоните в таблицата (най-често c = 2).

След това е необходимо да се изчисли теоретично очакваният брой на индивидите във всяка отделна клетка (E, от англ. Expected). Това става с помощта на формулата:

$$\mathbf{E}_{cell} = \frac{RxC}{N}$$

$\mathbf{E}_{cell}$ – теоретично очакван брой на индивидите в дадена клетка;
R – общ брой на индивидите в реда, в които се намира клетката;
C – общ брой на индивидите в колоната, в която се намира клетката;
N – общ брой на изследваните индивиди.

Изчисляване на емпиричната стойност на χ2

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{\left(|O_i - E_i| - 0.5\right)^2}{E_i}$$

където n: брой сравнявани класове (клетки в матрицата)
O_i : опитни (наблюдавани) стойности на клас i
E_i : очаквани стойности на клас i

Изваждането на 0.5 от абсолютната разлика между наблюдавания и очаквания брой обекти се нарича корекция на Йейтс (Yates) и се прилага, когато наблюдаваният брой обекти в някой от класовете (клетките) е по-малък от 10.

При оценяването на верността на нулевата хипотеза по метода χ2, съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на χ2 и стойностите на вероятността P, при различни степени на свобода и нива на значимост. Когато емпиричната стойност на χ^2 е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост (α) и степени на свобода (df), нулевата хипотеза се отхвърля като невярна.

Решението за приемане или отхвърляне на H_0 може да се вземе и въз основа съотношението между теоретичното предварително възприето ниво на значимост ($\alpha_т = 0.05$) и оценено (по емпиричните данни) ниво на значимост $\alpha_{ем}$. Всъщност $\alpha_{ем}$ е вероятността за появяването на χ^2_{EM} и може да се означи с p.

При $\chi^2_{EM} > \chi^2_T$ (или респ. $p < \alpha_т$). H_0 се отхвърля в полза на H_1. Приема се, например, че между наличието на определен алел/генотип и развитието на РГ съществува зависимост (асоциация).

При $\chi^2_{EM} < \chi^2_T$ (или респ. $p > \alpha_т$). H_0 не може да се отхвърли. Това не означава, че тя е вярната хипотеза, просто няма доказателства за обратното. В този случай интерпретацията е двузначна: или действително H_0 е вярна и поради това не се отхвърля или H_1 е вярната хипотеза, но това не може да се потвърди с конкретното проучване (например поради недостатъчния брой на наблюдаваните случаи).

Методът $\chi 2$ се прилага. Когато са спазени следните условия:

- обемът на извадката надвишава 50 индивида;
- експериментално установеният брой на индивидите във всяка клетка е не по–малък от 5.

3.4.8. Тест на Фишер (Fisher's test)

Тестът на Фишер принадлежи към групата на непараметричните статистически методи и се прилага при анализ на категорийни данни (които имат точно определен обикновено малък брой стойности). Тестът на Фишер е изключително подходящ в случайте, когато използваната извадка е с малък размер, т.е. когато е възможно очакваната честота да е под 10 при една от степените на свобода. Нарича се още точен, тъй като дава възможност значимостта на отклонението от нулевата хипотеза да се изчисли точно, а не на базата на приближения спрямо теоретична извадка, както е при метода χ^2. При използване на точния тест на Фишер може да се установи статистически значима разлика между две категорийни променливи, когато анализираните обекти се класифицират по два различни показателя.

Когато ограниченията за приложението на метода $\chi 2$ не могат да бъдат удовлетворени, вместо него може да се използва критерият на Фишер. Критерият се изчислява по следната формула:

$$P = \frac{(a+b)!\ (c+d)!\ (a+c)!\ (b+d)!}{N!\ a!\ b!\ c!\ d!}$$

P – емпирична стойност на критерия на Фишер;
a, **b**, **c**, **d** – експериментално установен брой на индивидите в клетките на таблицата;
N – общ брой на изследваните индивиди.

При $P < \alpha$ H_0 се отхвърля в полза на H_1, а при $P > \alpha$ H_0 не може да бъде отхвърлена.

3.4.9. Изчисляване на OR (ODDS RATIO, съотношение на шансовете)

За оценяване размера на ефекта (effect size, сила на връзката между две променливи при статистически анализ) е анализирано съотношението на шансовете (Odds Ratio, OR). OR е относителна мярка за риска или вероятността дадено събитие да се случи сред дадена група обекти, когато е налице даден фактор, в сравнение с група обекти, при които факторът липсва. Оценка на 95% доверителен интервал (95%CI) и съотношението на шансовете е направена на базата на заключенията за рисков алел за всеки полиморфизъм поотделно [222].

Шансът (odds) се изчислява чрез разделяне на броя на пациентите, които носят конкретния алел/генотип на броя на пациентите, които не носят конкретния алел/генотип. Същото изчисление са прави за групата на контролите. OR се изчислява чрез разделяне на шанса при пациентите на шанса при контролите, като общо формулата може да се запише по следния начин:

$$OR = \frac{b\ c}{a\ d}$$

OR – Odds ratio;
a – брой пациенти, които не носят конкретния алел/генотип;
b – брой пациенти, които носят конкретния алел/генотип;
c – брой контроли, които не носят конкретния алел/генотип;
d – брой контроли, които носят конкретния алел/генотип

При OR = 1 вероятността за развитие на заболяването е еднаква за двете групи (пациенти и контроли). В този случай проучваният фактор не оказва влияние върху развитието на зъболяването.

При OR > 1 вероятността за развитие на заболяването е по-висока за групата на пациентите в сравнение с контролите. В този случай проучваният фактор е рисков за съответното заболяване.

При OR < 1 вероятността за развитие на заболяването е по-висока за групата на контролите в сравнение с болните индивиди. В този случай проучваният фактор оказва протективно (защитно) действие по отношение на заболяването.

3.4.10. Корекция при многократни тестове

Корекцията при многократни тестове (correction for multiple testing) е процедура, с помощта на която се коригира стойността на величината P (P – value), получена при провеждане на голям брой аналогични статистически тествания. Прилагането на тази процедура има за цел да намали вероятността от възникване на грешка от тип I (α грешка, получаване на фалшиво позитивен резултат), изразяваща се в погрешно отхвърляне на нулевата хипотеза.

Една от най–често прилаганите процедури за множествена корекция, но и много консервативна е корекцията на Бонферони (Bonferroni correction). Съгласно тази корекция при проведени n на брой независими изследвания корекцията на нивото на значимост избрано за експеримента (α) се изчислява като всяко отделно изследване се разгледа при ниво на значимост равно на 1/nта от нивото което трябва да се приеме при едно проведено изследване и се изразява по следния начин:

$$\alpha \text{ total} = \alpha / n.$$

Където α е нивото на значимост в едно изследване, прието обикновено за 0.05, а n е броят на проведените изследвания. Така получената стойност представлява коригираното ниво на значимост съгласно броя направени изследвания, като всички тестове, при които P продължава да има стойност по–ниска от получената се интерпретират като данни за наличие на истинска асоциация между даден вариант и заболяването.

Въпреки че прилагането на корекцията на Бонферони намалява риска за грешка от тип I, поради своята консервативност тя увеличава риска за възникване на грешка от тип II (β грешка, получаване на фалшиво отрицателен резултат) в резултат на нарастване на вероятността за отхвърляне на истински асоциации. В настоящата дисертация корекцията на Бонферони е приложена при асоциативното изследване на кандидат гените.

3.4.11. Тестове за променливи с множество измервания. Тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney)

U-тестът на Ман-Уитни (който понякога се отбелязва и като W-тест на Ман-Уитни) има същата цел и познавателно значение, както и независимият t-тест (тест на Стюдънт) за независими извадки, но използва други статистически съображения. Първата основна характеристика на U-теста е, че неговото провеждане не предявява изисквания към вида на разпределението на изследваната променлива. Такива тестове се наричат непараметрични. Влагайки известни несъществени за практиката елементи на неточност, може да се каже, че U-тестът на Ман-Уитни използва медианата вместо средното като цел и средство за извършване на сравнението. Медианата Me представлява другата следваща по важност мярка за централна тенденция на числови променливи след средното μ. Отклоненията във формата на разпределение на дадена метрична променлива се получават най-вече като следствие от малкия обем на извадката, например по-малък от 30. Затова използването на непараметрични тестове се препоръчва именно в случаи на извадки с малки обеми. Втората важна характеристика на U-теста се състои в това, че обработката на резултатите от извадките не се извършва директно върху отчетените стойности на променливата, а върху техните поредни номера – рангове.

Подреждането става като най-малката стойност получава ранг 1, следващата по големина получава ранг 2 и т.н., докато се изчерпят наблюденията.

Нека за променливата X разполагаме с извадка с обем m, а за променливата Y разполагаме с извадка с обем n. Като обединим двете извадки получаваме една обединена извадка с обем m+n, за която пресмятаме поредния номер на всяко наблюдение. Ако с Wx означим сумата от ранговете на стойностите от извадката за променливата X, то нулевата хипотезата гласи, че двете извадки произхождат от еднакво разпределени непрекъснати променливи, т.е. няма статистически значима разлика между Wx и Wy.

3.4.12. Корелационни анализи

Корелационният анализ е метод за обработка на данни, използван за изучаване на зависимостта (корелацията) между променливи. При анализа се сравняват коефициентите на корелация между една или повече двойки променливи, за да се установят статистически взаимозависимости между тях. Когато върху дадено явление влияят много фактори, а се изследва само един от тях, получената зависимост може да е непълна. Силата (степента) на корелационните зависимости се измерва с помощта на коефициенти на корелация. Стойността им се движи в границите от -1 до +1. В зависимост от измерителната скала, в която са изразени променливите, се ползват различни коефициенти на корелация.

3.4.12.1. Корелационен коефициент на Пиърсън (Pearson)

Най-широко използваният индекс за линейна зависимост е коефициентът на корелация на Пиърсън, индекс отразяващ степента, в която стойностите две променливи са линейно свързани (и потенциално зависими) една от друга. Прилага се, когато и двете променливи са количествени, а зависимостта им е близка до линейната по форма. Изчислява се по следната формула:

$$r = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{X_i - \bar{X}}{s_X}\right)\left(\frac{Y_i - \bar{Y}}{s_Y}\right),$$

където X и Y са променливите, X_i е i-тата стойност на X, $\bar{\mathbf{x}}$ е средната стойност на X, n е броя на измерванията, и s_x е стандартното отклонение на стойностите на променливата X.

Стандартният символ, с който се бележи коефициентът на корелация е r. Коефициентът може да заема стойности от -1 до +1. Когато r = 0 няма линейна връзка между променливите, т.е няма никаква корелация. Когато r = 1 или r = -1 има пълна линейна корелация между стойностите на двете променливи. Това означава, че диаграмата на двойките стойности (X_i, Y_i) в тези случаи ще бъде идеална права линия с положителен (или съответно отрицателен) наклон, а ъгълът на наклона ще показва количествената връзка между двете променливи. Знакът пред r показва посоката на зависимостта между двете променливи. Когато r е с положителен знак има права зависимост между двете променливи: при нарастване на X, нараства и Y. Когато знакът е отрицателен, има обратна зависимост – с нарастване на X, Y намалява. Интерпретацията на r не може да бъде еднаква за резултати от рода на 0,3 и 0,7. Корелационната скала е ординална, а не интервална. Има два начина за тълкуване на коефициента. Единият използва директно получената стойност:

0 < |r| < 0,3 – слаба корелация
0,3 <= |r| < 0,5 – умерена корелация
0,5 <= |r| < 0,7 – значителна корелация
0,7 <= |r| < 0,9 – висока корелация
0,9 <= |r| <= 1,0 – много висока корелация

Вторият начин за тълкуване е чрез така нареченият коефициент на детерминация, r^2. Стойността му се получава при повдигане на втора степен на коефициента r и отразява качеството на предиктивния модел, който бихме могли да построим върху данните, тоест колко точно можем да предскажем стойността на едната променлива по стойността на другата при съществуващата корелация между тях. При линейната регресия този коефициент (отбелязван с R^2) отразява каква част от варирането в данните се отразява от модела.

3.4.12.2. Корелационен коефициент на Спиърман (Spearmann's rho)

Коефициентът на рангова корелация на Спиърман е подвид на коефициента на Пиърсън, но използва рангови данни или ординарни данни преобразувани в рангови. Използва се когато има нужда от непараметричен метод за определяне на корелацията (и следователно коефициентът на Пиърсън не може да бъде използван) – когато зависимостта не е линейна например. Първоначалните данни се подреждат по големина и се заменят с ранговете си и разликите между ранговете при всяко от наблюденията на двете променливи се пресмята. Изчислява се по следната формула:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Коефициентът на Спиърман се означава с гръцката буква ρ („ро“, от там и наименованието „Spearman's rho“) или r_s.

Този метод се използва когато не е възможно получаването на действителни стойности на променливите, но е известен техният ред. Освен това този коефициент може да бъде по-добър показател, че съществува връзка между две променливи, когато връзката е нелинейна, за разлика от коефициента на Пиърсън. Прилагането му е по-подходящо и когато допускането, че двете променливи имат нормално разпределение на данните, не се потвърди.

3.4.13. Еднокомпонентен и многокомпонентен регресионен анализ

Регресионният анализ е метод за изследване на връзката между зависими и независими променливи величини. Този тип анализ изследва явленията, които са представени на силни скали – относителна и интервална скала. Регресията е комбинация между няколко линейно независими базисни функции от обясняващи променливи (фактори) (x) с неизвестни коефициенти Следствието (Y) или обяснимата променлива е случайна величина с еднакви дисперсии при всяка различна стойност на променливата x, с нормално разпределение и независещи помежду си остатъци. Регресионният анализ се използва при анализа на връзки от корелационен тип.

Видовете регресионен анализ, според броя на включените в анализа фактори са единичен и множествен. При единичните модели се изследва връзката само между две явления Y и X, с общ модел Y=f(X, e).

Чрез множествената регресия регресия се изследва връзката между едно явление, което най-често е следствие (Y), и две или повече явления, които играят ролята на причини или фактори (X_1 … Xn). Общия вид на модела е $Y=f(X_1,X_2 \dots X_n, e)$, където «е» е случаен компонент в модела. Приема се, че факторите (x) са предварително определени с известни стойности, макар че в икономическата област променливите X могат да имат поведение на случайни променливи. При изследване на многофакторните връзки са необходими адекватни модели, които да представят точно изследваните зависимости. Моделът се представя с подходящо регресионно уравнение. Оценката на параметрите на множествения регресионен модел се получават чрез осредняване:

$E(Y) = f(X_1, X_2, X_3,\dots, X_n)$,

където E(Y) е математическото очакване на следствието. Случайния компонент (e) липсва, защото при използване на метода на най-малките квадрати случайния компонент се приема за равен на 0.

Според модела връзките се представят като линейни и нелинейни, структурни и други. Крайният модел има вида:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + e$$

Където β_i е коефициентът (теглото) на променливата X_i, а β_0 е константа.

При изследването чрез множествената регресия се търсят отговорите на три въпроса. Първият е дали съществува връзка между обясняващите променливи (X) и следствието (Y), дали връзката е закономерна и дали е случайна. Проверката на хипотези се осъществява както при единична регресия, но е технически усложнена заради обема на данните.

Вторият въпрос е свързан с осигуряване на адекватен модел на връзката между Y и променливите в анализа. Трябва да се осигури адекватно регресионно уравнение чрез трите основни подхода: дедуктивен, индуктивен и редуктивен.

При третия въпрос се извършва измерване на конкретните количествени отношения, които се проявяват при функциониране на регресионната връзка. Извършва се оценка на ефектите на даден фактор (фактори) върху следствието, както поотделно, така и едновременно. Измерването на ефектите от факторните въздействия става с оценка на параметрите.

Оценката на параметрите при множествената линейна регресия става чрез използване на метода на най-малките квадрати. Съставя се система от уравнения, като броят на уравненията е равен на броя на параметрите. Формулите са в матрична форма за по-голямо удобство. Общото уравнение е от вида:

$$Y = \beta X + e ,$$

където:

Y – вектор с данните за явлението следствие;

X – матрица с факторните променливи.

Дефинираме и функцията $\sum(Y-\hat{Y})^2 = \min$. Тя ще се минимизира според оценките на параметрите.

Оценката на параметрите става с матричното уравнение: $B = (X`X)^{-1}.(X`Y)$.

Следващия момент е осигуряването на информация, чрез изчерпателни изследвания, представителни или непредставителни извадки. При данни от непредставителна извадка се правят само точкови оценки на параметрите. При представителни извадкови изследвания се оценява стохастичната точност и се проверяват различни хипотези.

Тълкуването на параметрите в множествената линейна регресия е следното: коефициентът β_1 измерва средното влияние на X_1 върху Y при условие, че останалите фактори в модела са с фиксирани стойности. Коефициентите на многофакторния регресионен модел се тълкуват като частни или нетни коефициенти на регресията.

3.4.14. Графично представяне на данните чрез хистограми

В областта на статистиката хистограмата е форма на графично представяне на данните. Данните от хистограмата са изобразени като стълбчета и показват данните за популацията според относителното разпределение. Площта на всяко стълбче представлява съответната относителна честота. Хоризонталната ос (ординатата) представя диапазона на стойностите на представяния фактор.

3.4.15. Сравнение на средните стойности

Методите за сравнение на средните стойности се използват за тестване на хипотезата, че две или повече групи измервания идват от едно и също разпределение. Такива методи са Т-тест и ANOVA (дисперсионен анализ).

3.4.15. 1. Student's T тест анализ

Сравнението на средните стойности на две групи се извършва с помощта на Т-тест. Т-тест за една извадка (One-Sample T-test) се използва за сравнение на средната стойност на тестван признак в извадката със зададена стандартна величина. Т-тест за независими извадки (Independent Samples T-test) се използва за сравняване на средните стойности на тествания признак в две групи. Т-тест за двойки извадки (Paired-Samples T-test) се използва за сравняване на средните стойности на две групи, в които стойностите са свързани две по две, например когато имаме две последователни измервания за всеки обект в тестовата група. Т-тест може да се проведе за определяне на влиянието на една (независима) променлива върху друга (зависима) променлива. По типа на скала за измерване зависимата променлива трябва да бъде непрекъсната, а независимата дихотомна (може и да е непрекъсната променлива, като се извършва разделяне на наблюденията в две групи с посочване на гранична стойност). Дихотомната променлива може да приема само две стойности. Следователно, използвайки тази променлива, можем да разделим всички анализирани данни на две групи, които да сравним с Т-тест.

Т-тест е всеки статистически тест на хипотеза, в който тестовата статистиката (test statistic) следва t-разпределението на Student, когато нулевата хипотеза е вярната. Прилага се при нормално разпределение на данните.

t- разпределението представлява всяка от семейство вероятностни разпределения, при които броят на степените на свобода (броя на независимите наблюдения за всеки обект минус едно) определят конкретното разпределение. С нарастването на размера на изследваната извадка (и по този начин степените на свобода) t-разпределението се приближава до стандартното нормално разпределение.

Първоначално се формулира нулева хипотеза, която обгкновено гласи, че няма разлика между наблюдаваните средни стойности на групите и всяко получено различие е случайно. Т-тестът може да бъде двустранен (two-sided, two-tailed), когато се тества хипотезата, че средните не са равни, или може да бъде едно-странен (one-sided), когато се определя изрично дали едната средна стойност е по-голяма или по-малка от другата. След това се изчислява тестовата статистика и се определя вероятността p да съществува по-голяма или по-малка (или и двете едновременно за двустранния тест) нейна стойност в конкретното разпределение. При стойности на $p < 0.05$ (или друга избрана граница на значимост α) нулевата хипотеза се отхвърля.

Повечето t-тестове използват статистика със следната форма: $t = Z/s$, където Z и s са функции на данните. Обикновено Z е избран така, че да е чувствителен към алтернативната хипотеза (стойността клони към по-високи стойности, ако алтернативната хипотеза е вярна), докато s е скаларен параметър, който позволява да се определи конкретното разпределение на t.

Пример за one-sample t-тест е:

$$t = \frac{Z}{(s/\sqrt{n})} = \frac{(\bar{X} - \mu)/(\sigma/\sqrt{n})}{(s/\sqrt{n})}$$

Където X-черта е средната стойност от пробите на извадка X и S е стандартното отклонение. Σ е популационното стандартно отклонение на данните.

Предположенията, които се правят при t-тестът са следните:

• X следва нормално разпределение със средна стойност μ и вариация

• S следва $\chi 2$ разпределение с p степени на свобода при нулева хипотеза, където p е положителна константа

- Z и s са независими

3.4.15. 2. Дисперсионен анализ (One-Way ANOVA)

За сравнение на средните стойности на три или повече групи се използва еднофакторен дисперсионен анализ (One-Way ANOVA).

Дисперсионният анализ (ANOVA – analysis of variance) представлява специфична форма на сравнителен анализ, при който статистиките за проверка на нулевата хипотеза се основават на пресмятане на дисперсии. Когато извадките са точно две, еднофакторният дисперсионен анализ се покрива напълно по смисъл с Т-теста на Стюдънт, затова неговото използване предполага наличие на поне три независими извадки. В типичния случай на прилагане на този анализ присъстват две ясно обособени променливи. Първата променлива, която се нарича още фактор (откъдето идва и наименованието на процедурата) трябва да бъде категорийна (с няколко конкретни и алтернативни стойности). Другата се нарича зависима променлива и трябва да има непрекъснати стойности. Факторът и зависимата променлива се наблюдават едновременно върху извадката, като цялата извадка може да се раздели на отделни подгрупи според категориите на фактора. Тези подгрупи могат да се интерпретират като независими извадки от нормални популации с едни и същи дисперсии, но евентуално с различни средни. Отделните групи се характеризират със собствени обеми.

Хипотезата за нулев ефект има вида

H_0: $\mu_1=\mu_2=\ldots\ldots\ldots=\mu_J$,

тоест всички популационни средни са равни. Алтернативната хипотеза H_1 гласи, че някои две от тези средни са различни, без да уточнява кои точно двойки средни са различни. Отхвърлянето на нулевата хипотеза H_0 в типичния случай се интерпретира като наличие на статистически значим ефект от страна на фактора върху зависимата променлива. Приемането на нулевата хипотеза се разглежда като липса на статистическа значимост на въпросния ефект.

4. РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Системен ход на проведения анализ

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.*

Както вече беше споменато, в дисертационния труд са включени изследвания върху групи лица с исхемична болест на сърцето, миокарден инфаркт, първична артериална хипертония и с повишен риск от тромбози (подложени на терапия с аценокумарол или клопидогрел). Всички пациенти отговарят напълно на включващите и изключващи критерии за участие в проведените генетични изследвания. Изолирането на ДНК беше извършено от венозна кръв чрез използването на три основни метода: солеви метод на Miller et al., 1988 [224], метод на фенол-хлороформна екстракция и чрез използване на полуавтоматизирана система за изолиране Chemagic magnetic separation module i (Chemagen).

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.*

ДНК-типизирането на полиморфните варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, VKORC1* и *APOE* беше извършено посредством PCR-базиран метод и последващо топене на двойноверижната структура на ДНК в резултат на повишаване на температурата през равни интервали от време (Високорезолютивно топене на ДНК, HRM).

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

Данните от генотипирането на полиморфните варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, VKORC1* и *APOE* бяха въведени в таблица на Excell и бяха определени алелните и генотипни честоти за всеки изследван полиморфизъм.

4. *Анализ на връзката между клинични фактори, носителството на подбрани полиморфни варианти и отговора към лекаствена терапия с аценокумарол при пациенти, подложени на антикоагулантна терапия.*

Беше извършен анализ на връзката между клиничните фактори като възраст, ИТМ, пол, комедиация и др., както и между носителството на полиморфни варианти в гените *CYP2C9, VKORC1* и *APOE* и оптималната дневна доза аценокумарол при пациенти, подложени на антикоагулантна терапия.

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 валидиране на създадения фармакогенетичен алгоритъм в независима група от пациенти с повишен риск от тромбози.*

За тази цел беше приложен метода на множествена линейна регресия, при който предписаната дневна доза аценокумарол беше използвана като зависима променлива, а съответните клинични и генетични детерминанти – като независими такива. В алгоритъма бяха включени само факторите с най-силно влияние по отношение на дневната доза медикамент. Създаденият модел е популационно – специфичен иии е подходящ за предсказване на оптималната доза медикамент при български пациенти с повишен риск от тромбози.

6. *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*

Беше извършен подбор 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* на базата на данни за асоциация със заболяванията ИБС, Т2ЗД и АХ, както и с отговора към лекарствена терапия с клопидогрел, при други популационни групи. Бяха подбрани и изследвани само полиморфизми, за които няма данни за връзката им с конкретните заболявания и терапевтичния отговор при българи.

7. *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.*

За тази цел бяха подбрани полиморфизми, за които съществуват данни за асоциацията им с риска за развитие на ИБС, МИ, АХ и Т2ЗД за други етностни групи. Въпросните варианти не са изследвани в контекста на фармакогенетичния отговор към лекарствена терапия с клопидогрел.

8. *Определяне на епистатичните взаимодействия (статистическа епистаза) между изследваните полиморфни варианти и анализ на връзката им с отговора към лекарствена терапия с клопидогрел.*

За тази цел беше приложен логистичен регресионен анализ, за определяне на основните алелни и генотипни взаимодействия по отношение на терапевтичния отговор към клопидогрел.

9. *Асоциативно изследване на панел от полиморфни варианти в групите пациенти с артериална хипертония и контролна група от здрави индивиди и определяне на тези, които показват статистически значима връзка със заболяването при българи.*

10. *Асоциативно изследване на панел от полиморфни варианти в групите пациенти с исхемична болест и миокарден инфаркт и контролна група от здрави индивиди и определяне на тези, които показват статистически значима връзка със заболяването при българи.*

11. *Анализ на епистатичните взаимодействия (статистическа епистаза) между изследваните полиморфни варианти и определяне на връзката им с риска за развитие на АХ, ИБС и ИМ при българи.*

За тази цел беше използван методът на множествена дименсионална редукция, основаващ се на логистичен регресионен анализ, за определяне на основните алелни и генотипни взаимодействия по отношение на риска за развитие на АХ, ИБС и ИМ при българи.

12. *Анализ на влиянието на изследваните полиморфни варианти върху стойностите на САН и ДАН и нивата на липиди и определяне на тези от тях, които показват статистически значима асоциация със стойностите на тези клинични показатели при българи.*

13. *Анализ на епистатичните взаимодействия (статистическа епистаза) между изследваните полиморфни варианти по отношение на стойностите на САН и ДАН и нивата на липиди в кръвта.*

За тази цел беше приложен множествен регресионен анализ за определяне на основните алелни и генотипни взаимодействия по отношение на стойностите на изследваните клинични показатели.

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

За определянето на основните LD блокови структури беше използван методът „confidence interval" от програмния продукт HaploView 4.0 (Broad Institute of MIT & Harvard).

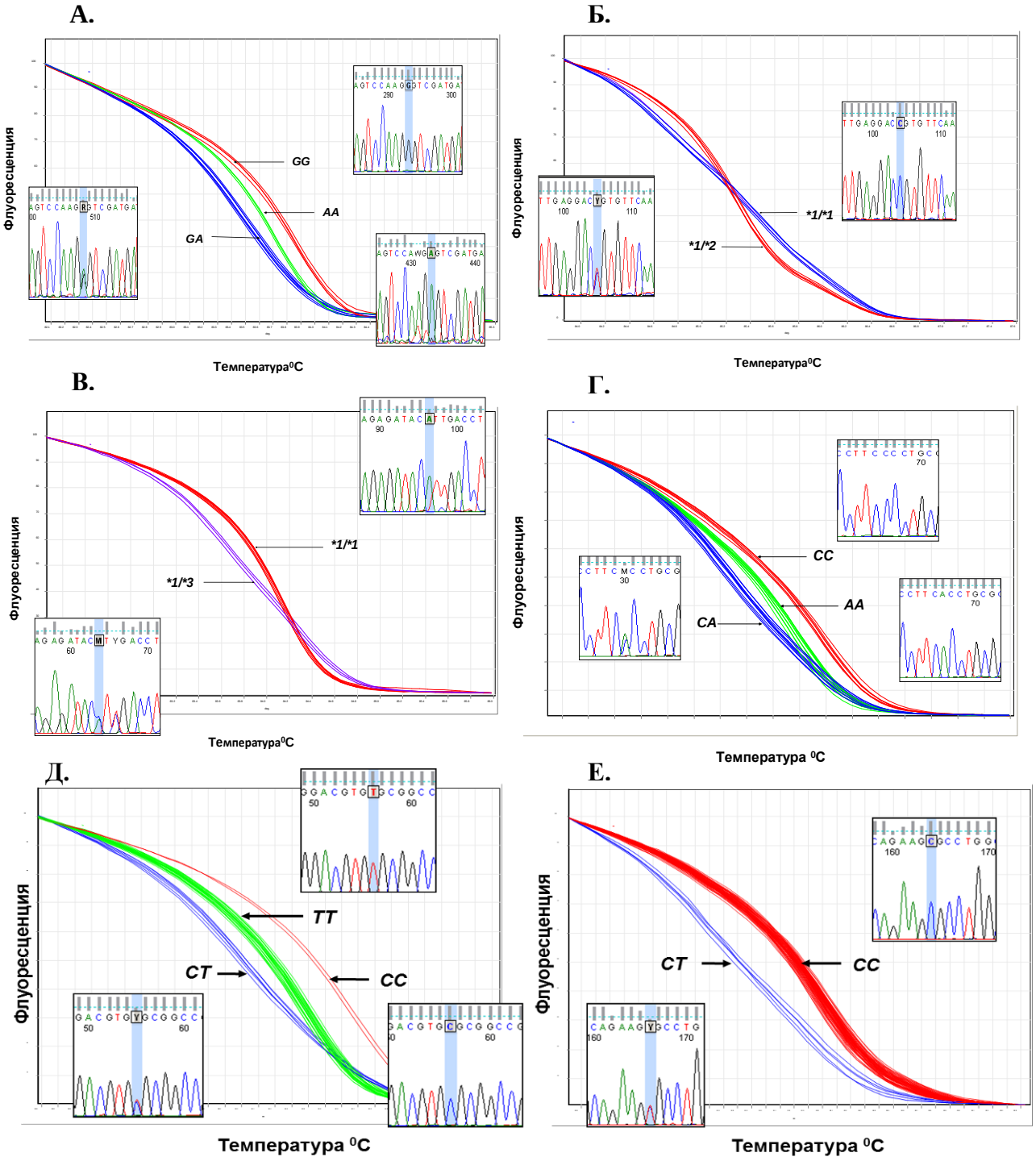
4.2. Оптимизиране и въвеждане на ДНК-методи за анализ на фармагогенетични полиморфни варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, VKORC1* и *APOE*

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 високорезолюционно 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 $MgCl_2$, 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 подбраните 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.)
CYP2C9*2	rs1799853	10:94942290	Екзон 3	C>T	Arg144Cys	миссенс	60	15:15:20
CYP2C9*3	rs1057910	10:94981296	Екзон 7	A>C	Iso359Leu	миссенс	60	15:15:20
CYP2C19*2	rs4244285	10:94781859	Екзон 5	G>A	Pro227Pro	синонимен	60	15:15:20
CYP2C19*17	rs12248560	10:96521657	5'UTR	C>T	-	-	58	15:15:20
CYP3A5*3	rs776746	7:99270539	Интрон 3	A>C	-	Сплайсинг дефект (акцептор но място)	62	15:15:20
VKORC1*2A	rs9923231	16:31096368	5'UTR/ промотор	G>A	-	-	60	15:15:20
VKORC1*2A	rs9934438	16:31093557	интрон 1	C>T	-	-	58	15:15:20
VKORC1*2B	rs2884737	16:31094233	интрон 1	A>C	-	-	65	15:15:20
VKORC1*3	rs7294	16:31091000	3'UTR	C>T	-	-	59	15:15:20
VKORC1*4	rs17708472	16:31105353	интрон 1	G>A	-	-	66	15:15:20
APOE	rs7412	19:44908822	Екзон 4	C>T	Arg176Cys	миссенс	65	15:15:20
APOE	rs429358	19:44908684	Екзон 4	T>C	Cys130Arg	миссенс	65	15:15:20



Фиг. 4.1. Нормализирани графики 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).*

Въведените методи за генетичен анализ на алелни варианти в гените ***CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, VKORC1*** и ***APOE***, имащи отношение към отговора на лекарствена терапия с клопидогрел и аценокумарол, са специфични и дават възпроизводими резултати. Високорезолютивното топене на ДНК представлява метод, въведен в лабораторната и диагностична практика през последните няколко години. Съществуват много научни публикации, които определят този метод като високочувствителен и специфичен, което обяснява широкото му приложение в областта на SNP генотипирането и мутационния анализ.

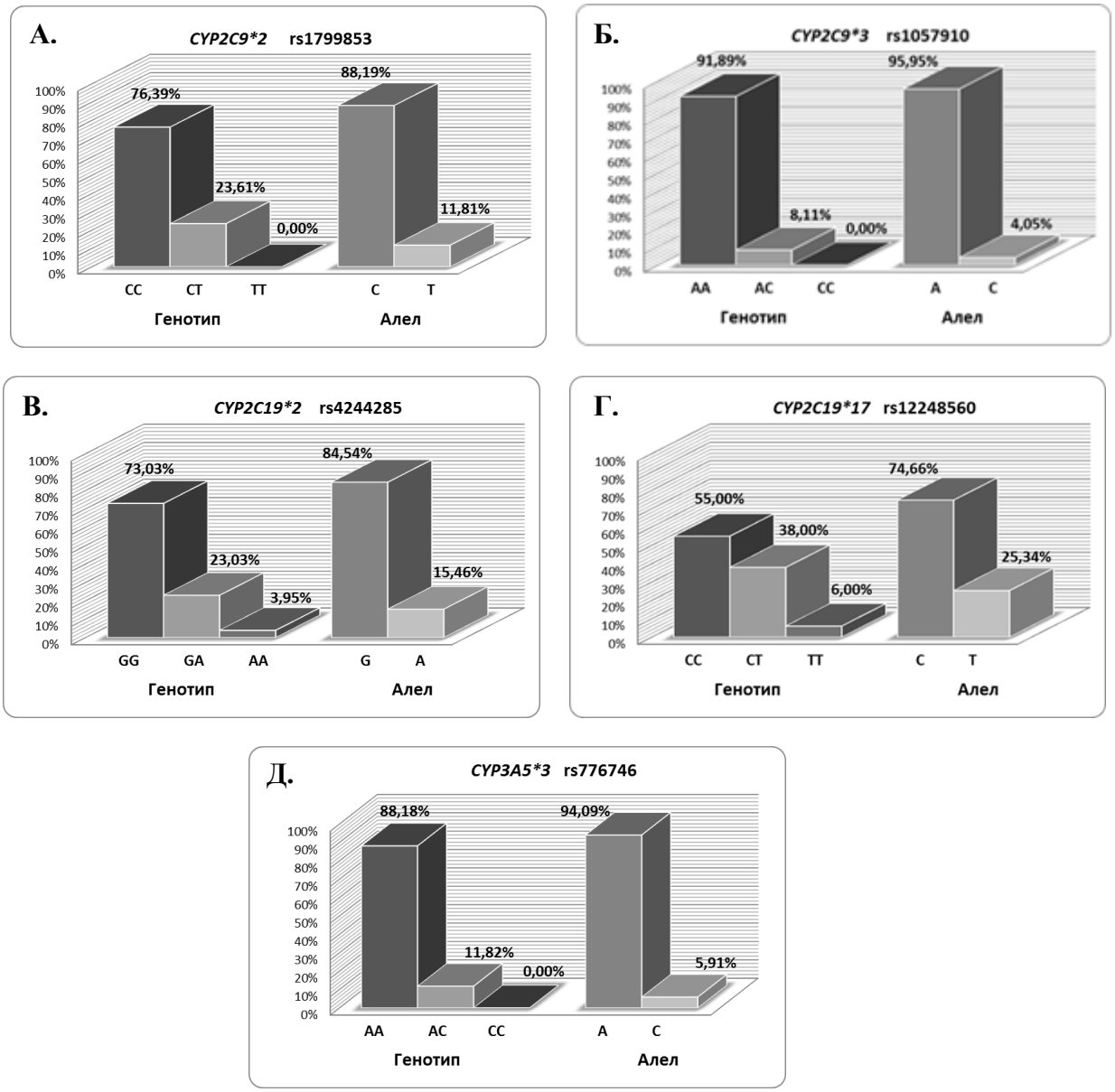
4.3. Разпределение на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, VKORC1* и *APOE* в българската популация

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 полиморфни варианти 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	***CYP2C9*2*** **rs1799853 g.8633C>T**		***CYP2C9*3*** **rs1057910 g.47639A>C**		***CYP2C19*2*** **rs4244285 g.24154G>A**		***CYP2C19*17*** **rs12248560 g.4195C>T**		***CYP3A5*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 (5.91)
HWE χ^2	**2.58**		**0.26**		**2.16**		**0.03**		**0.43**	

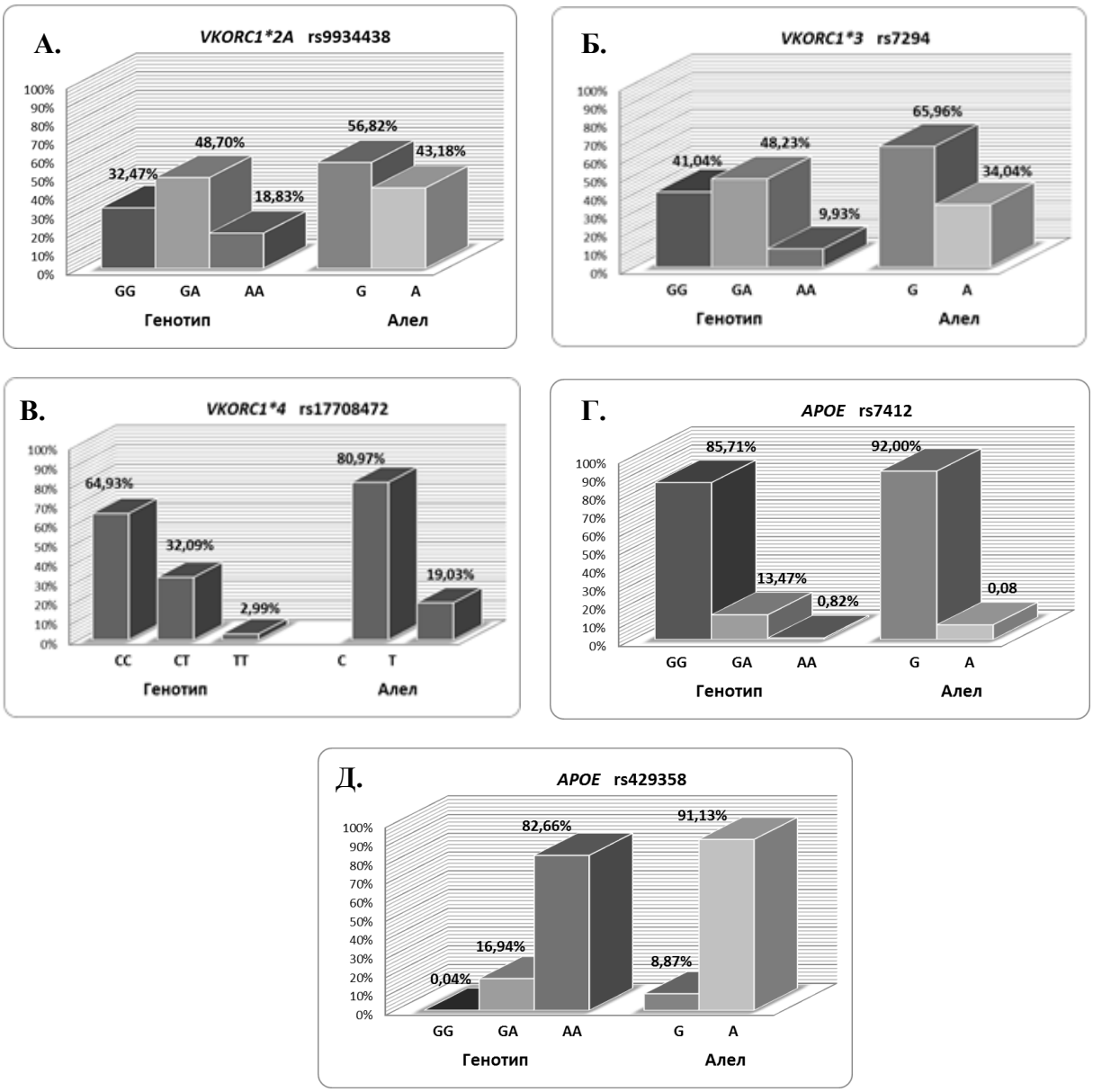
Графичното представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19* и *CYP3A5* в популационната група индивиди с български произход са визуализирани на **Фиг. 4.2.**



Фиг. 4.2. Графичното представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9, CYP2C19* и *CYP3A5* в популационната група индивиди с български произход.

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	***VKORC1*2A* rs9934438 g.6399C>T**		***VKORC1*2A* rs9923231 g.3588G>A**		***VKORC1*2B* rs2884737 g.5723T>G**		***VKORC1*3* rs7294 g.8956G>A**		***VKORC1*4* rs17708472 g..5924C>T**		***APOE* rs7412 g.7903T>C**		***APOE* 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 χ^2	**0.01**		**0.01**		**0.01**		**0.77**		**1.51**		**0.61**		**1.12**	



Фиг. 4.3. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в гените *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *CYP4F2*, *VKORC1* и *APOE* в популационна група индивиди с български произход.

В следващите няколко таблици са представени сравненията на алелните и генотипни честоти при българи с тези, наблюдавани при други популационни групи (**Табл. 4.4 – 4.14**). Данните за честотите са взети от базата данни Ensembl и са получени в резултат на работата през първата фаза на проекта „1000 genomes".

Легенда:

Популации:

AFR	African
AMR	Ad Mixed American
ASN	Asian
EUR	European

Субпопулации:

BG	Bulgarian
CHB	Han Chinese in Bejing, China
JPT	Japanese in Tokyo, Japan
CEU	Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European ancestry
TSI	Toscani in Italia
FIN	Finnish in Finland
GBR	British in England and Scotland
IBS	Iberian population in Spain
PUR	Puerto Ricans from Puerto Rico

Табл. 4.4. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *VKORC1*2A* (rs9934438) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=154**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
***VKORC1*2A* rs9934438**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
CC	50 (32.47)	217 (88.00)	56 (30.90)	0 (0.00)	31 (36.50)	0 (0.00)	138 (36.40)	43 (46.20)	32 (36.00)	4 (28.60)	0 (0.00)	16 (29.10)	28 (28.60)
CT	75 (48.70)	26 (11.00)	91 (50.30)	47 (16.00)	34 (40.00)	9 (9.30)	178 (47.00)	39 (41.90)	49 (55.10)	9 (64.30)	19 (21.30)	27 (49.10)	47 (48.00)
TT	29 (18.83)	3 (1.00)	34 (18.80)	239 (84.00)	20 (23.50)	88 (90.70)	63 (16.60)	11 (11.80)	8 (9.00)	1 (7.10)	70 (78.70)	12 (21.80)	23 (23.50)
C	175 (56.82)	460 (94.00)	203 (56.10)	47 (8.00)	96 (56.50)	9 (4.60)	454 (59.90)	125 (67.20)	113 (63.50)	17 (60.70)	19 (10.70)	59 (53.60)	103 (52.60)
T	133 (43.18)	32 (7.00)	159 (43.90)	525 (92.00)	74 (43.50)	185 (95.40)	304 (40.10)	61 (32.80)	65 (36.50)	11 (39.30)	159 (89.30)	51 (46.40)	93 (47.40)
P стойност	**-**	**<0,0001**	**0.88**	**<.0001**	**1**	**<.0001**	**0.39**	**0.02**	**0.15**	**0.84**	**<.0001**	**0.64**	**0.40**

Табл. 4.5. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *CYP3A5*3* (rs776746) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=110**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
***CYP3A5*3* rs776746**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
AA	97 (88.18)	7 (2.85)	113 (62.40)	146 (50.00)	77 (90.60)	47 (48.50)	339 (89.40)	84 (90.00)	78 (87.60)	12 (86.00)	47 (52.80)	35 (63.60)	88 (89.80)
AC	13 (11.82)	79 (32.11)	56 (30.90)	117 (40.00)	8 (9.40)	39 (40.20)	39 (10.30)	8 (9.00)	11 (12.40)	2 (14.00)	38 (42.70)	14 (25.50)	10 (10.20)
CC	0 (0.00)	160 (65.04)	12 (6.60)	23 (10.00)	0 (0.00)	11 (11.30)	1 (0.30)	1 (1.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (4.50)	6 (10.90)	0 (0.00)
A	207 (94.09)	93 (18.90)	282 (77.90)	409 (70.00)	162 (95.30)	133 (68.60)	717 (94.60)	176 (95.00)	167 (93.80)	26 (93.00)	132 (74.20)	84 (76.40)	186 (94.90)
G	13 (5.91)	399 (81.10)	80 (22.10)	163 (30.00)	8 (4.70)	61 (31.40)	41 (5.40)	10 (5.00)	11 (6.20)	2 (7.00)	46 (25.80)	26 (23.60)	10 (5.10)
P стойност	**-**	**<.0001**	**<.0001**	**<.0001**	**0.66**	**<.0001**	**0.87**	**0.83**	**0.86**	**1**	**<.0001**	**<.0001**	**0.83**

Табл. 4.6. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *VKORC1*2B* (rs2884737) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=140**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=79**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
VKORC1*2 B	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
GG	16 (11.43	3 (1.20)	12 (6.60)	0 (0.00)	9 (10.60	0 (0.00)	25 (6.60)	3 (3.20)	3 (3.40)	1 (7.10)	0 (0.00)	9 (16.40	9 (9.20)
GT	62 (44.29	4 (1.60)	54 (29.80	2 (0.70)	29 (34.10	2 (2.10)	141 (37.20	29 (31.20	34 (38.20	6 (42.90	0 (0.00)	21 (38.20	43 (43.90
TT	62 (44.29	239 (97.20)	115 (63.50	284 (99.30)	47 (55.30	95 (97.90)	213 (56.20	61 (65.60	52 (58.40	7 (50.00	89 (100.00	25 (45.50	46 (46.90
G	94 (33.57	10 (2.00)	78 (21.50	2 (0.30)	47 (27.60	2 (1.00)	191 (25.20	35 (18.80	40 (22.50	8 (28.60	0 (0.00)	39 (35.50	61 (31.10
T	186 (66.43	482 (98.00)	284 (78.50	570 (99.70)	123 (72.40	192 (99.00)	567 (74.80	151 (81.20	138 (77.50	20 (71.40	178 (100.00	71 (64.50	135 (68.90
P стойност	**-**	**<0.000 1**	**<0.001**	**<0.000 1**	**0.21**	**<0.000 1**	**0.007**	**<0.001**	**0.01**	**0.68**	**<0.0001**	**0.81**	**0.62**

Табл. 4.7. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *VKORC1*3* (rs7294) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=141**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
VKORC1*3 **rs7294**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
GG	59 (41.04)	67 (27.20)	77 (42.50)	239 (83.60)	40 (47.10)	88 (90.70)	153 (40.40)	35 (37.60)	32 (36.00)	3 (21.40)	70 (78.70)	28 (50.90)	43 (43.90)
GA	68 (48.23)	122 (49.60)	81 (44.80)	47 (16.40)	38 (44.70)	9 (9.30)	183 (48.30)	40 (43.00)	48 (53.90)	10 (71.40)	19 (21.30)	19 (34.50)	47 (48.00)
AA	14 (9.93)	57 (23.20)	23 (12.70)	0 (0.00)	7 (8.20)	0 (0.00)	43 (11.30)	18 (19.40)	9 (10.10)	1 (7.10)	0 (0.00)	8 (14.50)	8 (8.20)
G	186 (65.96)	256 (52.00)	235 (64.90)	525 (91.80)	118 (69.40)	185 (95.40)	489 (64.50)	110 (59.10)	112 (62.90)	16 (57.10)	159 (89.30)	75 (68.20)	133 (67.90)
A	96 (34.04)	236 (48.00)	127 (35.10)	47 (8.20)	52 (30.60)	9 4.60()	269 (35.50)	76 (40.90)	66 (37.10)	12 (42.90)	19 (10.70)	35 (31.80)	63 (32.10)
P стойност	**-**	**<0.001**	**0.51**	**<0.0001**	**0.47**	**<0.0001**	**0.66**	**0.14**	**0.55**	**0.41**	**<0.0001**	**0.72**	**0.69**

Табл. 4.8. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *VKORC1*4* (rs**17708472**) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=134**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
VKORC1*4 **rs17708472**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
CC	87 (64.93)	221 (89.80)	126 (69.60)	286 (100.00	45 (52.90)	97 (100.00	227 (59.90)	53 (57.00)	51 (57.30)	11 (78.60)	89 (100.00	39 (70.90)	67 (68.40)
CT	43 (32.09)	25 (10.20	52 (28.70)	0 (0.00)	37 (43.50)	0 (0.00)	129 (34.00)	31 (33.30)	31 (34.80)	3 (21.40)	0 (0.00)	15 (27.30)	27 (27.60)
TT	4 (2.99)	0 (0.00)	3 (1.70)	0 (0.00)	3 (3.50)	0 (0.00)	23 (6.10)	9 (9.70)	7 (7.90)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.80)	4 (4.10)
C	217 (80.97)	467 (94.90)	304 (84.00)	0 (0.00)	127 (74.70)	0 (0.00)	583 (76.90)	137 (73.70)	133 (74.70)	25 (89.30)	0 (0.00)	93 (84.50)	161 (82.10)
T	51 (19.03)	25 (5.10)	58 (16.00)	572 (100.00	43 (25.30)	194 (100.00	175 (23.10)	49 (26.30)	45 (25.30)	3 (10.70)	178 (100.00	17 (15.50)	35 (17.90)
P стойност	**-**	**<0.000 1**	**0.34**	**<0.000 1**	**0.12**	**<0.000 1**	**0.20**	**0.07**	**0.13**	**0.32**	**<0.000 1**	**0.46**	**0.81**

Табл. 4.9. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант rs7412 в гена *APOE* в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=490**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=94**	**n=89**	**n=14**	**n=90**	**n=55**	**n=98**
APOE rs7412 g.7903T>C	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
CC	420 (85.71)	201 (81.70)	159 (87.80)	243 (85.00)	74 (87.10)	78 (80.40)	330 (87.10)	78 (83.90)	76 (85.40)	13 (92.90)	81 (91.00)	49 (89.10)	89 (90.80)
CT	66 (13.47)	44 ()17.90	21 (11.60)	43 (15.00)	11 (12.90)	19 (19.60)	48 (12.70)	15 (16.10)	12 (13.50)	1 (7.10)	8 (9.00)	6 (10.90)	9 (9.20)
TT	4 (0.82)	1 (0.40)	1 (0.60)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.30)	0 (0.00)	1 (1.10)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
C	906 (92.00)	446 (90.70)	339 (93.60)	529 (92.50)	159 (93.50)	175 (90.20)	708 (93.40)	171 (91.90)	164 (92.10)	27 (96.40)	170 (95.50)	104 (94.50)	187 (95.40)
T	74 (8.00)	46 (9.30)	23 (6.40)	43 (7.50)	11 (6.50)	19 (9.80)	50 (6.60)	15 (8.10)	14 (7.90)	1 (3.60)	8 (95.50)	6 (5.50)	9 (4.60)
P стойност	**-**	**0.28**	**0.53**	**0.92**	**0.74**	**0.36**	**0.50**	**0.92**	**1**	**0.15**	**0.19**	**0.54**	**0.19**

Табл. 4.10. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант rs429358 в гена *APOE* в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=496**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
***APOE* rs429358 g.7903C>T**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
CC	2 (0.04)	16 (6.50)	1 (0.60)	2 (0.70)	1 (1.20)	19 (0.00)	6 (1.60)	3 (3.20)	2 (2.20)	5 (0.00)	2 (2.20)	11 (0.00)	17 (0.00)
CT	84 (16.94)	96 (39.00)	38 (21.00)	46 (16.10)	25 (29.40)	78 (19.60)	96 (25.30)	27 (29.00)	22 (24.70)	9 (35.70)	11 (12.40)	44 (20.00)	81 (17.30)
TT	410 (82.66)	134 (54.50)	142 (78.50)	238 (83.20)	59 (69.40)	0 (80.40)	277 (73.10)	63 (67.70)	65 (73.00)	0 (64.30)	76 (85.40)	0 (80.00)	0 (82.70)
C	88 (8.87)	128 (26.00)	40 (11.00)	50 (8.70)	27 (15.90)	19 (9.80)	108 (14.20)	33 (17.70)	26 (14.60)	5 (17.90)	15 (8.40)	11 (10.00)	17 (8.70)
T	904 (91.13)	364 (74.00)	322 (89.00)	522 (91.30)	143 (84.10)	175 (90.20)	650 (85.80)	153 (82.30)	152 (85.40)	23 (82.10)	163 (91.60)	99 (90.00)	179 (91.30)
P стойност	**-**	**<0.0001**	**0.27**	**1**	**0.007**	**0.79**	**0.0005**	**0.0004**	**0.03**	**0.002**	**1**	**0.82**	**1**

Табл. 4.11. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *CYP2C9*2* (rs1799853) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=144**	**n=246**	**n=281**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
***CYP2C9*2* rs1799853 g.8633C>T**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
CC	110 (76.39)	237 (96.30)	137 (75.70)	284 (99.30)	65 (76.50)	97 (100.0)	294 (77.60)	76 (81.70)	74 (83.10)	10 (71.4)	89 (100.0)	37 (67.30)	69 (70.40)
CT	34 (23.61)	9 (3.70)	43 (23.80)	2 (0.60)	16 (18.18)	0 (0.00)	77 (20.30)	17 (18.30)	14 (15.70)	4 (28.60)	0 (0.00)	17 (30.90)	26 (26.50)
TT	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.60)	0 (0.00)	4 (4.70)	0 (0.00)	8 (2.10)	0 (0.00)	1 (1.10)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.80)	3 (3.10)
C	254 (88.19)	483 (98.20)	317 (87.60)	570 (99.70)	146 (85.90)	194 (100.0)	665 (87.70)	169 (90.90)	162 (91.00)	24 (85.70)	178 (100.0)	91 (82.70)	164 (83.70)
T	34 (11.81)	9 (1.80)	45 (12.40)	2 (0.30)	24 (14.10)	0 (0.00)	93 (12.30)	17 (9.10)	16 (9.00)	4 (14.30)	0 (0.00)	19 (17.30)	32 (16.30)
P стойност	**-**	**<.0001**	**0.81**	**<.0001**	**0.56**	**<.001**	**0.92**	**0.45**	**0.36**	**0.76**	**<.0001**	**0.19**	**0.18**

Табл. 4.12. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *CYP2C9*3* (rs1057910) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	**n=148**	**n=246**	**n=181**	**n=286**	**n=85**	**n=97**	**n=379**	**n=93**	**n=89**	**n=14**	**n=89**	**n=55**	**n=98**
***CYP2C9*3* rs1057910**	**BG**	**AFR**	**AMR**	**ASN**	**CEU**	**CHB**	**EUR**	**FIN**	**GBR**	**IBS**	**JPT**	**PUR**	**TSI**
AA	136 (91.89)	243 (98.80)	160 (88.40)	264 (92.30)	76 (89.40)	89 (91.80)	333 (87.90)	82 (88.20)	79 (88.80)	11 (78.60)	85 (95.50)	51 (92.70)	85 (86.70)
AC	12 (8.11)	3 (1.20)	21 (11.60)	21 (7.30)	9 (10.60)	8 (8.20)	46 (12.10)	11 (11.80)	10 (11.20)	3 (21.40)	4 (4.50)	4 (7.30)	13 (13.30)
CC	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
A	284 (95.95)	489 (99.40)	341 (94.20)	549 (96.00)	161 (94.70)	186 (95.90)	712 (93.90)	175 (94.10)	168 (94.40)	25 (89.30)	174 (97.80)	106 (96.40)	183 (93.40)
C	12 (4.05)	3 (0.60)	21 (5.80)	23 (4.00)	9 (5.30)	8 (4.10)	46 (6.10)	11 (5.90)	10 (5.60)	3 (10.70)	4 (2.20)	4 (3.60)	13 (6.60)
P стойност	**-**	**0.002**	**0.37**	**1**	**0.64**	**1**	**0.25**	**0.38**	**0.50**	**0.13**	**0.31**	**1**	**0.21**

Табл. 4.13. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *CYP2C19*2* (rs4244285) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

Общо	n=152	n=246	n=181	n=386	n=85	n=97	n=379	n=93	n=89	n=14	n=89	n=55	n=98
*CYP2C19*2* rs4244285 g.24154G>A	BG	AFR	AMR	ASN	CEU	CHB	EUR	FIN	GBR	IBS	JPT	PUR	TSI
GG	111 (73.03)	170 (69.10)	135 (74.60)	114 (39.90)	64 (75.30)	39 (40.20)	273 (72.00)	54 (58.10)	62 (69.70)	12 (85.70)	40 (44.90)	42 (76.40)	81 (82.70)
GA	35 (23.03)	69 (28.00)	44 (24.30)	153 (53.50)	19 (22.40)	54 (55.70)	100 (26.40)	37 (39.80)	26 (29.20)	2 (14.30)	41 (46.10)	12 (21.80)	16 (16.30)
AA	6 (3.95)	7 (2.80)	2 (1.10)	19 (6.60)	2 (2.40)	4 (4.10)	6 (1.60)	2 (2.20)	1 (1.10)	0 (0.00)	8 (9.00)	1 (1.80)	1 (1.00)
G	257 (84.54)	409 (83.10)	314 (86.70)	381 (66.60)	147 (86.50)	132 (68.00)	646 (85.20)	145 (78.00)	150 (84.30)	26 (92.90)	121 (68.00)	96 (87.30)	178 (90.80)
A	47 (15.46)	83 (16.90)	48 (13.30)	191 (33.40)	23 (13.50)	62 (32.00)	112 (14.80)	41 (22.00)	28 (15.70)	2 (7.10)	57 (32.00)	14 (12.70)	18 (9.20)
P стойност	**-**	**0.62**	**0.44**	**<.0001**	**0.59**	**<.0001**	**0.84**	**0.07**	**1**	**0.28**	**<.0001**	**0.53**	**0.06**

Табл. 4.14. Сравнение на алелните и генотипни честоти за полиморфен вариант *CYP2C19*17* (rs12248560) в групата на популационни контролни индивиди от български произход с резултати, получени за други етносни групи.

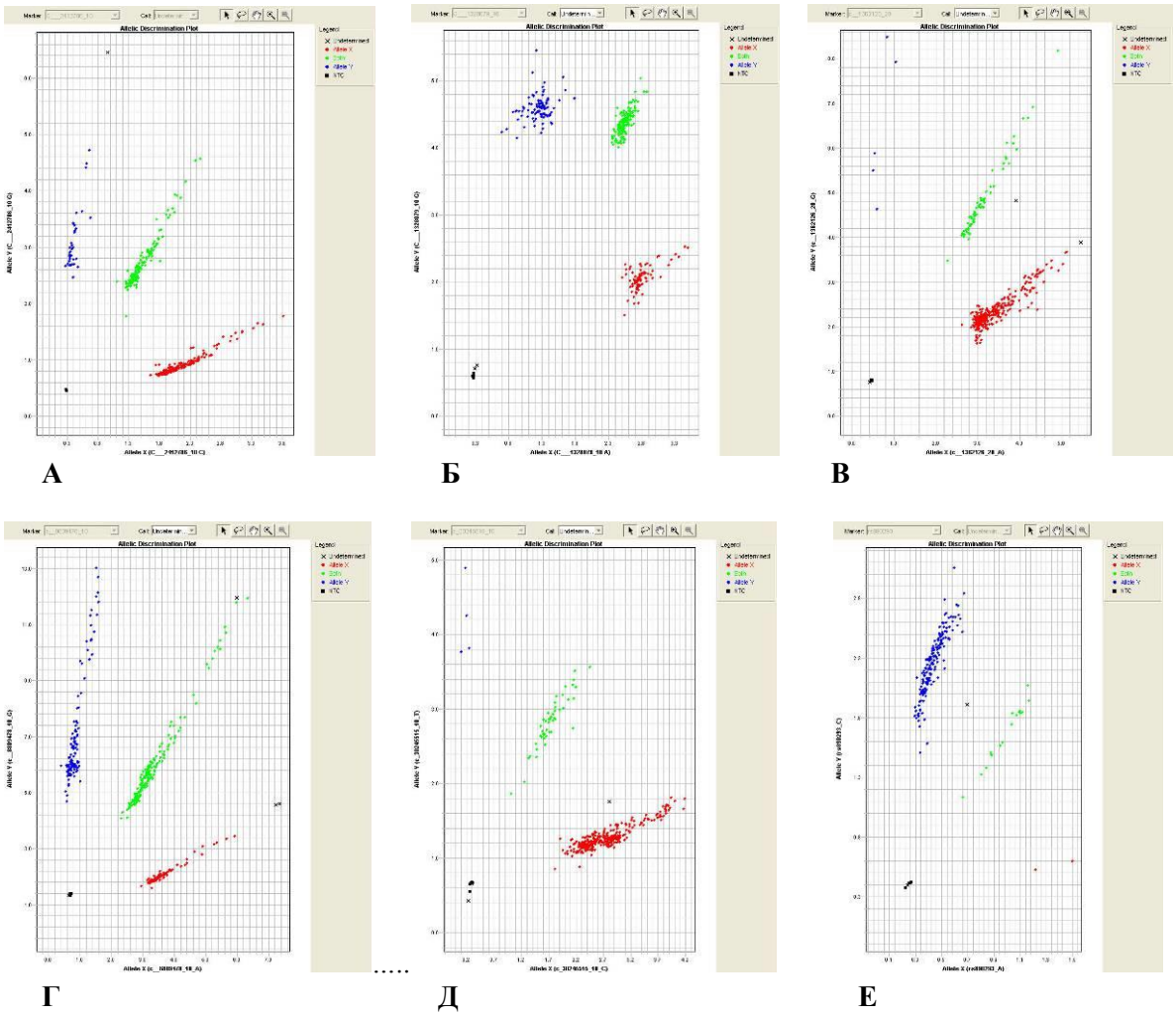
Общо	n=146	n=246	n=181	n=286	n=85	n=97	n=379	n=93	n=89	n=14	n=89	n=55	n=98
*CYP2C19*17* rs12248560	BG	AFR	AMR	ASN	CEU	CHB	EUR	FIN	GBR	IBS	JPT	PUR	TSI
CC	81 (55.00)	154 (62.60)	143 (79.00)	275 (96.20)	49 (57.60)	92 (94.80)	224 (59.10)	55 (59.10)	53 (59.60)	8 (57.10)	88 (98.90)	40 (72.70)	59 (60.20)
CT	56 (38.00)	78 (31.70)	34 (18.80)	11 (3.80)	33 (38.80)	5 (5.20)	137 (36.10)	34 (36.60)	31 (34.80)	6 (42.90)	1 (1.10)	14 (25.50)	33 (33.70)
TT	9 (6.00)	14 (5.70)	4 (2.20)	0 (0.0)	3 (3.50)	0 (0.00)	18 (4.70)	4 (4.30)	5 (5.60)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.80)	6 (6.10)
C	218 (74.66)	386 ()78.50	320 (88.40)	561 (98.10)	131 (77.10)	189 (97.40)	585 (77.20)	144 (77.40)	137 (77.00)	22 (78.60)	177 (99.40)	94 (85.50)	151 (77.00)
T	74 (25.34)	106 ()21.50	42 (11.60)	11 (1.90)	39 (22.90)	5 (2.60)	173 (22.80)	42 (22.60)	41 (23.00)	6 (21.40)	1 (0.60)	16 (14.50)	45 (23.00)
P стойност	-	**0.25**	**<.0001**	**<.0001**	**0.64**	**<.0001**	**0.43**	**0.57**	**0.58**	**0.82**	**<.0001**	**0.009**	**0.59**

Не бяха наблюдавани статистически значими разлики между разпределението на изследваните полиморфни варианти в българската популация и тези при европейци с изключение на полиморфен вариант rs429358 в гена *APOE*. Резултатите за варианти *CYP2C9*2, CYP2C9*3*, *CYP2C19*2* и *CYP3A5*3* са близки до тези, описани в дисертационния труд на Саръева от 2008 год. [*CYP2C9*2* (0.12 vs 0.16), *CYP2C9*3* (0.8 vs 0.6), *CYP2C19*2* (0.16 vs 0.14) и *CYP3A5*3* (0.95 vs 0.94)] [99].

4.4. 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 при европейски популации

Всички полиморфни варианти, представени в **Табл. 3.16.** в раздел **„Материали и методи“** са генотипирани чрез използването на готови TaqMan сонди на фирмата производител Applied Biosystems (Foster City, California, USA).

Диаграмите от генотипирането на подбрани полиморфни варианти са представени на **Фиг. 4. 4.**



А **Б** **В**

Г **Д** **Е**

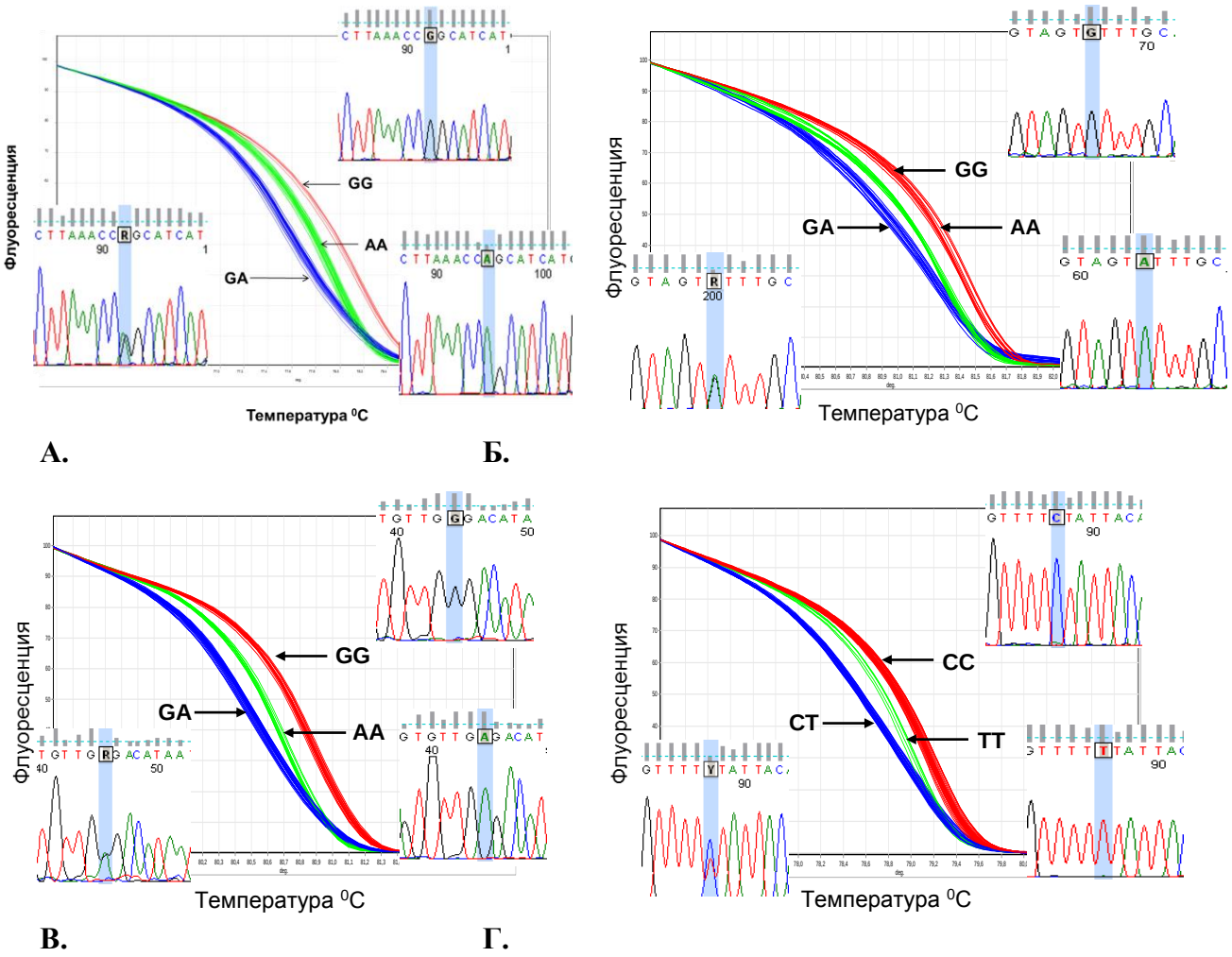
Фиг. 4.4. Диаграми от генотипирането на подбрени полиморфни варианти чрез използване на TaqMan сонди:

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).
Д. Полиморфен вариант rs3918226 (*eNOS* g.7030C>T).
Е. Полиморфен вариант rs890293 (*CYP2J2* g.4930G>T).

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

Всички варианти от **Табл. 3.9-3.10.** в раздел **„Материали и методи“** бяха генотипирани чрез HRMA метода.

Диаграмите от генотипирането на подбрани полиморфни варианти са представени на **Фиг. 4. 5.**



Фиг. 4.5. Нормализирани графики на топене на участъците от ДНК, съдържащи:
А: Полиморфен вариант rs7865618 (локус 9p21 g.22031005G>A).
Б: Полиморфен вариант rs2383206 (локус 9p21 g.22115027A>G).
В: Полиморфен вариант rs10757274 (локус 9p21 g.22096056A>G).
Г: Полиморфен вариант rs7857345 (локус 9p21 g.22087474T>C).

4.5. Фармакогенетични изследвания за оптимизиране на терапията с антитромбоцитния медикамент клопидогрел

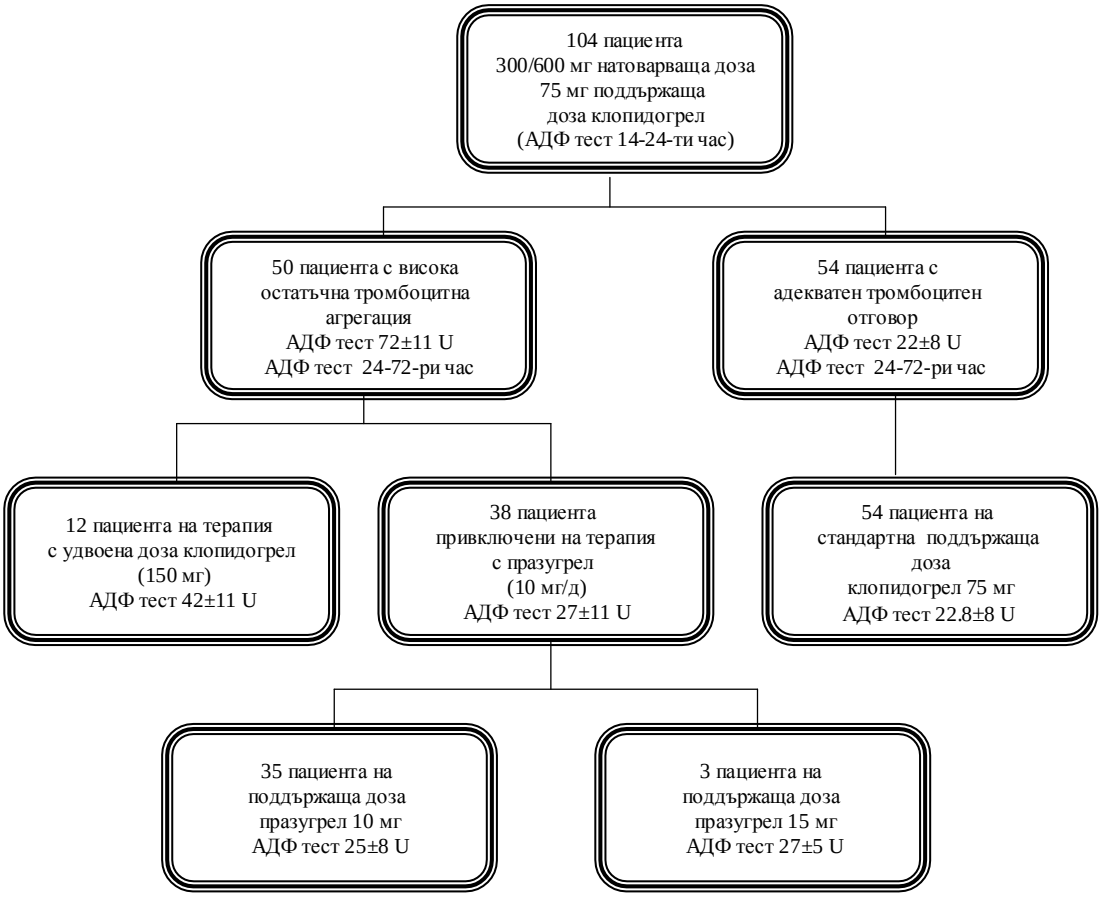
4.5.1. Системен ход на анализа и подбор на пациенти

Системният ход на проведения анализ включваше следните основни стъпки:

1. **Подбор на пациенти, отговарящи на изискванията за провеждане на фармакогенетичен анализ**: за тази цел бяха събрани кръвни проби от общо 104 пациента с повишен риск от тромбози след поставяне на коронарен стент в засегнатата артерия. Клиничните характеристики на пациентите са дадени в **Табл. 3.4**. в раздел **„Материали и методи”**. Проведеното проучване е проспективно, едноцентрово и включва изследване на 69 мъже и 35 жени с диагнози нестабилна ангина пекторис (НАП) (n=70) и остър миокарден инфаркт със ST-елевация (n=34) (STEMI).
2. **Изолиране на високомолекулна, геномна ДНК от периферна кръв**.
3. **Провеждане на молекулярно-генетичен анализ** на подбрани полиморфни варианти, за които се предполага, че имат връзка с отговора към лечението с КЛД.

4. **Статистически анализ** на получените резултати.

Общият ход на проведеното проучване е представен нагледно на **Фиг. 4.6.**



Фиг. 4.6. Ход на проучването с превключване на лечението от клопидогрел към празугрел въз основа на измерването на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация чрез множествена импедансна агрегометрия[225].

4.5.2. Определяне на АДФ – индуцираната тромбоцитна агрегация чрез множествена, импедансна агрегометрия на анализатор Multiplate

Всички пациенти са получили първоначално 300/600 мг натоварваща доза и впоследствие 75 мг поддържаща доза КЛД от 2 до 14 часа преди провеждането на ПКИ и са били на хронична терапия със 100 мг/д аспирин до този момент. Пациентите с ВОТА (висока, остатъчна, тромбоцитна агрегация със стойности от АДФ-теста над 45.5U) в първите 24 часа от лечението получаваха двойно по–висока доза от медикамента при поддържащата терапия (150 мг/д) КЛД (n=12) или бяха превключвани на 10 мг/д празугрел (n=38) с контролен АДФ-тест до 3-ти ден (72-ри час) от началото на терапията (**Фиг. 4.6**).

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. 4.15**). Като разграничителна точка е използвана стойността, получена от ROC кривата на АДФ-тестовете, измерени с импедансната агрегометрия на анализатор Multiplate при специфичност 0.84 и чувствителност 0.79. Площта под кривата на измерването (area under the curve, AUC) е определена на 0.86 (95% CI 0.772-0.957), $p < 0001$.

АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация е извършена в клиничната лаборатория на НКБ по предварително описан протокол [220, 226].

Табл. 4.15. 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

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 подържаща доза медикамент съответно на 600 мг и 150 мг дневно. При 25 от пациентите (50%) поради ВОТА над прицелната стоност 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.

В групата на пациентите (n=54) с добър отговор измерената агрегация на тромбоцитите с АДФ-тест показа 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 гупата бе 27±11 U (270±110 AU*min) като беше постигнато намаление на инхибираната тромбоцитна агрегация с 65%. Трима пациенти от тази група изискваха по-висока поддържаща доза празугрел – 15 мг/д, за достигане на средните за групата стойности.

4.5.3. 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 подбрани 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.

Първата стъпка в анализа на влиянието на генетичните фактори върху отговора към лекарствена терапия с КЛД беше избор на панел от полиморфни маркери, които биха имали потенциално значение при лечението на пациентите с тиенопиридини и оптимизиране на терапията. За тази цел бяха подбрани единични нуклеотидни полиморфизми, показали значима асоциация с риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване (ИБС и АХ), диабет, инсулинова резистентност, затлъстяване, нива на липиди в кръвта при провеждането на цялостен геномен скан при европейци (**Табл. 3.10** и **3. 22**), като в анализа бяха включени и трите най-често изследвани варианти в контекста на клопидогрелова резистентност - *CYP2C19*2, CYP2C19*17* и *CYP3A5*3*. Хипотезата, която искахме да проверим е, дали вариации в генома, срещащи се с висока честота в общата популация и които се свързват с промени в патофизиологията на атеросклерозата, диабета и повишените стойности на АН, биха оказали влияние и върху

начина, по който лекуваните пациенти се повлияват от терапията с КЛД. Възможно е различните патофизиологични механизми, лежащи в основата на сърдечните заболявания, да се повлияват по различен начин от лечението със съответните медикаменти.

Пълните резултатите от проведения асоциативен анализ за всички изследвани полиморфни варианти са дадени в **Табл. 7.1.** в раздел **«Приложение»** . Значимите асоциации с отговора към лекарствена терапия с КЛД са представени в **Табл. 4.16.**

Табл. 4.16. 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	***IL6R rs2229238 C>T***	Генотипен	TT	2 (4.00)	2 (3.70)	0.92 (0.13-6.81)	**1**	2 (6.25)	0 (0.00)	Infinity	**0.16**	0 (0.00)	2 (12.50)	-	**0.21**
			TC	11 (22.00)	25 (46.30)	0.33 (0.14-0.77)	**0.016**	10 (31.25)	17 (44.74)	0.56 (0.21-1.050)	**0.33**	1 (5.56)	8 (50.00)	0.051 (0.006-0.55)	**0.006**
			CC	37 (74.00)	27 (50.00)	1.37 (0.66-2.84)	**0.45**	20 (62.50)	21 (55.26)	1.35 (0.52-3.52)	**0.63**	17 (94.44)	6 (37.50)	28.33 (2.97-270.58)	**0.0006**
		Алелен	T	15 (15.00)	29 (26.85)	0.48 (0.24-0.96)	**0.04**	14 (21.88)	17 (22.37)	0.97 (0.44-2.17)	**1**	1 (2.79)	12 (37.50)	0.05 (0.006-0.39)	**0.0003**
			C	85 (85.00)	79 (73.15)	2.08 (1.04-4.17)	**0.04**	50 (78.13)	59 (77.63)	1.02 (0.46-2.29)	**1**	35 (97.22)	20 (62.50)	21.00 (2.54-173.68)	**0.0003**
3	***ADIPOQ rs1501299 G>T***	Генотипен	TT	3 (6.25)	12 (22.22)	0.23 (0.06-0.89)	**0.027**	1 (3.13)	9 (23.68)	0.10 (0.01-0.87)	**0.02**	2 (12.50)	3 (18.75)	0.62 (0.09-4.32)	**1**
			TG	16 (33.33)	14 (25.93)	1.43 (0.61-3.56)	**0.51**	12 (37.50)	9 (23.68)	1.93 (0.69-5.44)	**0.30**	4 (25.00)	5 (31.25)	0.73 (0.16-3.45)	**1**
			GG	29 (60.42)	28 (51.85)	1.42 (0.65-3.11)	**0.43**	19 (59.38)	20 (52.63)	1.32 (0.51-3.40)	**0.63**	10 (62.50)	8 (50.00)	1.67 (0.41-6.82)	**0.72**
		Алелен	T	22 (22.92)	38 (35.19)	0.55 (0.3-1.02)	**0.05**	14 (21.88)	27 (35.53)	0.51 (0.24-1.08)	**0.09**	8 (25.00)	11 (34.38)	0.63 (0.22-1.88)	**0.58**
			G	74 (77.08)	70 (64.81)	1.83 (0.98-3.39)	**0.05**	50 (78.13)	49 (64.47)	1.97 (0.92-4.19)	**0.09**	24 (75.00)	21 (63.64)	1.57 (0.53-4.64)	**0.58**
5	***NPR3, C5orf23 rs1173771 G>A***	Генотипен	AA	3 (6.00)	10 (18.52)	0.28 (0.7-1.9)	**0.08**	1 (3.13)	6 (15.79)	0.12 (0.01-1.05)	**0.04**	2 (11.11)	4 (25.00)	0.38 (0.06-2.40)	**0.39**
			AG	25 (50.00)	31 (57.41)	0.74 (0.34-1.61)	**0.55**	15 (46.88)	22 (57.89)	0.64 (0.25-1.65)	**0.47**	10 (55.56)	9 (56.25)	0.97 (0.25-3.77)	**1**
			GG	22 (44.0)	13 (24.07)	2.48 (1.07-5.72)	**0.039**	16 (50)	10 (26.32)	2.80 (1.03-7.62)	**0.05**	6 (33.33)	3 (18.75)	2.17 (0.44-10.65)	**0.45**
		Алелен	A	31 (31.00)	51 (47.22)	0.40 (0.23-0.71)	**0.016**	17 (26.56)	34 (44.74)	0.45 (0.22-0.91)	**0.026**	14 (38.89)	17 (53.13)	0.56 (0.21-1.47)	**0.33**
			G	69 (69.00)	57 (52.19)	2.49 (1.41-4.39)	**0.016**	47 (73.44)	42 (55.26)	2.24 (1.09-4.58)	**0.026**	22 (61.11)	15 (46.88)	1.78 (0.68-4.67)	**0.33**
6	***PHACTR1 rs9349379 A>G***	Генотипен	GG	5 (10.42)	15 (27.78)	0.30 (0.10-0.91)	**0.027**	3 (9.68)	12 (31.58)	0.23 (0.06-0.92)	**0.04**	2 (11.76)	3 (18.75)	0.58 (0.08-4.01)	**0.66**
			GA	20 (42.67)	21 (38.89)	1.12 (0.51-2.48)	**0.84**	14 (45.16)	14 (36.84)	1.41 (0.54-3.71)	**0.62**	6 (35.29)	7 (43.75)	0.70 (0.17-2.85)	**0.73**
			AA	23 (47.92)	18 (33.33)	1.84 (0.83-4.10)	**0.16**	14 (45.16)	12 (31.58)	1.78 (0.67-4.77)	**0.32**	9 (52.94)	6 (37.5)	1.86 (0.47-7.53)	**0.49**
		Алелен	G	30 (31.25)	51 (47.22)	0.51 (0.29-0.90)	**0.019**	20 (32.26)	38 (50.00)	0.47 (0.24-0.96)	**0.035**	10 (29.41)	13 (40.63)	0.61 (0.22-1.69)	**0.44**
			A	66 (68.75)	57 (52.78)	1.97 (1.11-3.49)	**0.019**	42 (67.74)	38 (50.00)	2.10 (1.05-4.22)	**0.035**	24 (70.59)	19 (59.38)	1.64 (0.59-4.56)	**0.44**
7	***LEP rs7799039***	Генотипен	AA	17 (34.00)	11 (20.37)	2.01 (0.83-4.87)	**0.04**	13 (40.62)	7 (18.42)	3.03 (1.03-8.94)	**0.06**	4 (22.22)	4 (25.00)	0.93 (0.19-4.50)	**1**

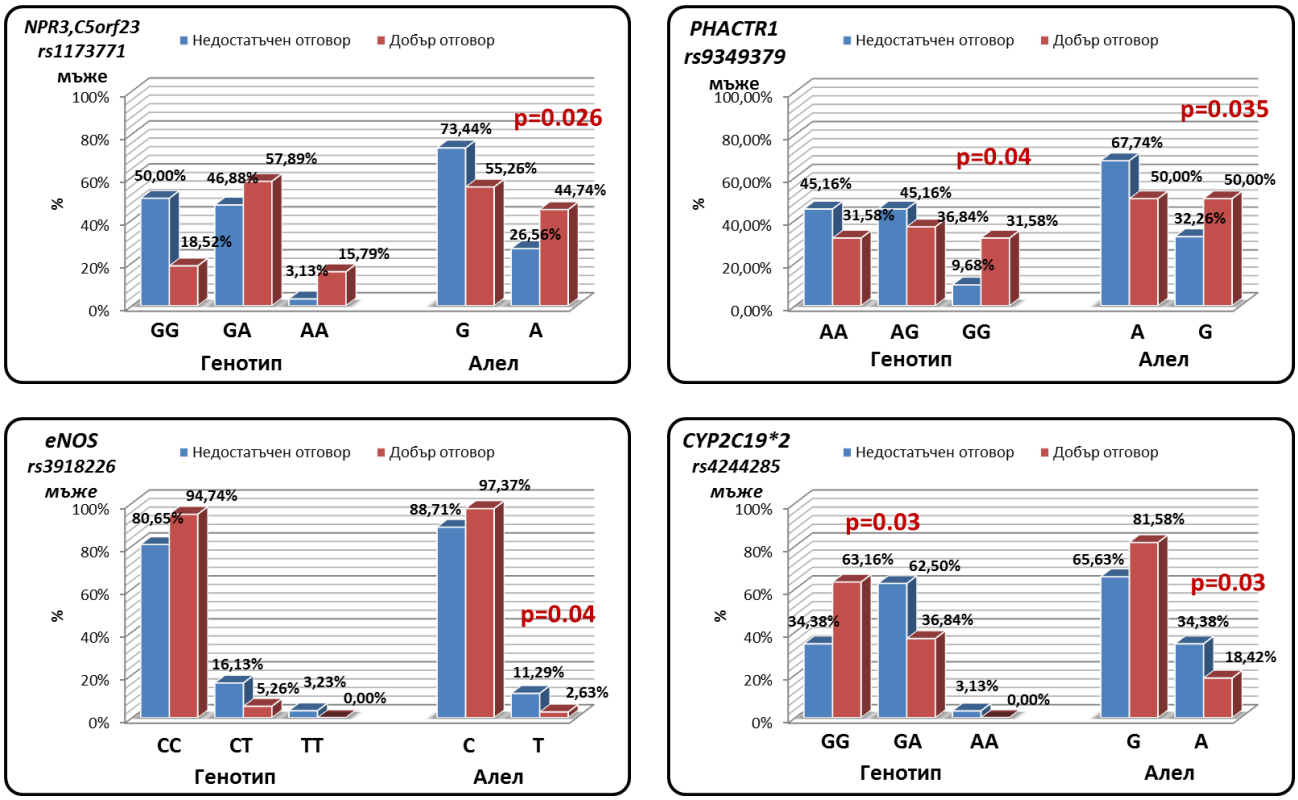
	G>A		AG	18 (36.00)	23 (42.59)	0.76 (0.34-1.67)	**0.55**	11 (34.38)	18 (47.37)	0.58 (0.22-1.53)	**0.33**	7 (38.89)	5 (31.25)	1.40 (0.34-5.79)	**0.73**
			GG	15 (3.000)	20 (37.03)	0.70 (0.31-1.61)	**0.53**	8 (25.00)	13 (34.21)	0.64 (0.23-1.82)	**0.44**	7 (38.89)	7 (43.75)	0.82 (0.21-3.22)	**1**
		Алелен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

Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти, показали различен отговор към терапия с клопидогрел, са представени в **Табл. 8. 1**. в раздел **«Приложения».**

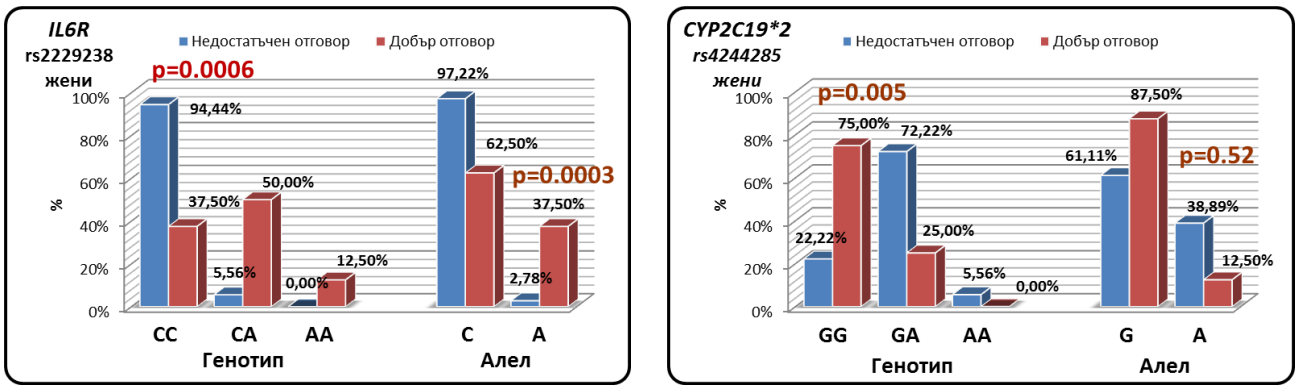


Фиг. 4.7. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти, показали различен отговор към терапията с клопидогрел.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка с медикаментозната терапия.



Фиг. 4.8. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти от мъжки пол, показали различен отговор към терапията с клопидогрел. Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка с медикаментозната терапия.



Фиг. 4.9. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти от женски пол, показали различен отговор към терапията с клопидогрел. Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка с медикаментозната терапия.

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) (**Фиг. 4.7**). 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) (**Фиг. 4.8**), докато в групата на жените се наблюдава засилването на влиянието на полиморфната замяна в гена *IL6R* (p=0.0003) (**Фиг. 4.9**).

Беше изследвано и епистатичното взаимодействие (статистическа епистаза) на подбраните полиморфизми по отношение на терапевтичния отговор към медикамента КЛД (**Таблица 4.17**).

Табл. 4. 17. Епистатични взаимодействия (статистическа епистаза) 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_INT	t	P стойност	Коригирано p по Бонферони
6	***PHACTR1***	rs9349379	9	***9p21***	rs7865618	5.62	10.62	0.001	**0.032**
6	***PHACTR1***	rs9349379	9	***9p21***	rs1537378	6.24	10.7	0.002	**0.064**

4.6. Фармакогенетични изследвания за оптимизиране на антикоагулантната терапия с аценокумарол

4.6.1. Системен ход на анализа и подбор на пациенти

Системният ход на проведения анализ включваше следните основни стъпки:

1. **Подбор на пациенти, отговарящи на изискванията за провеждане на фармакогенетичен анализ**: за тази цел бяха събрани кръвни проби от общо 172 пациента с повишен риск от тромбози.
2. **Изолиране на високомолекулна, геномна ДНК от периферна кръв**.
3. **Провеждане на молекулярно-генетичен анализ** на общо десет полиморфни варианта в четири гена: *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057310), *VKORC1*2A* (rs9923231 и rs9934438), *VKORC1*2B* (rs2884737), *VKORC1*3* (rs7294) , *VKORC1*4* (rs17708472) и *APOE* (rs7412 и rs429358), за които се предполага, че имат връзка с отговора към лечението с АЦ.
4. **Статистически анализ** на получените резултати.

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.

Средната възраст на пациентите, включени в настоящото проучване е 58.57 ± 14.24 години. От тях 84 (48.84%) са жени и 88 (51.16%) са мъже. По – голяма част от пациентите получават АЦ в следствие на клапно протезиране (протезиране на аортна или митрална клапа) или ритъмни сърдечни нарушения - 117 пациенти (68.02%). При изследваната група от пациенти беше установена средна дневна поддържаща доза аценокумарол от 2.81 ± 1.88 мг.

Клиничните и демографски характеристики на изследваната група български пациенти, подложени на терапия с АЦ са представени в **Табл. 4. 18.**

Табл. 4. 18. Демографски характеристики на изследваната група български пациенти, подложени на терапия с АЦ (N=172).

Характеристика	Средна стойност ± стандартно отклонение
Възраст (години) (mean±SD)	58.57 ± 14.24
Пол	
Мъже [n (%)]	88/172(51.16%)
Жени [n (%)]	84/172(48.84%)
Етническа принадлежност	българи
Височина (см)	171.67 ± 9.64
Тегло (кг)	80.90 ± 17.08
ИТМ (кг/м2)	27.88 ± 5.37
Средна доза аценокумарол	2.81 ± 1.88
Прием на амиодарон	19/172 (11.05%)
Причина за прием на аценокумарол	
Предсърдно мъждене	46 (26.74)
Белодробен тромбоемболизъм	18 (10.47)
Дълбока венозна тромбоза	17 (9.88)
Смяна на сърдечна клапа	71 (41.28)
Други	20 (11.63)

4.6.2. 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. 19.**

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 [210]. 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 ($\chi2$ = 0.06, p=0.80). Подобен резултати са получени за вариантите *VKORC1*3* (p=1.0, $\chi2$=2.60); *VKORC1*4* (p=1.0, $\chi2$=0.0); *APOE*2* ($\chi2$=0.45, p=0.50) и *APOE*4* ($\chi2$=0.21, p=0.65). Наблюдаваното при останалите полиморфни варианти отклонение от равновесното състояние (за *VKORC1*2A* $\chi2$ =7.18, p=0.007; за *VKORC1*2B* $\chi2$ = 12.8, p=0.0003; за *CYP2C9*2* $\chi2$ = 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.

Табл. 4. 19. 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 (%)
CYP2C9		**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 **χ^2= 4.59 p=0.03**	rs1057910 **χ^2= 0.06 p=0.80**	**170**
APOE		**1/*1*	130(81,25)
	rs429358	**1/*4*	29(18,13)
		**4/*4*	1(0,63)
HWE	**χ^2= 0.21 p-0.65**		**160**
APOE	rs7412	**1/*1*	141(89,81)
		**1/*2*	16(10,19)
HWE	**χ^2= 0.45 p=0.50**		**157**
VKORC1*2A		**1/*1*	59 (34,71)
	rs9934438	**1/*2A*	67(39,41)
		**2A/*2A*	44(25,88)
HWE	**χ^2= 7.18 p=0.007**		**170**
VKORC1*2B		**1/*1*	33(19,76)
	rs2884737	**1/*2B*	56(33,53)
		**2B/*2B*	78(46,71)
HWE	**χ^2= 12.8 p=0.0003**		**167**
VKORC1*3		**1/*1*	83(49,70)
	rs7294	**1/*3*	63(37,72)
		**3/*3*	21(12,57)
HWE	**χ^2= 2.6 p=1.0**		**167**
VKORC1*4		**1/*1*	104(63,03)
	rs17708472	**1/*4*	54(32,73)
		**4/*4*	7(4,24)
HWE	**χ^2= 0 p=1.0**		**165**

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

Нашата цел беше да се определи влиянието на полиморфни варианти в гените *CYP2C9, VKORC1* и *APOE* върху отговора към лекарствена терапия с АЦ, да се създаде математически модел за определяне на оптималната доза медикамент, който впоследствие да бъде валидиран в независима група от пациенти на антикоагулантна терапия. Създаването на алгоритъма 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). Данните от еднофакторния анализ бяха обработени статистически чрез вариационен анализ с Т-тест, алтернативен анализ с Хи квадрат тест, OR и 95% CI и графичен анализ. Застъпен беше и модел на множествен регресионен анализ с помощта на статистическия пакет SPSS.

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.

Важно е да се отбележи, че в тестовата група при малка част от пациентите има липсващи генотипи поради неуспешно генотипиране. За да се избегне влиянието на тези липсващи данни върху статистическите анализи, в използваната статистическа програма беше предварително зададена опция за автоматично изключване на съответните пациенти от провеждания анализ за конкретния фактор.

Резултатите от непараметричния корелационен анализ за определяне на връзката на клиничните, демографски и генетични характеристики с дневната доза аценокумарол са обощени в **Табл. 4. 20.**

Табл. 4. 20. 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	P стойност	Корелационен коефициент	P 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	***VKORC1*2A* rs9923231 (-1639G>A)**	-0.446	<0.001	-0.545	<0.001
	***VKORC1*2B* rs2884737**	0.321	<0.001	0.398	<0.001
	***VKORC1*3* rs7294**	0.343	<0.001	0.416	<0.001
	***VKORC1*4* rs17708472**	0.174	0.023	0.208	0.026
	CYP2C9*2	-0.235	0.002	-0.280	0.002
	CYP2C9*3	-0.162	0.037	-0.193	0.036
	APOE rs7412	0.064	0.43	0.076	0.43
	APOE rs429358	-0.057	0.48	-0.068	0.48

Корелационният анализ на Спиърман показва, че възрастта (r2 = -0.273, p=0.003), както и генетични варианти в двата гените *CYP2C9* и *VKORC1* [*CYP2C9*2* (r2 = -0.280, p=0.002), *CYP2C9*3* (r2 = -0.193, p=0.036), *VKORC1*2A* (r2 = -0.545, p<0.001), *VKORC1*2B* (r2 = 0.398, p<0.001), *VKORC1*3* (r2 = 0.416, p<0.001) и *VKORC1*4* (r2 = 0.208, p=0.026)] оказват съществено влияние върху средната, дневна поддържаща доза аценокумарол при изследваната група от български пациенти с повишен риск от тромбози (**Табл. 4. 21**). Други фактори като пол (r2 = -0.052, p=0.53), диагноза (r2 = 0.063, p=0.50), височина (r2 = 0.150, p=0.25), тегло (r2 = 0.170, p=0.10), индекс на телесна маса (r2 = 0.259, p=0.46), прием на амиодрон (r2 = 0.125, p=0.21), тютюнопушене (r2 = 0.041, p=0.69) и прием на статини (r2 = 0.139, p=0.21), *APOE rs7412* (r2 = 0.076, p=0.43), *APOE rs429358* (r2 = гена не са свързани значимо с поддържащата доза на медикамента.

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 [227, 228]. Поради тази причина в последващите анализи беше включен само един от тези два полиморфизма – в случая *VKORC1 -1639G>A.*

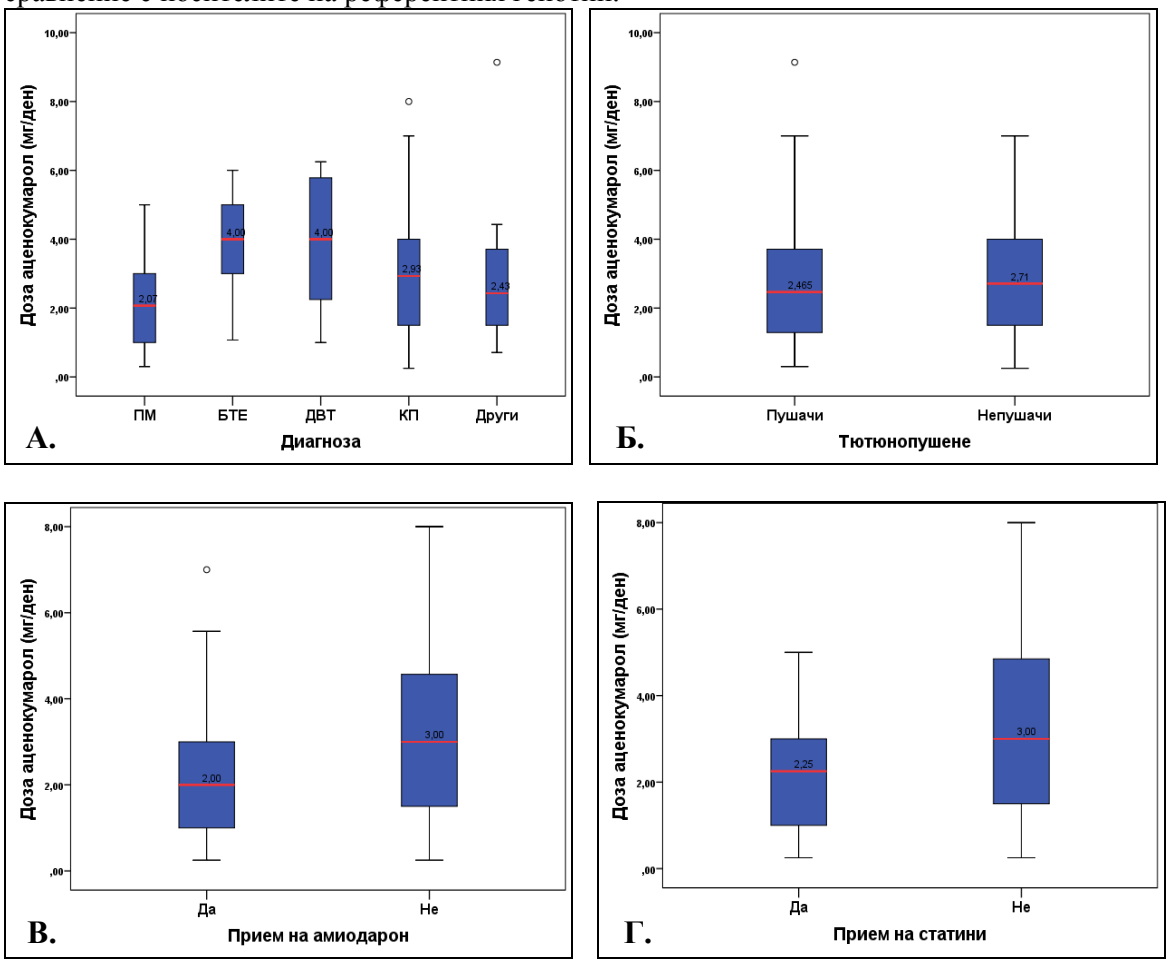
Чрез използване на t-тест бяха сравнени средните дневни поддържащи дози аценокумарол между групите пациенти с различни генотипи в тестовата група за всички изследвани полиморфни варианти. Числените данни са представени като средна стойност ± стандартно отклонение в **Табл. 4. 21.**

Табл. 4. 21. 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.

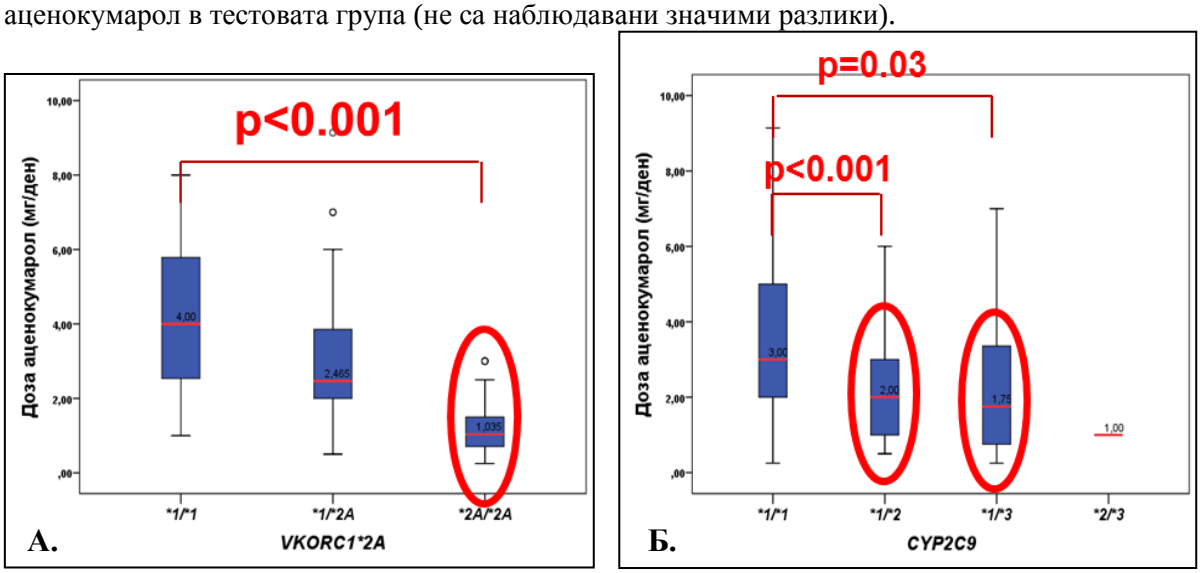
Ген	Полиморфизъм	Генотип	N (%)	Средна доза ± стандартно отклонение	% редукция/увеличаване в дозата спрямо дивия тип
CYP2C9		**1/*1*	76 (64.41)	3.51±2.00	-
	rs1799853	**1/*2*	25(21.19)	2.10±1.40	-40.17
	rs1057910	**1/*3*	16(13.56)	2.28±1.90	-35.04
		**2/*3*	1(0.85)	1.00±0.00	-71.51
HWE	rs1799853 **χ^2= 1.81 p=0.18**	rs1057910 **χ^2 = 0.71 p=0.39**	**118**		
APOE		**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	**χ^2= 1.5 p=0.22**		**110**		
APOE	rs7412	**1/*1*	99(90.83)	2.92±1.94	-
		**1/*2*	10(9.17)	3.53±2.28	17.38
HWE	**χ^2= 0.25 p=0.62**		**109**		
VKORC1* 2A		**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	**χ^2= 6.1 p=0.01**		**118**		
VKORC1* 2B		**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	**χ^2= 9.45 p=0.002**		**115**		
VKORC1* 3		**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	**χ^2= 0.22 p=0.64**		**115**		
VKORC1* 4		**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	**χ^2= 0.03 p=0.85**		**115**		

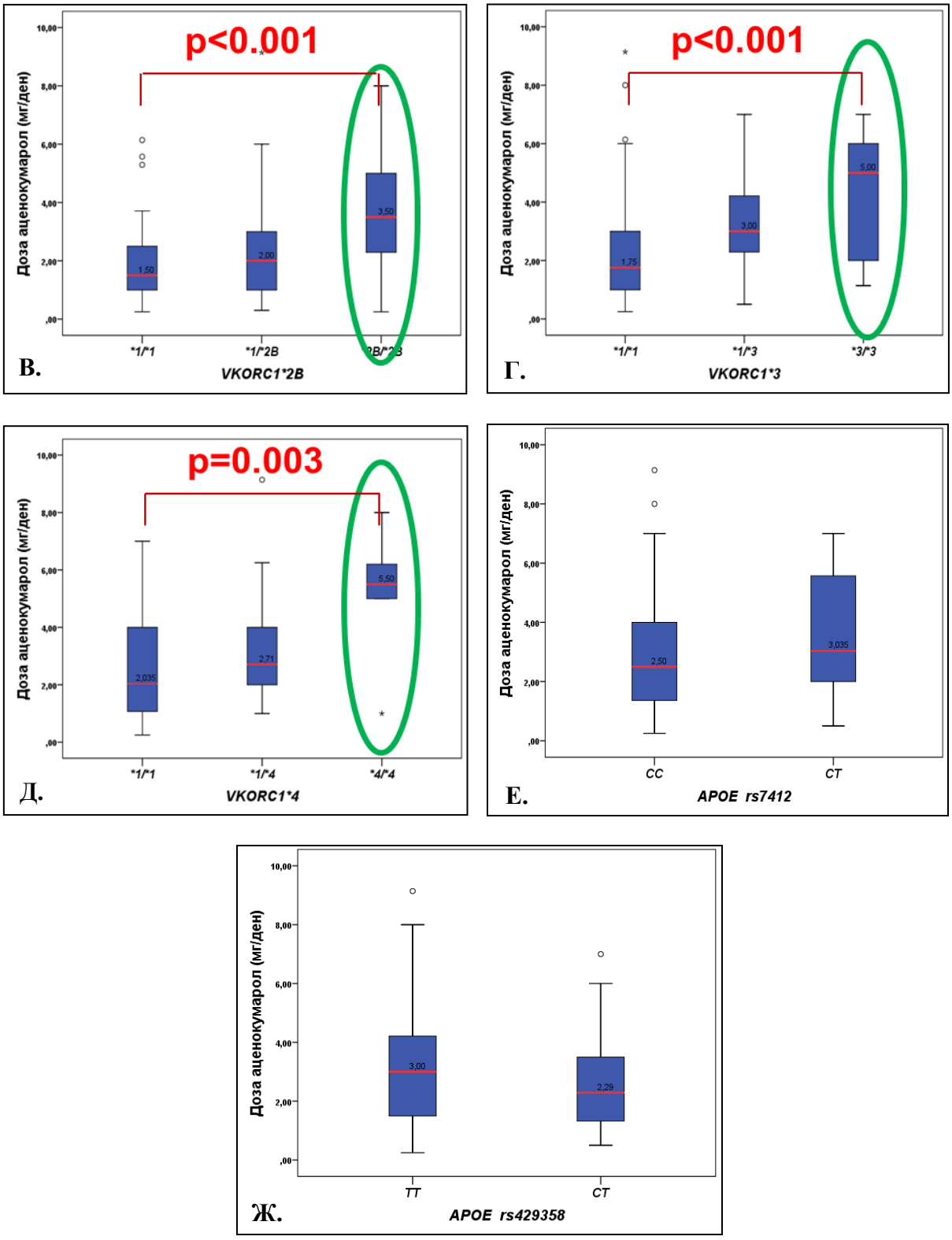
Средната дневна поддържаща доза аценокумарол в групата пациенти, носители на полиморфен вариант дори за един от изследваните полиморфизми е значително по-ниска от средната поддържаща доза антикоагулант при пациентите с референтния алел. Носителите на референтен генотип за *CYP2C9* и *VKORC1* изискват близки дневни, поддържащи дози аценокумарол (3.51±2.00 (SD) мг за *CYP2C9 *1*1* и 4.01±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. 10. Влияние на основните клинични фактори върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група (не са наблюдавани значими разлики).



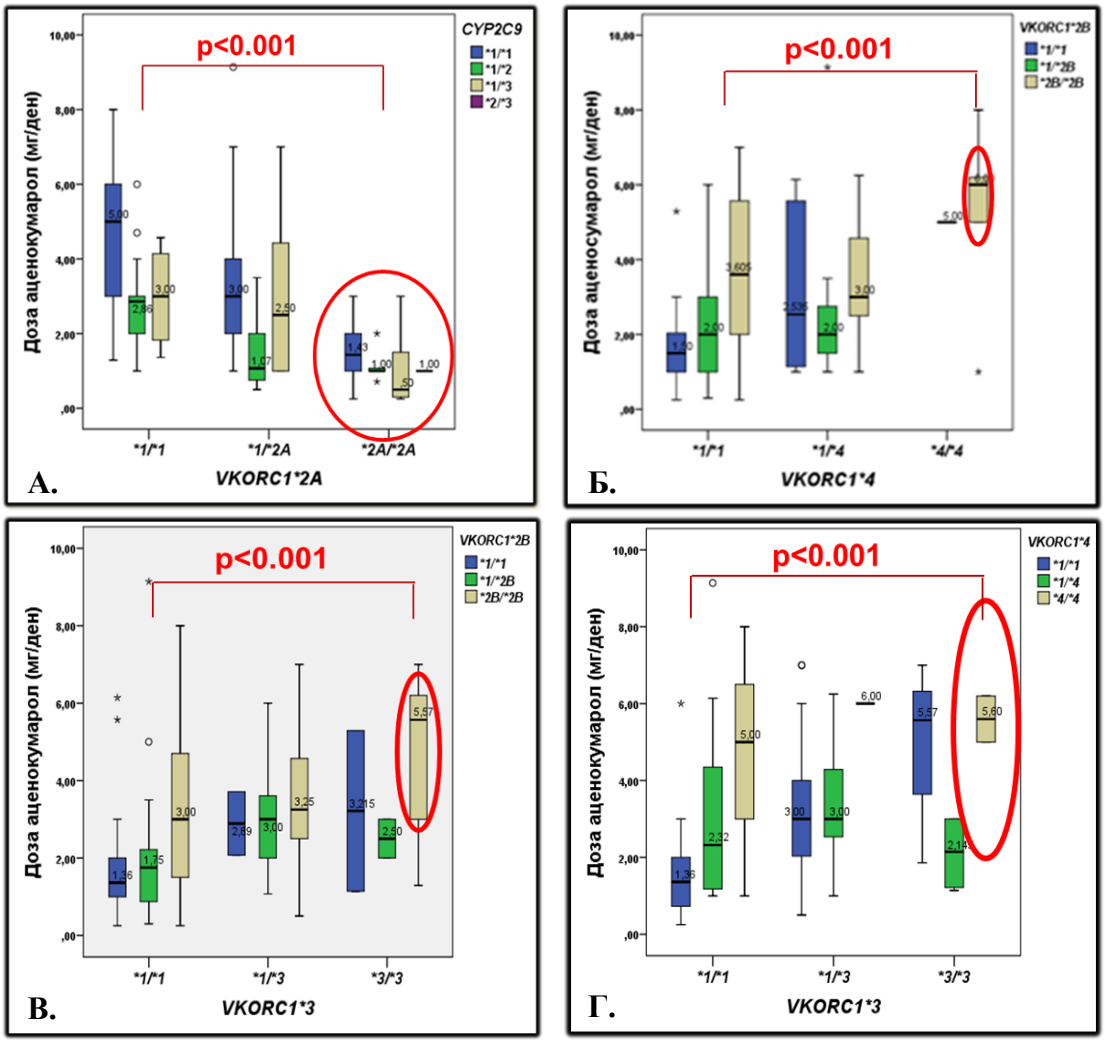


Фиг. 4. 11. Влияние на носителството на полиморфни варианти в гените *VKORC1*, *CYP2C9* и *APOE* върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група (отбелязани са само статистически значимите асоциации).

Ефектът от комбинираното носителство на полиморфни варианти и за двата гена върху дневната поддържаща доза АЦ е сравнен с референтния генотип (**Табл. 4.22**). 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±1.28 мг/ден) в сравнение с пациентите с различни комбинации от полиморфни варианти.

Табл. 4. 22. Ефект на комбинираното носителство на генотипи за *CYP2C9* и *VKORC1* върху средната, дневна, поддържаща доза аценокумарол при изследваната група български пациенти.

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



Фиг. 4. 12. Ефект на комбинираното носителство на полиморфни варианти в гените *VKORC1* и *CYP2C9* върху оптималната поддържаща доза аценокумарол в тестовата група.

4.6.4. 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. 23.**

Табл. 4. 23. Генетични и клинични фактори, оказващи влияние върху дневната оптимална поддържаща доза аценокумарол при изследваната група от пациенти със сърдечно-съдови заболявания. С R^2 е означен процентът вариабилност в дозата индиректен антикоагулант, дължащ се на съответния фактор.

Фактори:	R^2 (%)	Коригирано R^2 (%)	P 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. B-коефициентите представляват относителната сила на влияние върху медикаментозното дозиране на всяка независима променлива, включена в модела. R^2 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 показа, 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. 24**).

Табл. 4. 24. Независими генетични и клинични фактори, оказващи влияние върху дневната оптимална поддържаща доза аценокумарол след прилагане на множествен регресионен анализ (**модел 1**).

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

Създаден е следният математически алгоритъм:

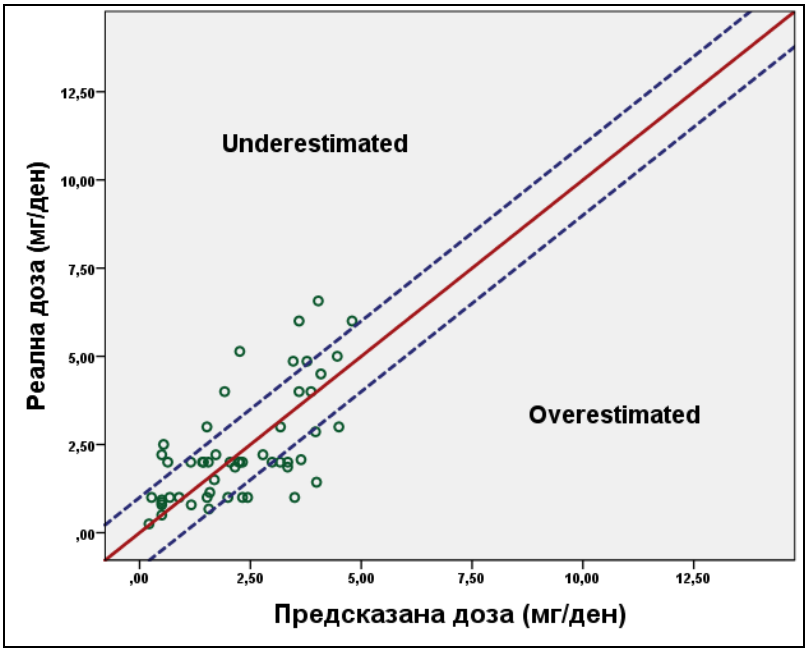
Оптимална дневна поддържаща доза аценокумарол (мг/ден) = 5.939 – 0.033*(възраст в години) – 1.149* (брой *VKORC1*2A* алели) + 0.433*(брой *VKORC1*3* алели) – 1.425*(брой *CYP2C9*2* алели) – 0.486*(брой *CYP2C9*3* алели)

4.6.5. 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 ±1.57, докато тази, с която са лекувани пациентите е по-ниска: 2.12 ± 1.57.



Фиг 4.13. 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 ±1 мг/ден спрямо реалната доза антикоагулант.

4.6.6. 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 [127]. 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, комедиация, 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., Borobia и съавт., Rathore и съавт., Cerezo-Manchado и съавт., Kumar и съавт., Radu Pop и съавт. и Wolkanin-Bartnik J. и съавт. [126-133].

Въпреки немалкия брой публикувани прогностични регресионни модели, само този на Borobia et al. [128] 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 [127] 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.

Математическите алгоритми за дозиране на аценокумарол при различните фармакогенетични проучвания са представени в **Табл. 4. 25.**

Табл. 4. 25. Математически алгоритми за дозиране на аценокумарол при различните фармакогенетични проучвания.

Проучване	Регресионен модел
Markatos et al., 2008 [127]	**Доза (мг/ден)=*anti* log*[1.083-0.004**възраст*-0.188* (*VKORC1 -1639 генотип)*-0.073*(*CYP2C9 генотип*)]**[1]
van Schie et al., 2011 [133]	**√доза (мг/седмица) = 4.117 – 0(при *CYP2C9*1/*1 генотип*) - 0.093(при *CYP2C9*1/*2 генотип*) - 0.519 (при *CYP2C9*1/*3 генотип*) - 0.435 (при *CYP2C9*2/*2 генотип*) - 0.466 (при *CYP2C9*2/*3 генотип*) - 1.375 (при *CYP2C9*3/*3 генотип*) - 0 (при *VKORC1 -1639GG генотип*) - 0.572 (при *VKORC1 -1639GA генотип*) - 1.267 (при *VKORC1-1639AA генотип*) - 0.027*(*възраст в год.*) + 0.271 (ако е жена) + 0.009*(*височена в см)* + 0.010 *(*тегло в кг)* - 0.377 (ако приема амиодарон)**
Borobia et al., 2012 [128]	**Доза (мг/ден)=A-0.294*(*възраст в год*)+0.240*(*ИТМ*)+0.119*(*прием на медикаменти, индуциращи системата на CYP*)-0.142*(ако приема амиодарон)-0.257*(при *CYP2C9*1/*3 генотип*)-0.253*(при *CYP2C9*2*2 или CYP2C9*2*3 или CYP2C9*3*3 генотип*)-0.150*(при *VKORC1 -1639GA генотип*)-0.533*(при *VKORC1 -1639AA генотип*)+0.199*(при *CYP4F2 V433M генотип*)+0.123*(при *ApoE rs7412TT генотип*) [2]**
Rathore et al., 2012 [132]	**Доза (мг/ден)=3.082–0.013*(*тютюнопушене, 1 за пушач и 0 за непушач*)–0.433*(*пол, 1 за мъже и 0 за жени*)–0.004*(*възраст в години*)+*индикация**(0.327 *за ДВТ* и –0.092 *за смяна на аортна клапа*)+0.026*(*височина в см*)+0.151*(*тегло в кг*)–7.660*(*повърхнос на тялото*)–0.862*(при *VKORC1-1639GA генотип*)–2.257*(при *VKORC1-1639AA генотип*)–0.049*(при *CYP2C9*1*2 генотип*) –0.456*(прш *CYP2C9*1*3 генотип*)+ 0.449*(при *CYP4F2 V433M генотип*) + 0.230*(при *CYP4F2 V433M генотип*) + 0.245*(при *GGCX CG генотип*) +1.055*(при *GGCX GG генотип*)**
Cerezo-Manchado et al., 2013 [131]	**Доза (мг/седмица)=A+[(-ay2-by+c)×(dz2+ez+f)]+[*VKORC1-1639*GG or *GA* or *AA*]+[*CYP4F2 TT* или *CT* или *CC*] + [*CYP2C9*1*1* или **1*2* или **1*3* или **2*2* или **2*3* или **3*3*] [3]**
Kumar et al., 2013 [129]	***Log* (Доза) (мг/ден) =0.399-0.005*(*възраст в год*) +0.012*(*ИТМ*)-0.171*(при *CYP2C9*2 алел*)-0.072*(при *CYP2C9*3 алел*) -0.144*(при *VKORC1G>A алел*) [4]**
Radu Pop et al., 2013 [126]	***Log* (Доза) (mg/week)=1.402-0.005*(*възраст в год*) +0.009*(*ИТМ*)-0.094*(при *CYP2C9*2 алел*)-0.099*(при *CYP2C9*3 алел*) -0.135*(при *VKORC1-1639GA генотип*).-0.285(при *VKORC1-1639AA генотип*) [5]**
Wolkanin-Bartnik et al., 2013	**Доза (мг/ден)=3.268+1.477*(*VKORC -1639GG*)+0.476*(*VKORC1 -1639GA*) + 0.451*(*CYP2C9*1*1*) - 0.043*(*възраст в год*)+0.0169*(*тегло в кг*)**

[1] VKORC1 генотип 1 за GG, GA за 2, 3 за AA и CYP2C9 генотипове е 1 за CYP2C9 * 1 * 1, 2 за CYP2C9 * 1 * 2, 3 за CYP2C9 * 1 * 3, 4 за CYP2C9 * 2 * 2 и 5 за CYP2C9 * 2 * 3.

[2] CYP индуктори, които са били разглеждани в този анализ са включени фенитоин, карбамазепин и рифампин. VV показва хомозиготни V433V превозвачи; VM, хетерозиготни V433M превозвачи; MM, хомозиготни M433M превозвачи.

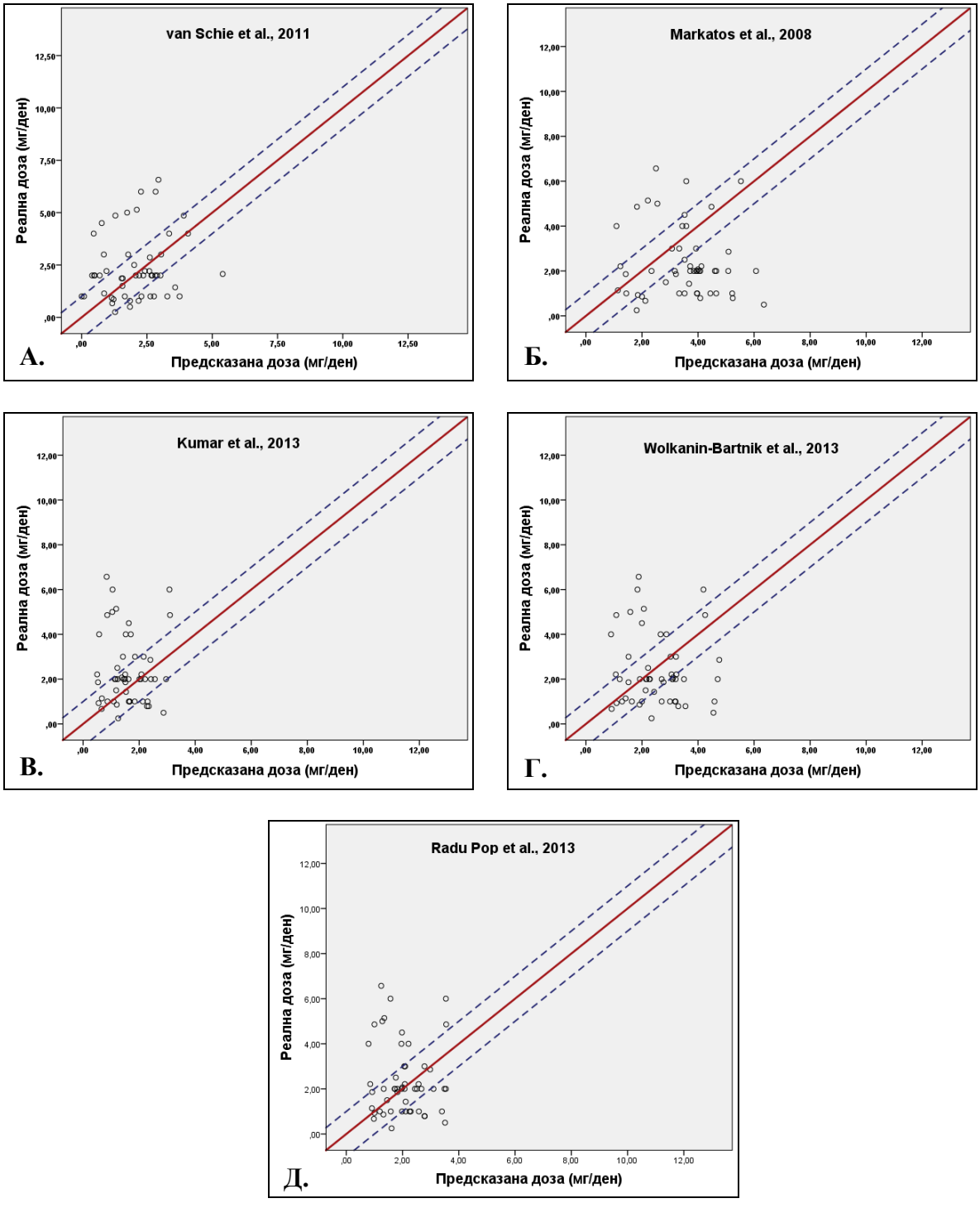
[3] Къде A, a, б, в, г, д, е: константи; Y: възраст в години; Z: квадратен корен (височина в см) × (тегло в кг) / 3600; VKCORC1 GG, VKCORC1 GA, VKCORC1 AA: различни константи за rs2323991 генотип, = 1, ако не е на разположение; CYP4F2 TT, CYP4F2 CT, CYP4F2 CC: различни константи за rs2108622 генотип, = 1, ако не е на разположение; CYP2C9 * 1 * 1, CYP2C9 * 1 * 2, CYP2C9 * 1 * 3, CYP2C9 * 2 * 2, CYP2C9 * 2 * 3, CYP2C9 * 3 * 3: различни константи за rs1799853 и rs1057910 генотипове, = 1, ако не е на разположение. Изходът на този алгоритъм да бъде квадрат за изчисляване седмична доза в мг.

[4] Стойност 0 за GG, един за GA и 2 за AA на VKORC1 (-1639 G> A). Стойност 0, 1, 2 за броя на CYP2C9 * 2 и CYP2C9 * 3 алел.

[5] Поради липсата на носители на хомозиготна вариант алел авторите разделят CYP2C9 варианти в две групи: CYP2C9 * 2 и CYP2C9 * 3. Пациентите, които генотип CYP2C9 * 2 / * 3 са включени в двете групи.

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 Borobia 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.

Диаграмите на разсейване на стойностите на реалната и предсказаната чрез популационно-специфичните математически алгоритми дози аценокумарол са представени на **Фиг. 4. 14.**



Фиг. 4. 14. Диаграми на разсейване на стойностите на реалната и предсказаната чрез математически алгоритъм дози аценокумарол за различни популационно-специфични модели.

Табл. 4. 26. 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	r
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. показа 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 неоходимостта от използването на популационно – срецифични модели за различните етнически групи. При всички модели беше наблюдавана умерена корелация между предсказаните и реалните дози антикоагулант (**Табл. 4.26**).

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

Изследвана е група от 192 пациенти с данни за ИБС, 199 пациенти с прекаран МИ, 300 пациенти с АХ и 496 популационни контроли. 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. Проведеното проучване е одобрено от Етичната комисия на Медицински университет-София, като са спазени всички изисквания за добра медицинска практика и конфиденциалност на получените резултати за всеки отделен пациент.

Всички участници в асоциативното изследване са дали своето писмено съгласие за участие в него. За всички изследвани пациенти са събрани и обработени демографски и клинични данни, включително възраст, пол, тегло, ръст, тютюнопушене, наличието или отсъствие на хиперлипидемия (определено като концентрация на общия холостеро> 5.2 ммол/л или концентрация на триглицериди >3 ммол/л), прием на медикаменти, по-специално използването на липидо-понижаващи сридства, наличието или отсъствието на хипертония (определени като диастолично кръвно налягане >95 mmHg или систолично кръвно налягане >160 mmHg), в присъствието или отсъствието на диабет тип I или диабет тип II, анамнеза за прекаран ИМ, както и наличието или отсъствието на заболяване на коронарните артерии. **Табл. 4.27.** обобщават характеристиките на пациентите с ИБС, МИ и АХ.

Табл. 4.27. 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/м2)	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

Първият етап от нашето проучване включваше подбор на канидат гени и полиморфизми, за които да бъде проведено асоциативно изследване и определяне на връзката им с развитието на ИБС, МИ и АХ. За тази цел бяха подробно проучени голям брой литературни източници от последните пет години, съобщаващи за молекулярно генетични изследвания при интересуващите ни заболявания. Като източник на научните публикации беше използвана базата данни на NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (ключови думи: coronary artery disease, myocardial infarction, arterial hypertension, single nucleotide polymorphism, association study, genome-wide association study, genetics, в различни комбинации) и беше анализирана информацията от няколко десетки източници, публикувани до началото на 2014 год. 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.

След изготвянето на списъка с избраните кандидат полиморфизми, за всеки един от тях беше определен метода за генотипиране. За 21 маркера беше избран методът TaqMan с предварително конструирани, преминали процес на валидизация и поддържани в наличност проби от Applied Biosystems, а останалите 8 полиморфизма бяха анализирани чрез метода на високорезолютивно топене на двойно – верижната ДНК (High Resolution Melting, HRM), с праймери, конструирани по собствен дизайн.

Всички маркери бяха генотипирани в серия от 192 пациенти с данни за ИБС, 199 пациенти с прекаран МИ, 212 пациенти с АХ и 496 популационни контроли, като валиден резултат беше получен за всички от тях.

За провеждане на цялостния геномен скрининг, ДНК пробите, предварително доведени до крайна концентрация 10ng/µl. Получените след скрининга данни бяха подложени на статистически анализ, като за всеки анализиран маркер бяха установени: броя успешно генотипирани индивиди, алелните и генотипни честоти, неговата значимост, изразена чрез стойността P с двустранен точен тест на Фишер за двата модела на унаследяване, както и съотношението на шансовете (OR).

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. 28 - 32**.

4.7.1. Асоциативни изследвания на водещи кандидат - гени и риска от артериална хипертония

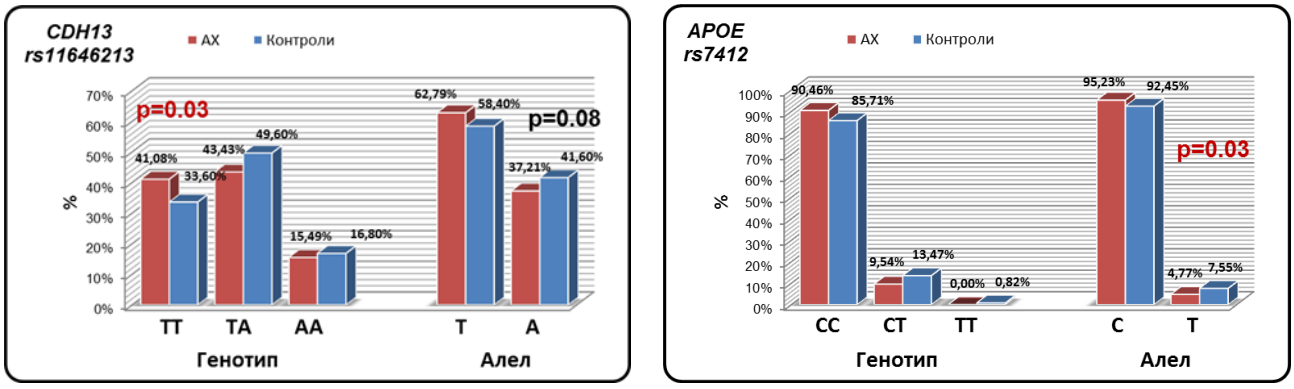
В групата на пациентите с АХ беше извършено асоциативно изследване за 14 полиморфни варианта в 13 кандидат гена и хромозомни локуса, като беше установена положителна асоциация със заболяването при четири от тях (**Табл. 4. 28**).

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”**). Положителните данни за асоциация показват, че става дума за полиморфизми с изключително малък ефект върху риска за развитие на заболяването.

Табл. 4. 28. 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.

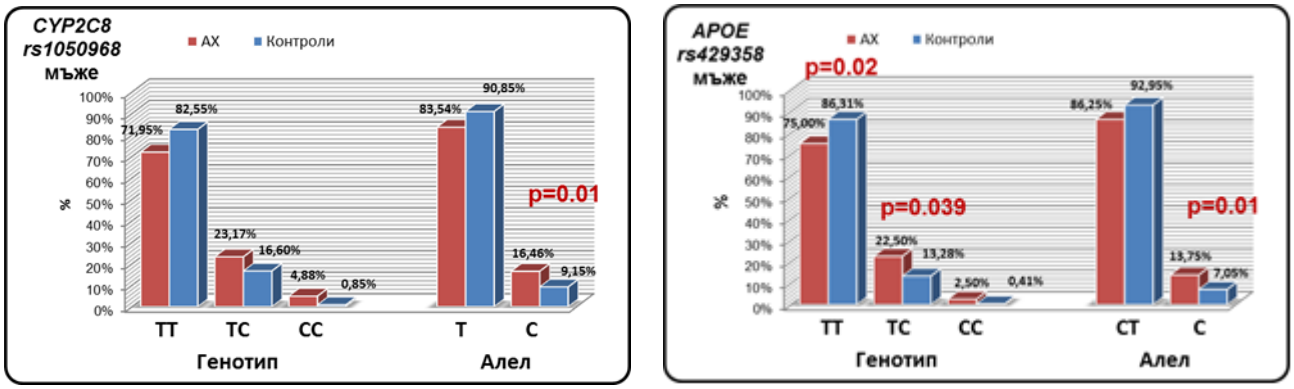
Хр.	Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	АХ N (%)	Контроли N (%)	OR	P
15	***CYP2C8*** rs1050968 T>C	Генотипен	CC	5 (1.55)	6 (1.25)	–	0.56	4 (4.89)	2 (0.85)	–	0.11	1 (0.48)	4 (1.63)	–	0.75
			CT	62 (19.25)	89 (18.54)			19 (23.17)	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	***CDH13*** rs11646213 A>T	Генотипен	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	***APOE*** rs429358 C>T	Генотипен	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	***APOE*** rs7412 C>T	Генотипен	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)		

Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти с АХ и популационните индивиди са представени в **Табл. 8. 2**. в раздел **«Приложения».**



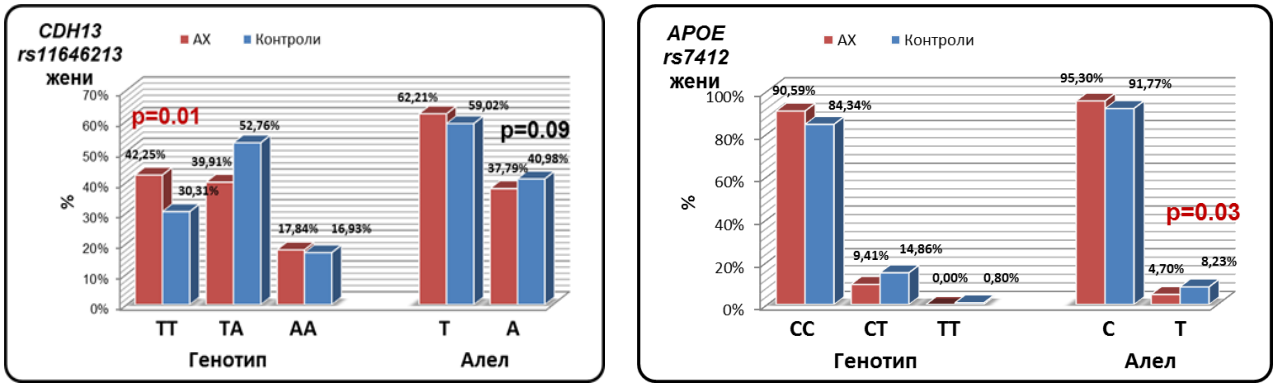
Фиг. 4.15. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с АХ и здрави индивиди.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.



Фиг. 4.16. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с АХ и здрави индивиди от мъжки пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.



Фиг. 4.17. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с АХ и здрави индивиди от женски пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

4.7.2. 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. 29**).

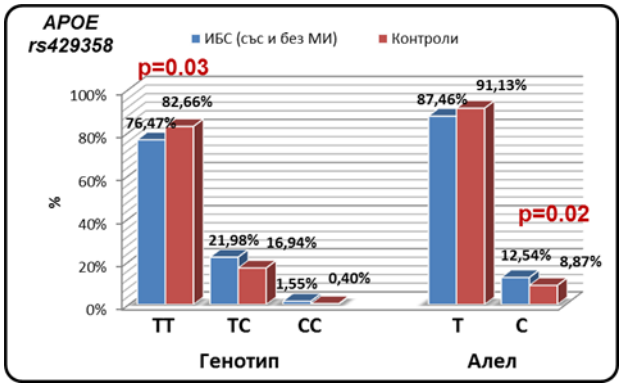
Не беше установена статистически значима разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти в групите на контролите и пациентите с ИБС и/или ИМ по отношение на останалите полиморфни варианти (**Табл. 8. 3 в раздел „Приложения”**). Вероятно това също се дължи на слабия ефект, който оказват подбраните полиморфизми по отношение на изучаваното заболяване, както и на недостатъчно голямата по обем извадка от пациенти и здрави индивиди с български произход. За потвърждаване на получените положителни асоциации е необходимо увеличаване на броя пациенти и контроли в двете изследвани групи, а също така и валидирането на тези асоциации в независима извадка .

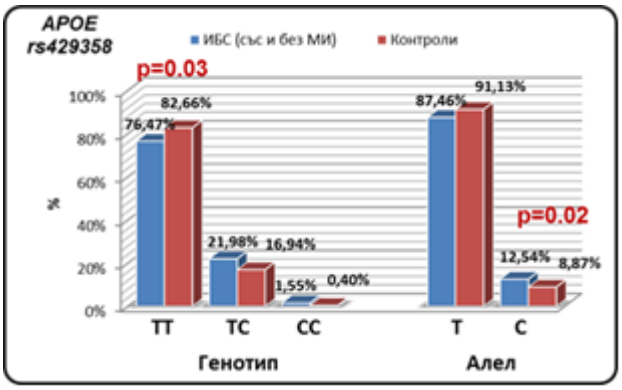
Табл. 4. 29. Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с ИБС (със или без прекаран миокарден инфаркт) и популационната група от индивиди с български произход. Показани са само статистически значимите асоциации с ниво на значимост p< 0.05.

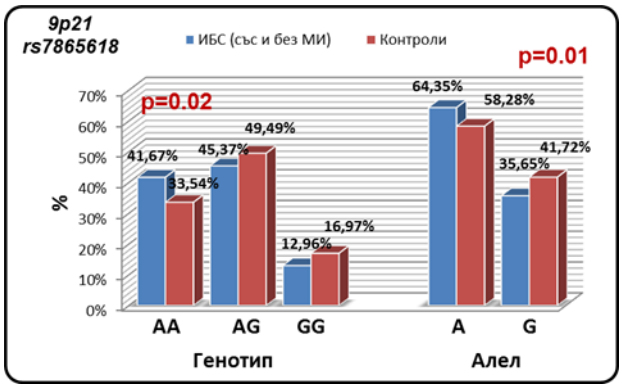
Хр.	Ген/ вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИБС (с и без ИМ) N (%)	Контроли N (%)	OR	P
1	***CYP2J2*** rs890293 C>A	Генотипен	AA	5 (1.97)	2 (0.43)	–	0.09	4 (2.67)	0 (0)	–	0.05	1 (0.96)	2 (0.84)	–	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 (0.97-2.25)	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)		
16	***CDH13*** rs11646213 A>T	Генотипен	TT	53 (16.51)	83 (16.80)	–	0.96	33 (13.10)	40 (16.67)	–	0.30	20 (17.24)	43 (16.93)	–	0.08
			TA	157 (48.91)	245 (49.59)			109 (53.17)	111 (46.25)			48 (41.38)	134 (52.76)		
			AA	111 (34.58)	166 (33.60)			63 (30.73)	89 (31.08)			48 (41.38)	77 (30.32)		
		Алелен	T	263 (40.97)	411 (41.60)	0.97 (0.80-1.19)	0.81	175 (42.68)	191 (39.79)	1.13 (0.86-1.47)	0.41	88 (37.93)	220 43.31)	0.80 (0.58-1.10)	0.17
			A	379 (59.03)	577 (58.40)			235 57.32()	289 (60.21)			144 (62.07)	288 56.69)		
19	***APOE*** rs429358 C>T	Генотипен	CC	5 (1.55)	2 (0.40)	–	0.13	2 (097)	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)		

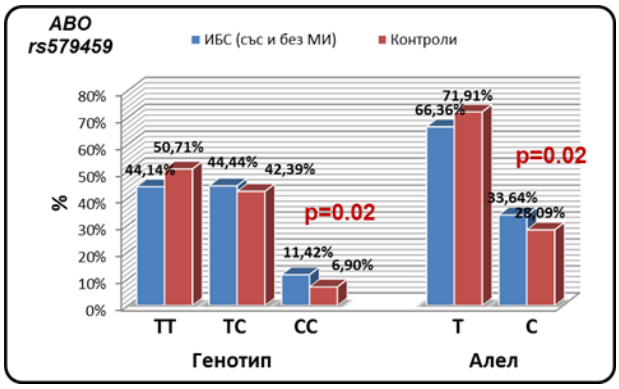
20	***GNAS, EDN3*** rs6015450 G>A	Генотипен	GG	5 (1.54)	9 (1.82)	–	0.21	3 1.45()	7 (2.93)	–	0.01	2 (1.71)	2 (0.78)	–	0.43
			GA	49 (15.12)	98 (19.84)			25 (12.08)	52 (21.76)			24 (20.51)	46 (18.04)		
			AA	270 (83.33)	387 (78.34)			179 (86.47)	180 (75.31)			91 (77.78)	207 (81.18)		
		Алелен	G	59 (9.11)	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)		

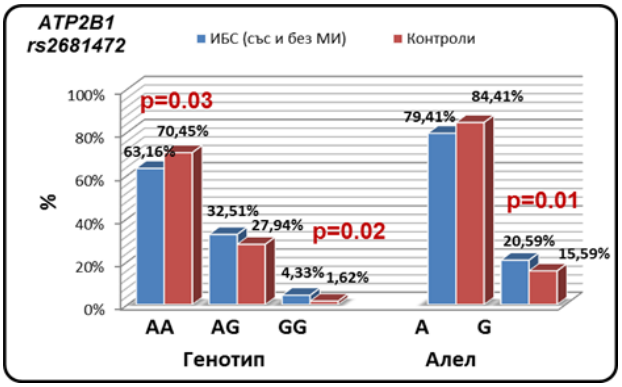
Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти с ИБС (със или без прекаран миокарден инфаркт) и популационните индивиди са представени в **Табл. 8. 3**. в раздел **«Приложения».**





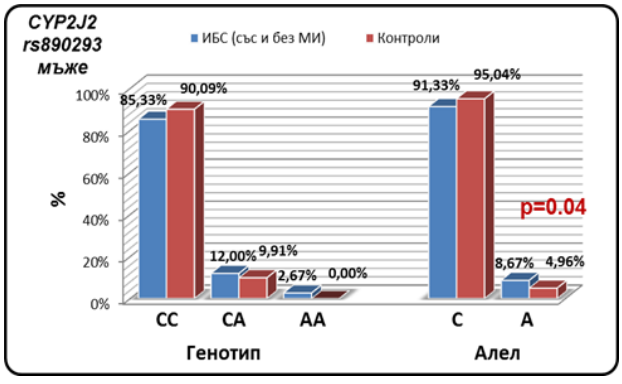


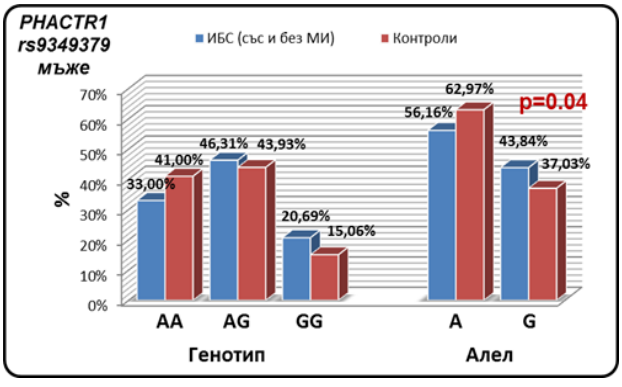


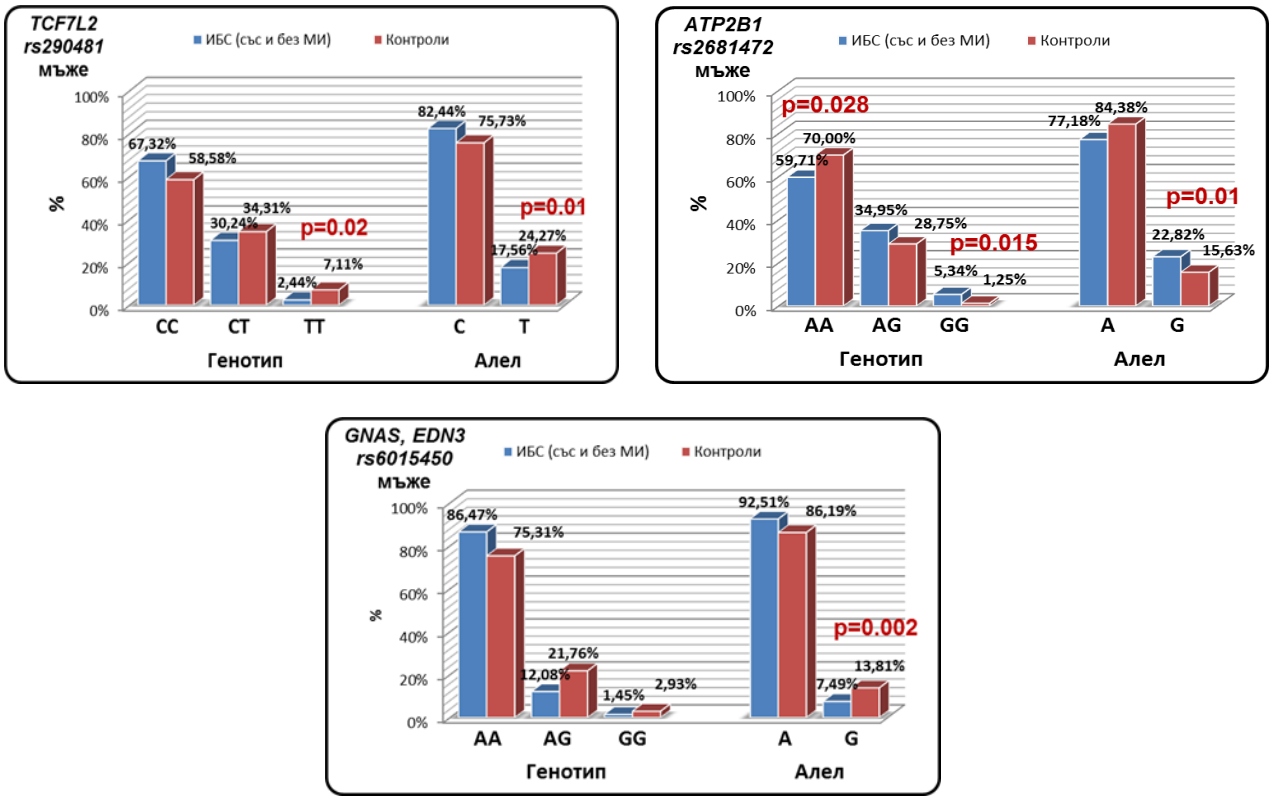


Фиг. 4.18. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с ИБС (със и без прекаран миокарден инфаркт) и здрави индивиди.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.







Фиг. 4.19. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с ИБС (със и без прекаран миокарден инфаркт) и здрави индивиди от мъжки пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

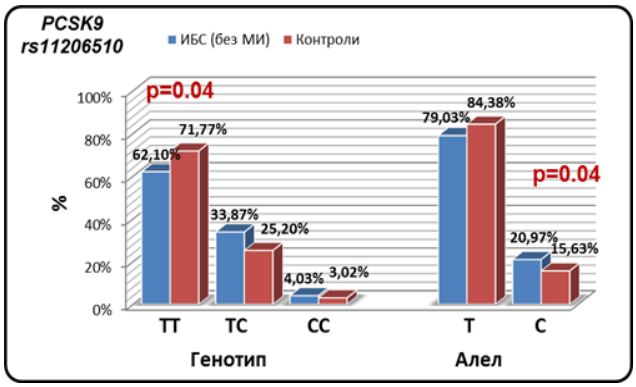
В групата на пациентите само с ИБС без данни за прекаран МИ беше извършено асоциативно изследване за 29 полиморфни варианта в 19 кандидат гена и хромозомни локуса, като беше установена положителна асоциация със заболяването при шест от тях (**Табл. 4. 30**).

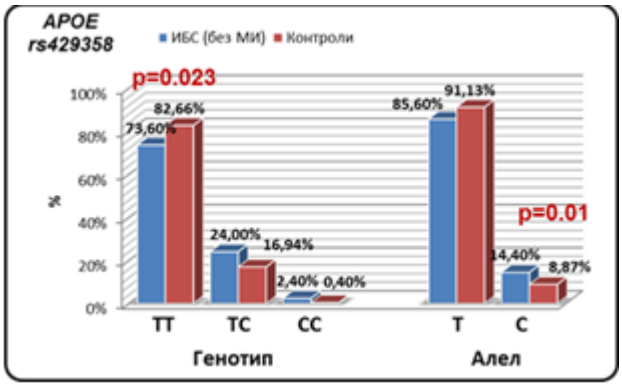
Не беше установена статистически значима разлика при сравнение на генотипните и алелните честоти в групите на контролите и пациентите с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) по отношение на останалите полиморфни варианти (**Табл. 7. 4 в раздел „Приложение”**).

Табл. 4. 30. 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	***PCSK9*** rs11206510 C>T	Генотипен	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	***CYP2J2*** rs890283 C>A	Генотипен	AA	3 (2.86)	2 (0.42)	-	0.36	3 (3.61)	0 (0)	-	0.04	0 (0)	2 (084)	-	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	***ABO*** rs579459 C>T	Генотипен	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	***TCF7L2*** rs290481 C>T	Генотипен	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	***APOE*** rs429358 C>T	Генотипен	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 (9113)			134 (73.63)	448 (92.95)			80 (81.63)	456 (89.41)		
20	***GNAS, EDN3*** rs6015450 G>A	Генотипен	GG	1 (0.8)	9 (1.82)	-		0 (0)	7 (2.93)	-		1 (2.05)	2 (0.78)	-	
			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)		

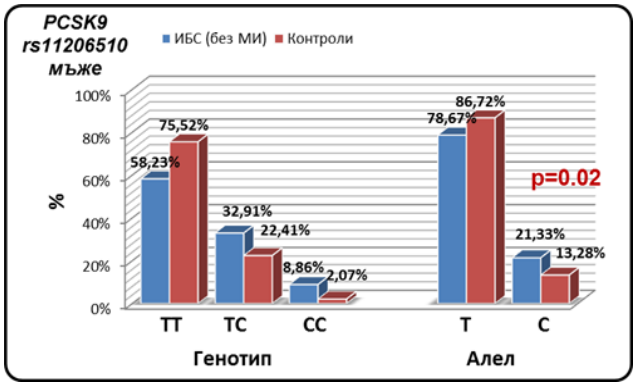
Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и популационните индивиди са представени в **Табл. 8. 4**. в раздел **«Приложения».**

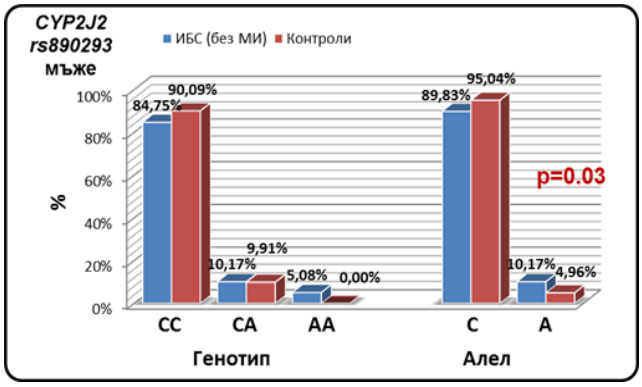


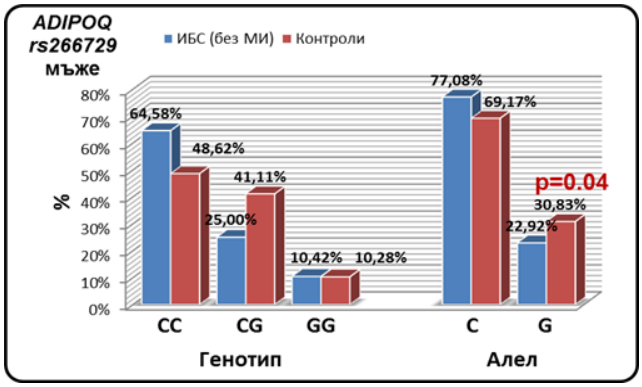


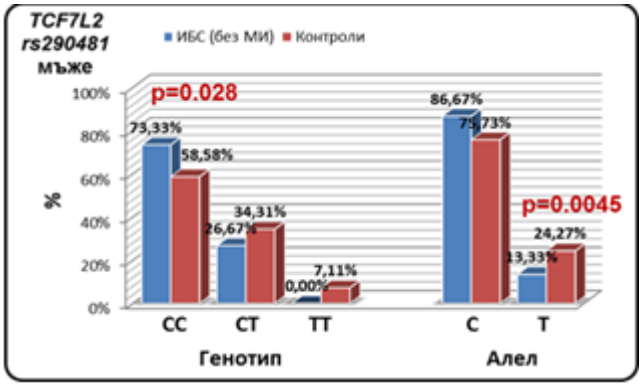
Фиг. 4.21. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и здрави индивиди.

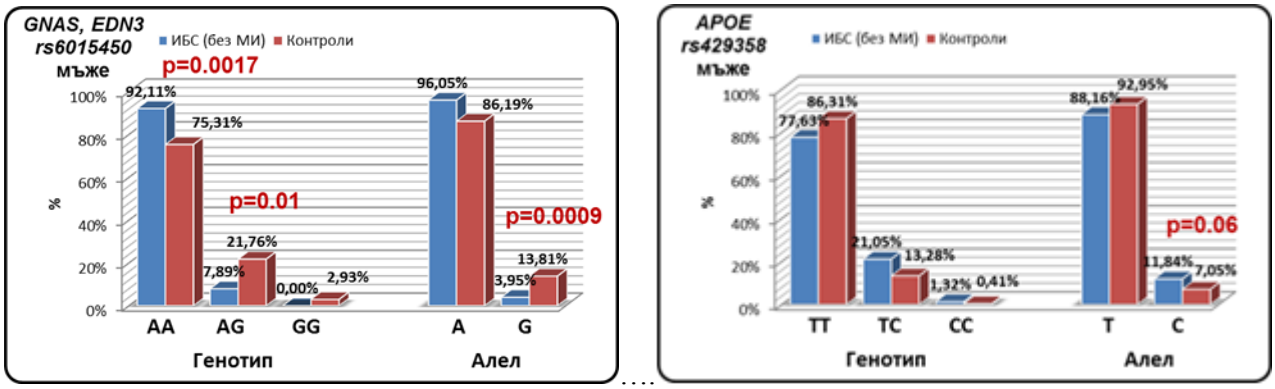
Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.





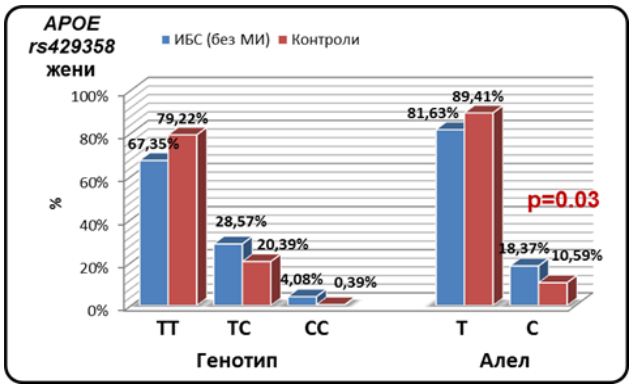






Фиг. 4.22. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и здрави индивиди от мъжки пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.



Фиг. 4.23. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и здрави индивиди от женски пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

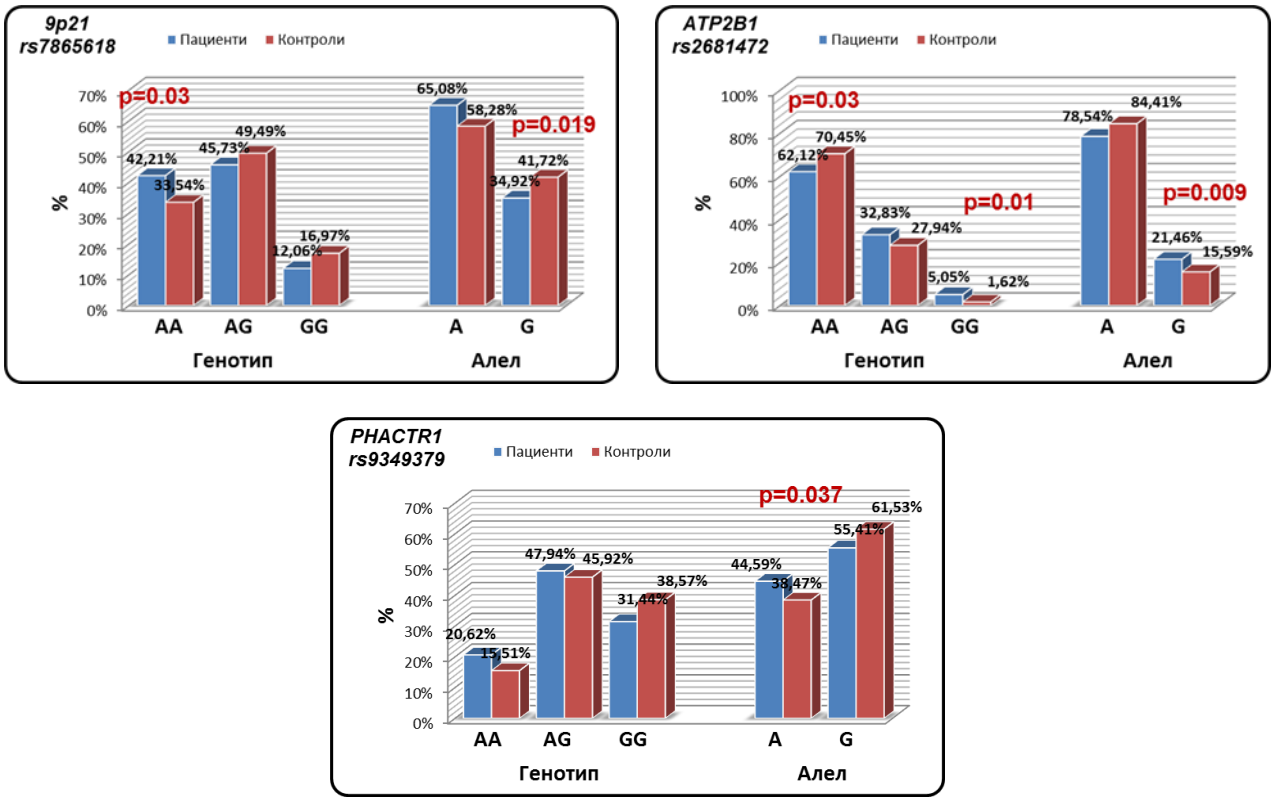
В групата на пациентите само с прекаран МИ беше извършено асоциативно изследване за 29 полиморфни варианта в 19 кандидат гена и хромозомни локуса, като беше установена положителна асоциация със заболяването при седем от тях (**Табл. 4. 31**).

Не беше установена статистически значима разлика при сравнение на генотипните и алелните честоти в групите на контролите и пациентите с МИ по отношение на останалите полиморфни варианти (**Табл. 7. 5 в раздел „Приложение”**).

Табл. 4. 31. 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.

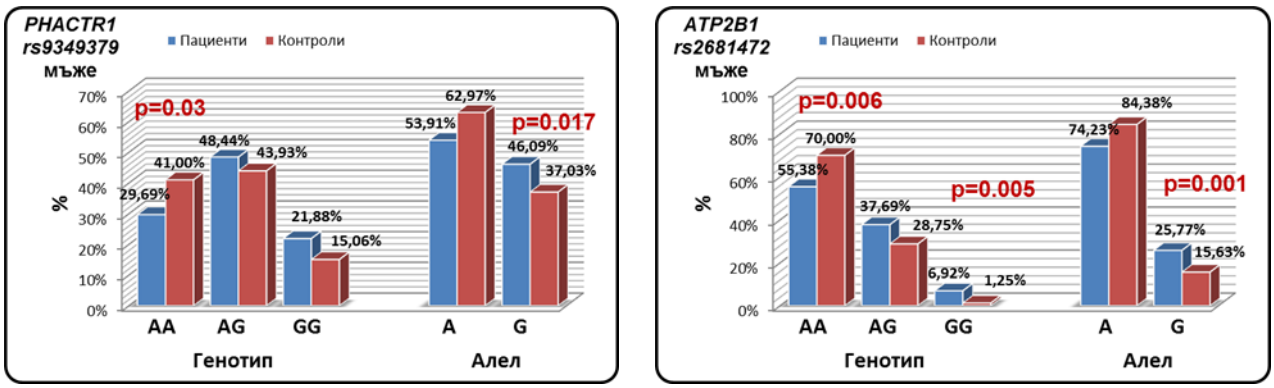
Хр.	Ген/ вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P	ИМ N (%)	Контроли N (%)	OR	P
6	***PHACTR1*** rs9349379 A>G	Генотипен	GG	40 (20.62)	76 (15.51)	–	0.12	28 (21.88)	36 (15.06)	–	0.07	12 (18.18)	40 (15.93)	–	0.91
			GA	93 (47.94)	225 (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	***9p21*** 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 (3492)	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 (6508)	577 (58.28)			170 (64.89)	286 (59.58)			89 (47.85)	291 (57.06)		
9	***9p21*** 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	***ATP2B1*** 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	***FTO*** 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 (4506)	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	***CDH13*** 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	***APOE*** 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)		

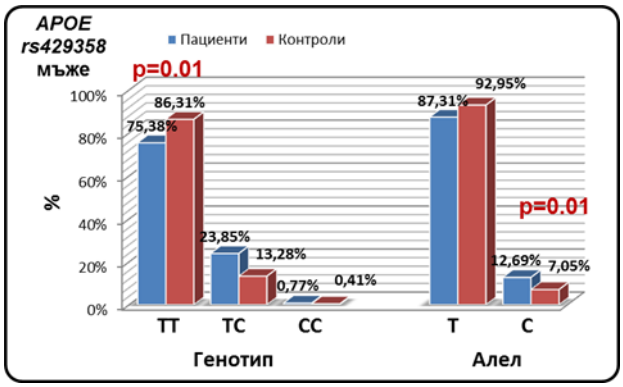
Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти с прекаран миокарден инфаркт и популационните индивиди са представени в **Табл. 8. 5**. в раздел **«Приложения».**



Фиг. 4.24. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с прекаран миокарден инфаркт и здрави индивиди.

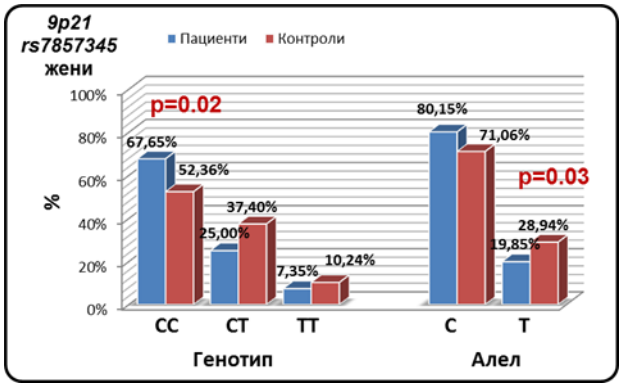
Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

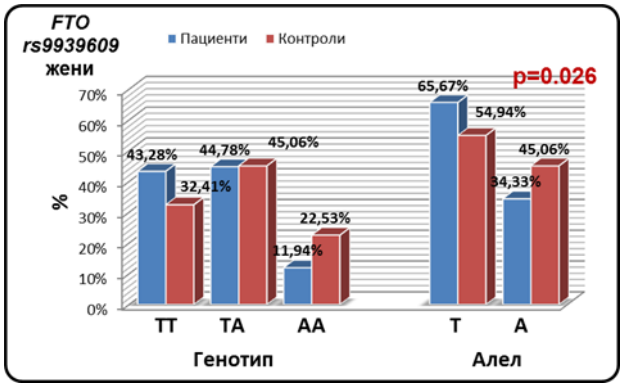


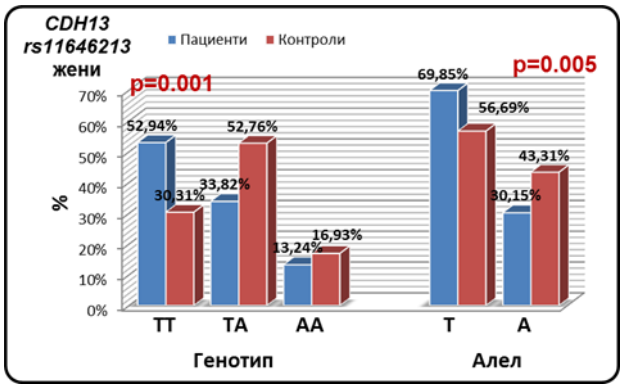


Фиг. 4.25. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с прекаран миокарден инфаркт и здрави индивиди от мъжки пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.







Фиг. 4.26. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти с прекаран миокарден инфаркт и здрави индивиди от женски пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

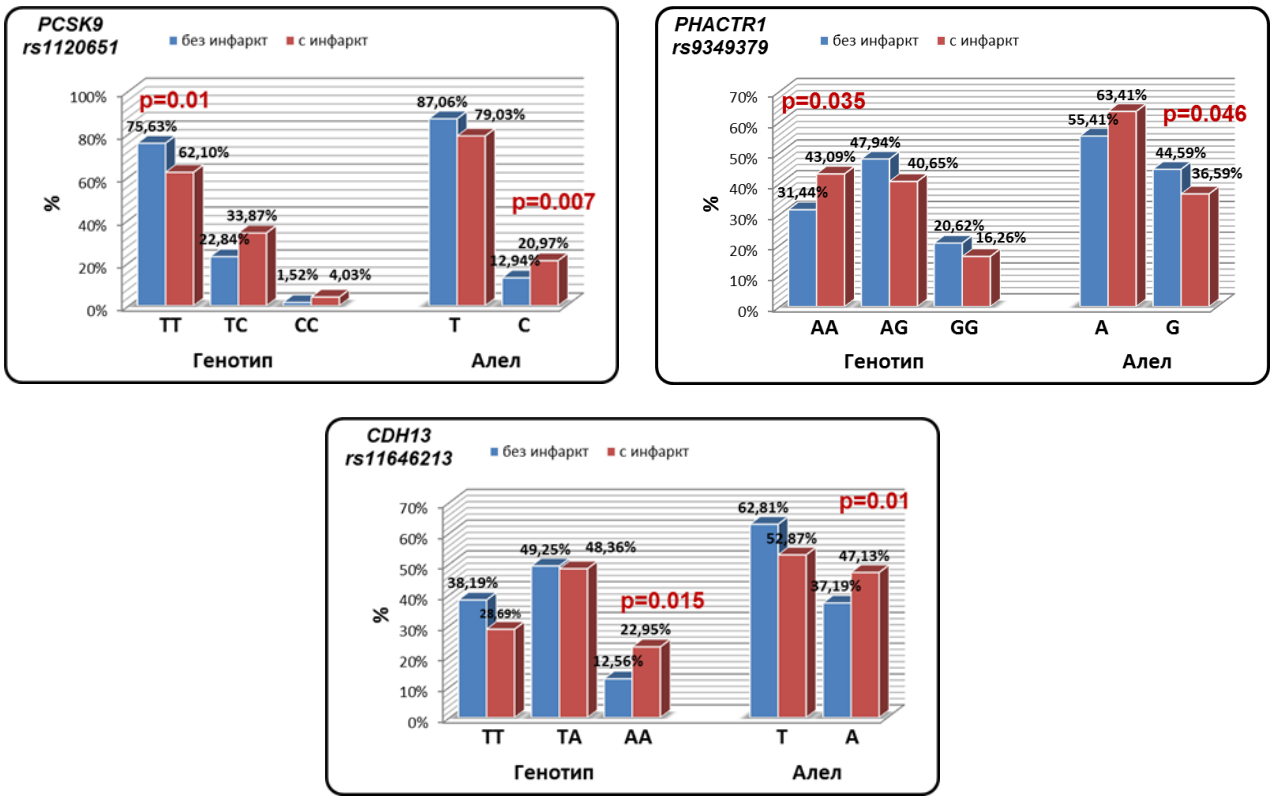
При сравнение на алелните и генотипни честоти между групите пациенти с ИБС с МИ и с ИБС без МИ на 29 полиморфни варианта в 19 кандидат гена и хромозомни локуса беше установена положителна асоциация с риска за развитие на миокарден инфаркт на фона на вече доказана исхемична болест при шест от тях (**Табл. 4. 32**).

Не беше установена статистически значима разлика при сравнение на генотипните и алелните честоти в двете изследвани групи по отношение на останалите полиморфни варианти (**Табл. 7. 6 в раздел „Приложение”**).

Табл. 4. 32. Разликики 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.

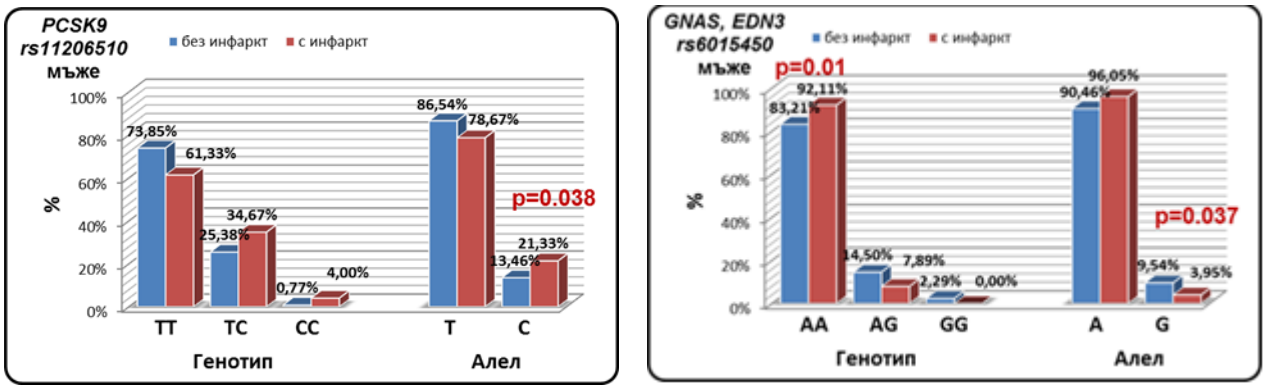
Хр.	Вариант	Модел	Алел/ генотип	Общо				Мъже				Жени			
				ИБС N (%)	ИМ N (%)	OR	P	ИБС N (%)	ИМ	OR	P	ИБС N (%)	ИМ N (%)	OR	P
1	***PCSK9*** rs11206510 C>T	Генотипен	CC	3 (1.52)	5 (4.03)	-	0.01	1 (0.76)	3 (4.00)	-	0.08	2 (2.89)	2 (4.08)	-	0.21
			CT	45 (22.84)	42 (33.87)			33 (25.39)	26 (34.67)			12 (17.39)	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	***IRS1*** 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	***PHACTR1*** 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	***CDH13*** 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	***APOE*** 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	***GNAS, EDN3*** 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)		

Пълният списък на разпределението на алелните и генотипни честоти за всички изследвани полиморфизми в групите пациенти с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и ИБС (със прекаран миокарден инфаркт) са представени в **Табл. 8. 6**. в раздел **«Приложения».**



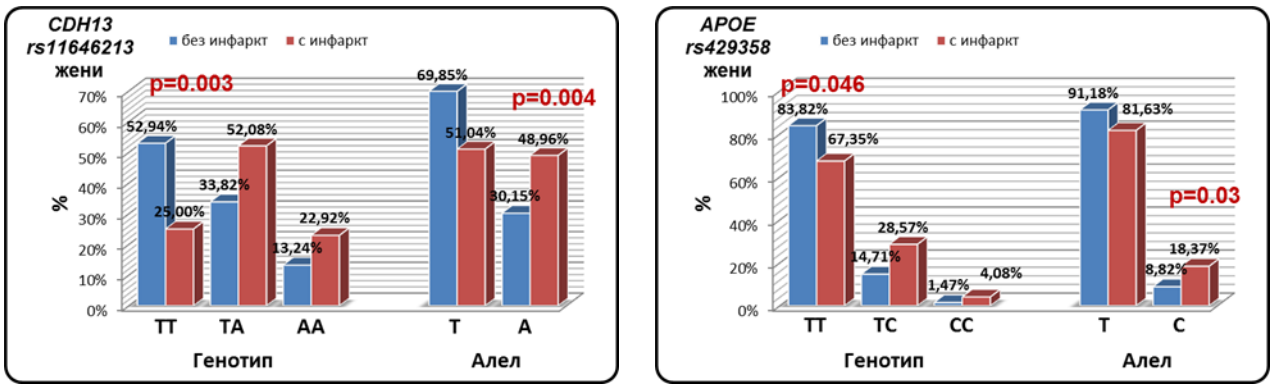
Фиг. 4.27. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти със и без прекаран миокарден инфаркт.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.



Фиг. 4.28. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти със и без прекаран миокарден инфаркт от мъжки пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.



Фиг. 4.29. Графично представяне на разпределението на алелните и генотипни честоти за изследваните полиморфни варианти в групите пациенти със и без прекаран миокарден инфаркт от женски пол.

Представени са само вариантите с установена статистически значима връзка със заболяването.

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

Табл. 4. 33. 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^2	P стойност
APOE	rs429358	9.20	0.01
CYP2J2	rs890283	9.98	0.0067
9p21	rs7865618	15.48	0.0004
9p21	rs7857345	12.02	0.002
9p21	rs2383206	8.27	0.004
TCF7L2	rs290481	11.37	0.003
CDH13	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.

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

Епистазата е взаимодействие между алелите на два гена, водещо до промяна във фенотипната им изява. При взаимодействие ефектът на участващите в епистазата варианти може да се увеличи, да се намали, или да съответства на самостоятелното им влияние. Наличието на епистаза се изследва чрез различни методи, един от които е регресионен анализ, в който генетичните варианти са независими променливи. В настоящото изследване е използвана логистична регресия за прогнозиране наличието или отсъствието на риск от АР в зависимост от набор/комбинация от променливи.

Епистатичното взаимодействие представлява взаимодействие между алелите на различни гени, при което алелът на един ген (епистатичен) потиска проявата на алела на друг ген (хипостатичен). Епистазата се проявява на всички стадии на развитие. Ген, който потиска синтезата на определен белтък или ензим, е епистатичен по отношение на ген, който модифицира тези вещества или проявява своята активност в тяхно присъствие. В популационната генетика терминът "епистаза" се използва в по - широк смисъл за всички неалелни взаимодействия между гени от различни локуси. 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 мултифакторната дименсионална редукция.

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 множесвената 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. 34.**

Табл. 4. 34. Епистатични взаимодействия (статистическа епистаза) 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 на взаимодействие	t	P стойност	P по Бонферони
ИБС									
5	***NPR3, C5orf23***	rs1173771	6	***PHACTR1***	rs9349379	2.339	15.16	0.0001	0.0029
ИБС (жени)									
5	***NPR3, C5orf23***	rs1173771	6	***PHACTR1***	rs9349379	3.11	10.32	0.0013	0.037
ИМ / ИБС (мъже)									
9	***9p21***	rs10757274	10	***MBL2***	rs1800450	2.258	7.464	0.006	0.017
ИМ / ИБС (жени)									
6	***MTHFD1L***	rs6922269	16	***FTO***	rs9939609	0.4752	7.642	0.006	0.017
ИМ									
1	***IL6R***	rs2229238	3	***ADIPOQ***	rs1501299	1.974	10.42	0.001	0.029

4.7.4. Анализ на влиянието на изследваните полиморфни варианти върху стойностите на систолично и диастолично артериално налягане и нивата на липиди

В следващата таблица 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. 35. 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	β регресионен коефициент	SE	R^2	P	Коригирано P по Бонферони
Общ холестерол								
Общо								
16	***CDH13***	rs11646213	82642651	-0.16	0.07	1.03%	0.03	0.87
1	***PCSK9***	rs11206510	55496039	-0.23	0.10	1.01%	0.03	0.87
Мъже								
7	***eNOS3***	rs3918226	150690176	-0.41	0.20	2.12%	0.04	1
Жени								
16	***CDH13***	rs11646213	82642651	-0.25	0.09	2.80%	0.0068	0.19
9	***ABO***	rs579459	136154168	0.23	0.11	1.72%	0.03	0.87
9	***9p21***	rs10757274	22096056	0.26	0.12	2.83%	0.04	1
Триглицериди								
Общо								
9	***9p21***	rs2383206	22115027	-0.21	0.07	3.15%	0.003	0.087
16	***CDH13***	rs11646213	82642651	-0.20	0.09	1.01%	0.03	0.87
Мъже								
9	***9p21***	rs2383206	22115027	-0.23	**0.11**	3.22%	0.04	1
Жени								
1	***CYP2J2***	rs890283	60392494	0.41	0.16	3.00%	0.01	0.29
9	***9p21***	rs2383206	22115027	-0.18	0.08	3.47%	0.02	0.58
HDL								
Мъже								
15	***CYP2C8***	rs1050968	28018434	0.63	0.28	3.01%	0.02	0.58
3	***ADIPOQ***	rs266729	186841685	0.08	0.04	3.01%	0.04	1
LDL								
Общо								
9	***9p21***	rs2383206	22115027	-0.34	0.11	3.33%	0.002	0.058
19	***APOE***	rs7412	44908822	-0.53	0.23	1.16%	0.02	0.58
Мъже								
15	***CYP2C8***	rs1050968	28018434	0.68	0.23	4.89%	0.0032	0.09
9	***9p21***	rs2383206	22115027	-0.43	0.16	5.00%	0.01	0.29
9	***9p21***	rs10757274	22096056	-0.40	0.16	4.06%	0.02	0.58
Диастолично артериално налягане (ДАН)								
Жени								
5	***NPR3, C5orf23***	rs1173771	32815028	-4.50	1.98	3.02%	0.0019	0.055
Систолично артериално налягане (САН)								
Общо								
5	***NPR3, C5orf23***	rs1173771	32815028	-2.61	1.02	2.54%	0.01	0,29
16	***CDH13***	rs11646213	82642651	2.49	1.05	2.21%	0.02	0,58
10	***TCF7L2***	rs7903146	112998590	-6.19	2.91	12.41%	0.04	1
Жени								
5	**NPR3, C5orf23**	rs1173771	32815028	-4.00	1.27	5.67%	0.0019	0.055
16	***CDH13***	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.

Нека дадем следния пример: Полиморфен вариант rs11646213, локализиран в позиция 82642651 на геномната ДНК в гена ***CDH13*** показва гранична статистическа значимост за асоциация с нивата на САН при жени. Носителството на този полиморфен вариант води до повишаване на нивата на систоличното налягане с 2.56 единици, като въпросния маркер е отговорен за по-малко от 2.42% от вариабилността на този клиничен показател.

Потвърждава се наличието на асоциация между полиморфни варианти в гените *CDH13*, и *TCL7F2* и стойностите на ДАН, както и на полиморфния вариант в близост до *NPR3* и стойностите на САН и ДАН.

Независимо, че към настоящия момент полиморфните варианти в локус 9p21 не се свързват с нивата на конвенциалните рискови фактори като стойности на АН и нива на липиди, в нашето проучване беше установена положителна асоциация между rs2383206 и понижени нива на триглицериди и LDL холестерол. Противоположен ефект има rs10757274 върху нивата на общия холестерол.

Устанновена е асоциация между полиморфния вариант rs11646213 в гена *CDH13* и нивата на общия холестерол и е потвърдена връзката между полиморфизма rs11206510 в *PCSK9* и понижените стойности на същия показател.

Носителството на полиморфен алел за rs7412 в гена *APOE* води до понижаване на нивата на LDL с 0.53 ммол/л в общата група, докато при мъже rs1050968 в *CYP2C8* има противоположен ефект и повишава LDL с 0.68 ммол/л.

Носителството на полиморфен вариант в гена *eNOS3* определя 2.12% от вариабилността във нивата на общия холестерол при мъже, докато вариантът в гена *ABO* води до повишаване на общия холестерол с 0.23 ммол/л при жени.

Носителството на полиморфен алел за rs1050968 в гена *CYP2C8* и такъв за rs266729 в гена *ADIPOQ* определя 3.01% всеки от вариабилността в нивата на HDL при мъже.

След корекция за множествени тествания за 29 маркера наблюдаваните статистически значими асоциации се губят. Това би могло да се дължи както на относително слабия ефект на изследваните варианти по отношение на стойностите на клиничните показатели, така и на малката група пациенти, включени в изследването.

4.7.5. Анализ на епистатичните взаимодействия (статистическа епистаза) 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. 36. – 4. 37.**

Табл 4. 36. Резултати от анализа за статистическа епистаза по отношение на нивата на триглицериди в кръвта при жени.

Хромозома	Ген	Вариант	Хромозома	Ген	Вариант	β коефициент на взаимодействие	F	P	P Bonferroni
Триглицериди (жени)									
1	***CYP2J2***	rs890283	6	***MTHFD1L***	rs6922269	-0.742	9.806	0.0017	0.049
5	***NPR3. C5orf23***	rs1173771	20	***GNAS. EDN3***	rs6015450	1.407	17.58	0.00001	0.0003

Табл 4. 37. Резултати от анализа за статистическа епистаза по отношение на стойностите на САН при жени.

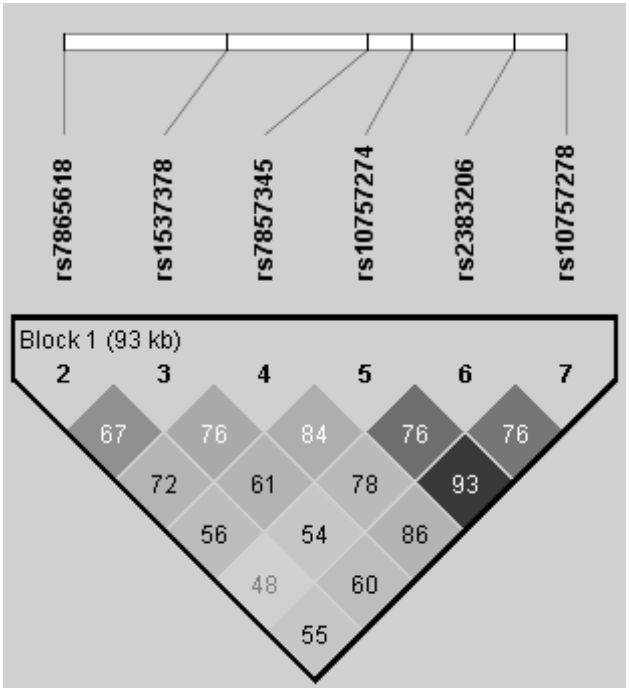
Хромозома	Ген	Вариант	Хромозома	Ген	Вариант	β коефициент на взаимодействие	F	P стойност	P Bonferroni
Систоличното артериално налягане (жени)									
1	***CYP2J2***	rs890283	7	***eNOS***	rs3918226	22.75	12	0.0005	0.01

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

Под понятието „хаплотип“ се има предвид набор от алели, разположени върху едната хроматида от дадена двойка хромозоми, които се унаследяват свързано без между тях да протича рекомбинация. Смята се, че идентифицирането на няколко алела от даден хаплотип, може да идентифицира недвусмислено всички други полиморфни места в съответния регион.

Отклонението на наблюдаваната алелна честота за даден хаплотип от очакваната се означава като неравновесна скаченост и обикновено се означава с D’. Двата алела се намират в неравновесна скаченост при D ≠ 0. Обратно, при липса на такава D’ = 0. При стойности на D '= 1 или D' = -1 означава, че няма доказателства за рекомбинация между двата локуса. Ако алелни честоти за двата маркера са подобни, то високата стойност на D‘означава, че те са скачени един с друг и между тях не се осъществява рекомбинационно събитие.

Използвахме данните от генотипирането на 6-те представителни полиморфизма и програмата HaploView (v.4.0), за да установим степента на неравновесна скаченост (LD) между изследваните маркери в локус 9p21 за нашата популация и да проследим структурата на LD в този район. Както се вижда на **Фиг. 4. 34**., анализираните 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. 30. 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. 38.**

Табл. 4. 38. Анализ за асоциация на най - често срещаните хаплотипи в българската популация с риска за развитие на ИБС и миокарден инфаркт.

Хаплотип						**ИБС (със и без МИ)**		**ИБС**		**МИ**		**МИ vs ИБС**	
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. 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 артериално хипертония (ПАХ) са с най-голям дял и значение [229]. 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.

Етиологията и патогенезата на ТЕ, ИБС, ПАХ и захарен диабен Тип II са много сходни и съществуват патофизиологични механизми, които са причина за развитие и на четирите заболявания. Идентифицирането на генетичните фактори с рисков или протективен ефект по отношение на тези усложнения е необходимо за изясняване на тяхната патогенеза и подобряване на лечението им.

Артериалната хипертония представлява основен рисков фактор за развитие на атеросклероза. В патогенетично отношение АХ е причина за промени в артериалния ендотел, който е предпоставка за развитие на атероми. Взаимовръзката между АХ и ИБС е доста сложна и значима. С нарастване на артериалното налягане, рискът от сърдечно-съдов инцидент силно нараства. Това зависи за двата пола и за всички възрасти [230, 231].

От своя страна диабетът представлява значим и независим рисков фактор. Наличието на диабет води до повишаване на атерогенния, коронарния и цереброваскуларния риск. При Фрамингамското проучване се установява, че при жените с диабет рискът за развитие на миокарден инфаркт, ангина пекторис и исхемичен инсулт се удвоява. Относителният риск при мъжете диабетици е по-нисък от този при жените, но е значимо по-висок отколкото при недиабетици При изследвания, проведени при здрави доброволци е установено, че при ниво на глюкозата над 95 mg/dl смъртността от ИБС се удвоява. Висок относителен риск за ИБС е установен при умерено високи и високи нива на глюкоза [231].

Диабетът, АХ, затлъстяването и хипертриглицеридемията имат синергичен ефект и стимулират атерогенезата. Това дава основание на N. Kaplan 1995 да назове тези четири компонента на метаболитния синдром „смъртоносен квартет". ИБС се отнася към многофакторните заболявания с наследствено предразположение като за нея е характерно участието на голям брой гени при въздействие на неблагоприятни външни фактори [231].

През последните няколко години чрез асоциативни изследвания на целия човешки геном са идентифицирани 62 генетични варианта, свързани с промяна в стойностите на систоличното и диастолично артериално налягане (САН и ДАН) и ПАХ като цяло, с ниво на значимост ($p < 5 \times 10^{-8}$) [232] и 50 варианта, показващи връзка с повишен или понижен риск за ИБС и тромбоза [233]. Би могло да се предположи, че ако артериалната хипертония е рисков фактор за развитие на коронарно заболяване, въпросните варианти следва да водят и до повишен риск за исхемични усложнения и миокарден инфаркт [234].

5.1.1. CYP2J2 / CYP2C8

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 [235, 236]. Епоксигеназите от групата на цитохром Р450 са важни ензими, метаболизиращи арахидонова киселина до ЕЕТКи, за които е установено, че имат съществена роля в етиологията и патогенезата на сърдечно-съдови заболявания. Идентифицирани са множество единични нуклеотидни полиморфизми в гените *CYP2C8* и *CYP2J2*, но най-изследвани във връзка със ССЗ са *CYP2C8*3* и *CYP2J2*7*.

Установено е, че ЕЕТКи играят централна роля в регулацията на бъбречния електролитен транспорт и съдовия тонус [13]. Експресията на CYP2C8 е главно в черния дроб, бъбреците, мозъка, матката, яйчниците и дванадесетопръстника [14]. За CYP2J2 човешкият ген е доказано, че експресията е конститутивно силно изразена в сърцето, сърдечни миоцити, васкуларни тъкани, бъбреците, черния дроб и ендотелни клетки, покриващи малки и големи коронарните артерии [15]. Множество генетични полиморфизми в *CYP2J2* и *CYP2C8* гени са били открити наскоро [16]. 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. За разлика от други проучвания, ние не успяхме да потвърдим връзката между носителството на полиморфен вариант -50T в гена *CYP2J2* и риска за развитие на АХ при българи [237-239]. От друга страна, 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 й повишаване, което се наблюдава след менопауза, дава основание да се предположи, че женските полови хормони имат защитно действие и предотвратяват развитието на ССЗ [240, 241]. Ендогенните и екзогенни естрогени претърпяват оксидативен метаболизъм чрез чернодробните микрозомални цитохром Р450 ензими. Няколко изоформи на тези цитохроми включително CYP2C8 са показани да катализират хидроксилирането на естрадиол до 2-хидроксиестрадиол и/или 4-хидроксиестрадиол [242]. Една от съществуващите хипотези е, че естрогенът проявява защитни ефекти по отношение на възпалението на сърдечно-съдовата система, посредством стимулиране на CYP2C8-медиирано метаболизиране на арахидоновата киселина до ЕЕТК. Вероятно естрогените действат като агонист на CYP2C8-медиираните противовъзпалителни пътища.

Изследването на Renaud et al. установява, че ензимите от семейството CYP2C имат по-висока експресия при жени, отколкото при мъже [243], вероятно поради влиянието на естрогените. В друго проучване средните нива на експресия на CYP2C8 са определени като малко по-високи при жените (34.3 ± 17.7), в сравнение с мъжете (27.7 ± 17.4, p = 0.18) [244]. 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 [238]. 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. [238]. При някои други изследвания също са идентифицирани гени с половосвързан ефект по отношение на чувствителността към ПАХ [245, 246]. Въпреки това към момента няма проучвания с резултати, подобни на получените от нас относно *CYP2C8*3* и повишения риск за хипертония при мъже.

Идентификацията на естроген-зависими гени е от голям интерес в научната общност, тъй като това ще допринесе значително за разбирането на физиологичното значение на женските полови хормони. Съществуват предположения, че естрогените могат да регулират гени, свързани с вродения имунен отговор, като тези кодиращи хемокини и цитокини, отговорни за активирането на левкоцитите [240].

5.1.2. APOE

В настоящото изследване установихме, че полиморфните варианти в *APOE* показват връзка както с артериалната хипертония, така и с ИБС и МИ.

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 [152]. Алелите произвеждат три изоформи на аполипопротеина - Е2, Е3 и Е4, които се различават по аминокиселините в позиции 112 и 158. Изоформата АроЕ3 съдържа цистеин в 112 и аргинин в 158 позиция. Изоформата АроЕ2 има цистеин в двете позиции, докато АроЕ4 - аргинин на двете места [153].

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 АроЕ 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 [154, 247-257].

Генетичният анализ при мъже на средна възраст от девет популации предвижда ~ 40 % повишен риск от летален изход на заболяването при носителите на *ε4 алел, в сравнение с носители на *ε3 и *ε2 [258]. Голям брой други проучвания в тази насока също предполагат, че носителите на *ε4 са особено предразположени към развитието на коронарни лезии или имат повишен риск от развитие на сърдечна исхемия [258-260]. Предполага се, че биохимичният механизъм на този процес е свързан с дисфункция на Е4 изоформата на аполипопротеин Е и повишена концентрация на серумния холестерол и триглицериди в кръвта [154].

Song et al. правят подробен анализ на данните в литературата в периода 1996-2004 год. по отношение на връзката на генотипа за *APOE* и риска от развитие на сърдечна исхемия. Анализирани са общо 15 492 пациенти с МИ и 32 965 здрави индивиди, използвани като контроли

в 48 различни проучвания. Този обширен анализ оценява риска за развитие на сърдечно - съдово заболяване при индивиди, носители на *ε4 алел на 42%, в сравнение с носителите на алел *ε3. Не е открита, обаче, асоциация между носителството на *ε2 и развитие на сърдечно – съдови усложнения [261].

В своето проучване Mooijaart et al. анализират връзката между плазмените нива на ApoE, сърдечно-съдовите рискови фактори и смъртността в група от 561 жители на общността в Лайден. Авторите докладват, че възрастните пациенти с високи плазмени нива на ApoE са със значително повишен риск за летален изход в резултат на сърдечно-съдово заболяване, независимо от генотипа на *APOE*. Освен това установяват, че при млади пациенти генотипът на *APOE* е асоцииран с плазмените нива на аполипопротеините в кръвта [262].

Въпреки проведените до този момент проучвания, все още има противоречиви данни за асоциацията между полиморфизмите в гена за ApoE и развитието на ИБС и миокарден инфаркт. 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) [263].

5.1.3. CDH13

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 [212]. 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 показа асоциация с понижен риск за развитие на ИМ (OR 0.56 CI95: 0.38-0.85, p=0.005).

Кадхерин 13 (CDH13) представлява уникален член на суперфамилията на кадхерините. При него липсват трансмембранен и цитоплазмен домени и протеинът е закотвен в клетъчните мембрани посредством GPI котва. Класическите кадхерини са необходими за клетъчните мобилни контакти, динамичното регулиране на морфогенетичните процеси в ембрионите и целостта на тъканите в организма при възрастни индивиди [264, 265].

Функцията на кадхерин - мембранните рецептори е свързано с превръщане на извънклетъчните сигнали във вътреклетъчни такива, активиране на малки гуанозин трифосфатази и бета-кадхерин метаболити, в резултат на което настъпва реорганизация на динамичния цитоскелет и последващи промени във фенотипа. При CDH13 липсва пряк контакт с цитоскелета и следователно липса на участие в междуклетъчната адхезия. Той участва при хормоналните ефекти на липопротеините с ниска плътност (LDL), подобно на Ca2 + мобилизацията и увеличаването на клетъчната миграция, както и промени във фенотипа [264, 265].

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 Т- кадхерин е повишена при перицити и гладко-мускулните клетки на атеросклеротичните лезии. Също така, Т- кадхерин се експресира в артериалната стена след балонна ангиопластика в късните етапи на формирането на неоинтима, което съвпада с пика на пролиферацията и диференциацията на съдовите клетки [264, 265].

Интересното е, че Т- кадхерин е силно експресиран в adventitial vasa vasorum на пострадалите артерии, което предполага участието му в процесите на ангиогенезата след нараняване на артериите. Тези данни определят потенциалното участие на Т-кадхерин в регулацията на съдовото

функциониране и ремоделиране, но точната му роля в образуването на неоинтима и развитието на атеросклероза предстои да бъде изучена [264, 265].

Съществуват данни, че Т-кадхерините потискат инсулин зависимата сигнализация, активацията на eNOS и ангиогенезата във васкуларните ендотелни клетки [266]. Според други проучвания Т-кадхерин има съществена роля в адипонектин-медиираната реваскуларизация на стените на кръвоносните съдове [267]. Генетични вариации в *CDH13* се асоциират с понижени плазмени нива на адипокини и повишена чувствителност към тези цитокини [268, 269].

Както беше споменато по-горе, *CDH13* се експресира предимно в нервната и сърдечно-съдовата система, като най-висока експресия се наблюдава в аортата, артериите и в сърцето. Той взаимодейства в съдовите ендотелни и гладкомускулни клетки с два различни лиганда, които играят важна роля в сърдечно-съдовата физиология, обмяната на липопротеините с ниска плътност и адипонектините. Т-кадхерин се явява регулатор на ремоделирането на съдовата стена и ангиогенезата, и при патологични състояния в съдовите ендотелни клетки в рамките на атеросклеротични увреждания. Всички тези характеристики правят този ген обещаващ кандидат за регулирането на АН. По-нататъшно фино картиране на този регион ще бъде необходимо за изясняване на сигнала на асоциацията и идентифициране възможните причинни варианти [212].

5.1.4. ATP2B1

В резултат на проведените анализи беше установено, че интронният вариант rs2681472 (алел G) 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) [270]. 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 [271]. 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 [272].

Въпреки че патофизиологичното влияние на продуктите на *ATP2B1* върху развитието на хипертония все още не са добре изяснени, е съобщено, че инхибирането на ATP2B1 от селективен инхибитор калоксин 2A1 води до ендотел-зависима релаксация на аортата на експериментални плъхове посредством увеличаване на цитозолните калциеви концентрации и последващо активиране на ендотелната NO синтаза [273]. Допълнителна информация за ролята на ATP2B1 в сърдечно-съдовата патология е получена при опити с гладко - мускулни клетки на пикочен мехур: при измервания на контрактилитета на тези клетки е документирана важната роля на ATP2B1 в извличането на Ca+ след стимулация с карбахол или деполяризация с калиев хлорид [274]. Тези доклади предполагат промяната в съдовата реактивност като правдоподобно обяснение за чувствителността на гена *ATP2B1* към АХ, а индиректно и със сърдечната исхемия.

При бозайниците, изоформите на калциевата аденозинтрифосфатаза се кодират от 4 отделни гени (*ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4*) [275]. Съобщено е, че повишената експресия на

човешкия *ATP2B4* ген в артериални, гладкомускулни клетки при мишки повишава съдовата реактивност и АН отчасти поради отрицателното регулиране на невронната NO синтаза [276].

В едно проучване е установено, че полиморфен вариант rs2681472 в гена *ATP2B1* се свързва с предразположение към развитие на резистентност към провежданото лечение при пациенти с АХ. Тъй като калцият е ключов елемент в гладката мускулатура и сърдечната контракция, е логично, че липсата на равновесие в калциевата хомеостаза би могла да повлияе отговора към антихипертензивни медикаменти и да е причина за развитието на резистентна хипертония [277].

5.1.5. PHACTR1

Ролята на PHACTR1 в патофизиологията на сърдечно-съдовите заболявания предстои да бъде изяснена. PHACTR1 представлява регулатор на протеин фосфатаза 1 (PP1), ензим регулиращ синтезата на азотния оксид в ендотелиума [30], който от своя страна е важен модулатор при сърдечно-съдовите заболявания [278].

Мета-анализ на проведените репликативни проучвания до този момент показва съществени доказателства за асоциацията на полиморфен вариант rs9349379 в гена *PHACTR1* с артериална стеноза на кръвоносните съдове. Варианти в *PHACTR1* първоначално са били свързани с инфаркт на миокарда с ранно начало в изследвания на MI Genetics consortium [194, 279, 280]. Вариантът с най-значима асоциация в това проучване е rs12526453, но ефектът му на влияние е по-нисък от този на rs9349379, който е част от същия хаплотип (D '= 0.98, R^2 = 0.37) [15,16]. Резултатите от мета-анализа потвърждават тези, получени от друго подобно изследване [14], при което е установено, че rs9349379 е по-добър маркер и показва по-силна връзка с ИМ в сравнение с rs12526453.

В проведеното от нас проучване полиморфен вариант rs9349379 (алел G) в гена *PHACTR1* показа 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 *PHACTR1* биха могли да допринесат за възникване на инфаркт посредством участие в процесите на сърдечно-съдова стеноза, независимо от роля в Ca2+ хомеостазата на сърцето [281].

PHACTR1 преставлява инхибитор на протеин фосфатаза 1 (PP1), ензим, който дефосфорилира серинови и треонинови остатъци в широк спектър от протеини като повлиява синаптичната активност и морфология [282, 283]. Протеинът PHACTR1 съдържа 8 места за осъществяване на протеин киназно фосфорилиране и 7 такива за протеин киназа C фосфорилиране. Фосфорилиращата функция на PHACTR1 предполага участието му в регулацията на PP1-субстратните взаимодействия [284]. Освен това активността на пропротеин фосфатаза 1 е доказано повишена при пациенти в краен стадий на сърдечна недостатъчност [285].

Протеин фосфатаза 1 (PP1) е повсеместно експресиран ензим, който участва в голям спектър от физиологични процеси, включително генна експресия, мускулно съкращение, и метаболизъм на гликоген. Семейството на протеин фосфатазите отразява широк диапазон от физиологични процеси, медиирани от фосфорилирането на различни протеини и по-специално от PP1. Установено е, че PHACTR1 инхибира активността на PP1 спрямо неговите субстрати (като напр. фосфорилаза а). Phactr протеините са най-вероятно членове на семейство на PP1 регулаторните протеини. Тези протеини диктуват PP1 субклетъчната локализация и в някои случаи служат за

усилване на активността на PP1 към избрани субстрати. Например в неврони дендритният протеин, спинофилин, служи за улесняване на ролята на PP1 в регулирането на рецепторни отговори на амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова киселина. PHACTR1 е колокализиран с PP1 в синапсите и по този начин може да играе роля в регулирането на субстратите, контролиращи синаптичната активност [283].

Въпреки това ролята на гена *PHACTR1* по отношение на риска за развитие на сърдечно-съдови усложнения остава все още неясна и тепърва предстои да бъде изяснена, както чрез допълнителни генетични анализи, така и чрез функционални такива.

5.1.6. Локус 9p21

Първоначалното откритие на локус 9p21 е направено в група от сърдечно болни предимно с европейски и азиатски произход. Репликативни, асоциативни проучвания за този локус са проведени за различни етнически групи като поляци [286], корейци [176], японци [287], китайци [177], италианци [288] и др. Този участък от генома може да се счита за най-силния генетичен маркер за ИБС и миокарден инфаркт към настоящия момент.

В нашето асоциативно изследване беше потвърдена връзката между носителството на полиморфен алел за rs7865618 (алел А) в локус 9p21 и повишения риск за развитие на исхемична болест (OR 1.29, CI95:1.05-1.59, 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 С на полиморфен вариант rs7857345 и повишен риск за развитие на миокарден инфаркт (OR 1.64, CI95:1.03-2.61, p=0.03).

Рисковият за ИБС регион в късото рамо на девета хромозома се припокрива с екзони 13-19 от CDKN2B антисенс РНК, известна като ANRIL, която представлява голяма некодираща РНК, идентифицирана за първи път през 2007 г. Районът обхваща общо над 126 000 б.дв [174]. Генът *CDKN2B* се намира в непосредствена близост до *CDKN2A*, като и двата гена кодират циклин-зависими киназни инхибитори. В действителност последователността на ANRIL съвпада с тази на гена *CDKN2B*. Този район е обект на изследване при редица ракови заболявания, защото гените, които регулират клетъчния растеж, са именно *CDKN2A* и *CDKN2B* [183].

p21 включва различни полиморфни варианти като rs1333049, rs10757274, rs10757278, rs2383206 и rs2383207, които се намират в неравновесна скаченост. Първият полиморфизъм в региона, показал значителна асоциация с ИБС, е rs1333049. Мета-анализ на приблизително 40 000 болни с атеросклероза на коронарните съдове и съответстващи им по брой здрави контроли показва, че около 25% от индивидите с европейски произход са носители на две копия на рисковия алел (хомозиготно състояние), което води до увеличаване на риска от ИБС с до 1.6 пъти в сравнение с носителите на див тип алели. В допълнение този вариант се асоциира с висок риск от формиране на коремна и вътречерепна аортни аневризми, артериална ригидност, тежка коронарна стеноза на кръвоносните съдове, както и артериална калцификация [289].

Установено е, че първоначално откритият полиморфен вариант rs1333049 в локус 9p21, асоцииран с ИБС, се среща приблизително при 75% от населението в световен мащаб. Изключение правят афро-американците, при които въпросният вариант се среща с изключително ниска популационна честота. Вариантът представлява замяна на гуанин с цитозин в структурата на ДНК и се свързва с 25% повишен риск за развитие на ИБС при носителство на едно копие на алтернативния, алел и 50% повишен риск при едновременното носителство на два рискови алела. Носителството на рисков алел при индивиди с ранно начало на ИБС се свързва с двукратно увеличение на риска от заболяването, като този риск е съизмерим с риска при пушачите и високите нива на холестерол в кръвта [289]. Вероятно най-забележителното откритие в случая е, че 9p21 е независим от всички останали известни рискови фактори за атеросклероза на коронарните съдове, което показва, че може да съществуват и други фактори в патогенезата на заболяването, които са все още неизвестни или не добре изучени.

Както беше споменато по-горе, генетичните варианти, свързани с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания като ИБС и ИМ в локус 9p21, са локализирани в последователност от генома, която произвежда дълга, некодираща РНК, наречена ANRIL. При хората с понижен риск от сърдечно-съдово увреждане вероятно се извършва снаждане на дългата РНК в два по-малки фрагмента: къса линейна РНК и кръгова РНК (cANRIL). За разлика от тях, при хората с повишен риск от заболяване е установена по – дълга ANRIL РНК, която по-ефективно потиска генната експресия на INK4/ARF локуса. Експресията на свързаните с INK4/ARF гени предпазва от образуване на атеросклеротични плаки и хора, при които този локус е потиснат, са по-предразположени към сърдечно-съдови заболявания [182]

Установено е също така, че генетичните варианти в локус 9p21 са важни прогностични фактори за тежестта на исхемичното заболяване и броя на засегнатите коронарни съдове [290]. Тази роля е оценена при пациенти с ранно начало на ИБС и е потвърдена в независима група от пациенти с късно начало на заболяването. Полиморфни варианти в локус 9p21 при индивиди с ранно начало на атеросклероза определят 50% повишен риск за хетерозиготните носители на рисков алел и двукратно повишен риск за хомозиготните носители, сравними с двукратно повишения риск при пушачите [291], 40% по-високия риск от 10 mmHg повишаване на кръвното налягане [292] и 30% увеличения риск, свързан със стандартно отклонение в посока на увеличение на нивата на LDL холестерол или стандартно отклонение в посока на понижаване на HDL холестерол [293].

Важно е да се отбележи, че липсват асоциации на 9p21 с някои общи рискови фактори, като например нива на липиди и стойности на артериалното налягане, което показва, че този генетичен маркер упражнява ефекта си чрез напълно нов, неизвестен до този момент, механизъм [172, 173, 200, 289, 294].

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 [289]. 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 [289]. Проучванията на Folkersen и съавт. показват повишена експресия на *CDKN2A, CDKN2B* и *MTAP* в нормални и атеросклерозирали коронарните артерии [295]. Въпреки това експресионните нива на тези гени в проводящата тъкан не са показали ясна асоциация с генотипа на локус 9p21, което говори срещу ролята на променената експресия на тези гени в проводящата тъкан при определяне на предразположеността към сърдечна исхемия.

Наскоро бяха проведени функционални изследвания, фокусирани върху диференцираната експресия на антисенс некодиращите РНКи на INK4 (ANRIL), които се транскрибират от локус 9p21, както и от съседните белтък-кодиращи гени INK4/ARF. Новата хипотеза предполага, че ANRIL може да представлява регулатор на епигенетична модификация и по този начин да модулира сърдечно-съдовия риск [296, 297].

Генетичните варианти могат да повлияят фенотипа чрез промяна или на характера на генния продукт (неговото качество) или на неговата експресията (количество). Повечето от рисковите варианти в 9p21 са разположени в некодиращи региони, далеч от белтък - кодиращи гени. Това показва, че ефектът им вероятно се дължи на тяхното влияние върху генната експресия на един или повече гени разположени на по-голямо разстояние в генома.

Няколко проучвания показват, че локус 9p21 взима 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 [176, 177, 189, 190, 288, 298, 299]. 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 [185, 300-303]. 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 инициирането на процеса на атеросклероза, а не е свързан с неговото развитие или тежестта на заболяването [190], докато други твърдят точно обратното [191, 192]. 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) [190].

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 Harismendy и съавт. идентифицират 33 на брой енхансера в рамките на въпросната секвенция. [304]. 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 установените зависимости.

5.1.7. PCSK9

Пропротеин 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 [305].

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).

Генът, кодиращ PCSK9, е локализиран върху късото рамо на първа хромозома в регион 32.3 (1p32.3) [306]. Кодираният от този ген протеин участва в регулацията на количеството на холестерола в кръвта. Смята се, че въпросният протеин контролира броя на LDLR, които са разположени на повърхността на клетките. Тези рецептори играят важна роля в регулирането на нивата на холестерола. В най-голямо количество LDLR се откриват в черния дроб - органът, отговорен за премахване на излишния холестерол от организма. Броят на LDLR на повърхността на клетките на черния дроб определя колко бързо холестеролът (под формата на LDL) се отстранява от кръвния поток. Редица проучвания в тази насока показват, че PCSK9 помага за контролиране нивото на холестерола в кръвта чрез деградиране на LDLR преди те да достигнат повърхността на клетката [307].

Предполага се, че протеинът PCSK9 действа както чрез ендогенни, така и посредством екзогенни механизми. Екзогенно циркулиращите PCSK9 протеини се свързват към LDLR. Веднъж попаднал в чернодробните клетки, PCSK9 насочва LDLR към лизозомите за разграждане. Ендогенните PCSK9 протеини се секретират от апарата на Голджи. Те се свързват към LDLR преди рецепторът да достигне до повърхността на клетката и го насочват към лизозомната му деградация. Въпреки това точните механизми, по които работи вътрешния път на деградация на LDLR, са все още неясни [308].

Свръхекспресията 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 [309].

Други мутации в гена *PCSK9* водят до по-ниски нива на холестерол в кръвта (хипохолестеролемия). Тези генетични промени намаляват активността на протеина PCSK9 или намаляват неговото количество, което се произвежда в клетките. Изследователите описват този тип мутация като "loss of function". Мутации със загуба на функция в гена *PCSK9* се срещат по-често, отколкото мутации от типа "gain-of-function", които са отговорни за хиперхолестеролемия. Загуба на функционални алели в гена *PCSK9* води до увеличаване на броя на рецепторите за липопротеини с ниска плътност по повърхността на хепатоцитите. Редица проучвания показват, че хората с намалени нива на холестерол, причинени от мутации в *PCSK9* имат значително по-нисък от средния риск от развитие на сърдечно-съдови усложнения [309].

Някои от изследователите предполагат, че генетични полиморфизми в гена *PCSK9* са отговорни за част от разликите в нивата на холестерола в кръвта сред хората без наследствени заболявания на холестероловата обмяна. Целта на работата на голям брой изследователски групи е да се определи кои полиморфни варианти в *PCSK9* са свързани с относително ниски нива на холестерол в кръвта и намаляване на риска от сърдечно-съдови заболявания [310].

Протеинът PCSK9 се синтезира главно в черния дроб, червата и бъбреците като протеин – предшественик, съдържащ 692 аминокиселини (молекулно тегло около 75 kDa) [311]. Пропротеинът PCSK9 претърпява автокаталитична модификация в ендоплазматичния ретикулум (ЕПР), преди да се формира функционално активен ензим (молекулно тегло около 62 kDa) [311]. Мутации в гена за *PCSK9* предотвратяват протичането на автокаталитичния процес при зреенето на белтъка като по този начин се възпрепятства секрецията на PCSK9 [312]. Този патологичен процес се асоциира с 48% редукция в плазмените нива на LDL-C [312, 313].

Някои аминокиселинни замени в протеините PCSK9 (напр. S127R и D374Y) и LDLR (напр. H306Y), които са свързани с фамилна хиперхолестеролемия (ФХ), имат значение за молекулните взаимодействия в рамките на PCSK9 - LDLR комплекса, като по този начин допринасят за повишаване на рецепторното разграждане и за увеличаването на нивата на LDL-C сред носителите на мутации [313-316]. Мутацията D374Y в *PCSK9* води до изключително тежък фенотип на ФХ, който не се поддава на лечение със статини [317]. Носители на тази мутация се засягат от сърдечно-съдови усложнения десет години по-рано в сравнение с останалите пациенти с ФХ [317].

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 липидо-понижаващи 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.

5.1.8. GNAS и EDN3

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 A) 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 A 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.

Генът *EDN3* кодира протеин, който е член на семейството на ендотелините. Ендотелините представляват пептиди от 21 аминокиселини, произведени от ендотела на кръвоносните съдове и много други тъкани, като например тези на бъбреците, мозъка, ендокринните органи и други. Ендотелините са мощни вазоконстриктори [318-320], които участват в патогенезата на

хипертонията чрез съдови, бъбречни, ендокринни и невронални ефекти. Проведени са голям брой проучвания, за да се провери хипотезата за патофизиологичната роля на тези пептиди при артериална хипертония. Установени са данни за засилено производство на ендотелин-1 в някои експериментални модели на хипертония, особено в кръвоносните съдове в деоксикортикостерон хипертензивни плъхове. В човешката първична хипертония все още има малко доказателства за активиране на тази система. Ролята на ендотелините при хипертония става все по-очевидна при тежки форми на експериментална такава, но са необходими допълнителни проучвания, за да се установи дали тези пептиди участват в човешкото заболяване [318-320].

От друга страна е доказано, че системата на β-адренорецептор-стимулиращият гуаниннуклеотид свързващ (Gs) протеин играе важна роля в сърдечно-съдовата патология. Генът, кодиращ α-субединицата на Gs протеините (*GNAS1*) е важен кандидат за генетичен фактор за повишени стойности на АН [321, 322].

Предишни изследвания показват, че Т алелът на полиморфен вариант T393C в гена *GNAS1* се свързва с резистентност към терапия с β - блокери, като в резултат на взаймодействието с тютюнопушенето и консумацията на алкохол има съществена роля в патогенезата на хипертонията. Вероятно този полиморфен вариант има отношение към стимулирането на β-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 [321, 322].

5.1.9. ABO

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 [323]. 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%).

5.1.10. Гени, свързани с предразположение към диабет

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 етиопатофизиология. Предполага се, че инсулинът и хипергликемията имат важна роля за проявата и развитието на двете заболявания.

Диабет тип 2 (Т2ЗД) се характеризира с хронична хипергликемия, както и с нарушения в обмяната на въглехидрати, мазнини и липиди в резултат от нарушения в инсулиновата секреция и/или действие. Сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност е висока сред пациентите с Т2ЗД. Установено е, че рискът за ИБС е от 2 до 4 пъти по-висок сред диабетици в сравнение с недиабетици. Т2ЗД е свързан с ендотелна дисфункция, тъй като увеличава възпалителните процеси и инсулиновата резистентност в резултат на увеличено окисление на липопротеините с ниска плътност, ендотелин-1, ангиотензин II, оксидативен стрес и намаляване на действието на азотния оксид, инсулина и растежните фактори в ендотелните клетки. Кандидат-гените за Т2ЗД представляват потенциални кандидати за ИБС поради припокриването на различни метаболитни и хормонални усложнения при двете заболявания. Сред тях са гени като *TCF7L2, ACE, PPAR γ, IRS1, ADIPOQ* и *TNF α*. Въпреки споделената патофизиология между диабет и исхемична болест докладите за тяхната генетична връзка са оскъдни. Именно поради тази причина има голяма нужда от по-нататъшни проучвания и разработване на стратегия за превенция на ИБС дълго преди появата му при пациенти с Т2ЗД [206].

В настоящата работа бяха получени статистически значими асоциации между редица алели на изследваните варианти в гени свързани с предразположение към Т2ЗД 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).

През последните години са открити много генетични рискови фактори както за Т2ЗД, 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 [206].

Полиморфизми в гена *TCF7L2* и в близост до CDKN2A/B гените имат най- голямо значение в това отношение, тъй като те се явяват като модулиращи фактори и при двете условия, като не са задължително свързани с нивата на инсулин или хипергликемия - едни от основните рискови фактори, присъствието на които води до развитие на атеросклероза на коронарните съдове. Все още обаче са необходими допълнителни изследвания, за да се изяснят асоциациите в генетиката на Т2ЗД и сърдечно-съдовите заболявания. В момента има малко генетични доказателства, които да подкрепят тази връзка [206].

Нарастващият брой на случаите на диабет и свързаните с него хронични усложнения представляват основен глобален здравен проблем. Тези усложнения са класифицирани като микроваскуларни (диабетна ретинопатия, невропатия и нефропатия) и макроваскуларни (инсулт, остър коронарен синдром, хронична и периферна артериална болест). От тях ИБС причинява повечето от смъртните случаи при заболелите индивиди [324]. Отдавна известно е, че диабетът увеличава риска от сърдечно-съдови заболявания. Всъщност около 65% от смъртните случаи при Т2ЗД пациенти са свързани с исхемична болест на сърцето (ИБС) или инсулт [6]. Основни рискови фактори за ИБС са хипергликемията, не-гликемични фактори, свързани с метаболитен синдром, включително хипертония, дислипидемия, хиперкоагулация и хронично възпаление. Затова не е изключено едни и същи генетични рискови фактори да играят роля и при диабет и при диабетните макроваскуларни усложнения, както и при сърдечноболни. Въпреки доказаната връзка между диабета и атеросклерозата, свързаните с това механизми все още не са напълно изяснени [324].

Интерес представлява въпросът дали поради общата етиопатогенеза на ИБС и Т2ЗД съществува асоциация между полиморфизми в диабет-свързани гени и риска за ИБС. В този контекст Pechlivanis и съавт. правят оценка на връзката между коронарна калцификация и 11 потвърдени рискови за диабет полиморфни варианти. Изследователите докладват, че само генетичен вариант близо до *CDKN2A/2B* е свързан с количествена коронарно-аортна калцификация [325]. Освен това съществуват доказателства и за силно взаимодействие между носителството на вариации в гена *TCF7L2* и ИБС. Полиморфни варианти в този ген се асоциират значително с предразположеността към диабет като тези резултати са потвърдени при различни популационни групи [326-331]. В този контекст Bieliński и др. тестват rs7903146, rs12255372, rs7901695, rs11196205 и rs7895340 в *TCF7L2* за асоциации със сърдечно-съдови събития при повече от 13 000 лица от кохортата ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities). Авторите не откриват значима връзка между носителството на полиморфни алели в *TCF7L2* и честотата на ИБС, исхемичен инсулт, периферно артериално заболяване или сърдечно-съдовата смъртност. Стратификация на населението по раса или вече диагностициран диабет не води до промяна в получените резултати [332]. Въпреки това в по-късни проучвания е намерена значима асоциация между полиморфизма rs7903146 в *TCF7L2* и разпространението и тежестта на ИБС [333].

Еднонуклеотидните полиморфизми в лептиновия ген *LEP* и неговия рецептор *LEPR* оказват огромно влияние върху телесното тегло, инсулиновата резистентност и други метаболитни параметри, които представляват основните рискови фактори за сърдечно-съдови усложнения [334]. Вариантът +19 G>A в лептиновия ген е изследван детайлно, поради ефектите му върху

метаболитни заболявания, свързани със затлъстяването. Скорошно проучване открива значителната асоциация на алела А с ниско телесно тегло, нисък ИТМ, ниски циркулиращи лептинови нива и следователно нисък риск от затлъстяване сред жени от кавказката раса [335].

Проведени са голям брой проучвания, целящи да изяснят връзката между полиморфни варианти в гена, кодиращ лептин, и наднорменото тегло, Т2ЗД и исхемична болест за различни популационни групи [332, 333, 336-339]. Установена е връзката и на други полиморфизми в лептиновия ген (rs17151919, rs28954369, rs2167270) с телесното тегло, при жени от кавказката и афро-американската раса [340]. Изследванията проведени при жени, които по време на бременността са били на инсулинова терапия, показват трикратно повишени нива на лептинова иРНК и лептин в плацентата. В същото време, в кръвта на майките не се отчита повишена концентрация на този адипокин, вероятно поради липсата на отговор на инсулиновия сигнал (инсулинова резистентност) в организма на пациентките с гестационен захарен диабет (ГЗД) [334, 341].

Адипонектинът, кодиран от гена *ADIPOQ*, играе роля за модулиране на инсулиновата чувствителност и поддържане на глюкозната хомеостаза. Ефектите му се осъществяват в резултат на взаимодействието му с неговите рецептори – AdipoR1, AdipoR2 и T-cadherin. Всеки от тези рецептори разпознава и свързва с по-голям афинитет една от многото изоформи на белтъка. Адипонектиновите рецептори активират каскади, в резултат на което се повлияват няколко основни метаболитни процеса – потиска се глюконеогенезата в черния дроб, активира се приема на глюкоза в мускулите, увеличава се липогенезата в черния дроб и окислението на мастните киселини [334].

Редица статии докладнат връзката между варианти в гена *ADIPOQ* и Т2ЗД. При пациенти с това заболяване плазмените нива на адипонектин са по-ниски в сравнение с тези при здрави контроли [342]. Подобно е положението и при хора, страдащи от метаболитен синдром, затлъстяване и сърдечно-съдови заболявания [343, 344]. В литературата се откриват редица данни за връзката между трите генетични полиморфизма rs266729, rs2241766 и rs1501299 в адипонектиновия ген и риска за развитие на Т2ЗД [342, 345, 346]. Срещат се и изследвания, които проучват потенциалната връзка между носителството на алтернативни алели за тези варианти и риска за развитие на ИБС за различни популационни групи [347-351].

Адипонектин представлява белтъчен хормон, който се произвежда и секретира изключително от адипоцити. Той участва в регулацията и метаболизма на липиди и глюкоза. Адипонектин притежава противовъзпалителни и анти-атерогенни директни ефекти чрез инхибиране на моноцитната адхезия към ендотела, пролиферацията на гладкомускулните клетки и образуването на пенести клетки в артериалната стена [352]. В метаанализ, включващ 827 болни с ИБС и 1887 контроли, полиморфният вариант 276G>T в гена за адипонектин (*ADIPOQ*) се свързва с приблизително 45% редукция на сърдечно-съдовия риск при хомозеготни пациенти с вече установен захарен диабет [353]. Три полиморфни варианта разположени в рецептор 1 за адипонектини (*ADIPOR1*) също показват значима връзка с ИБС при болни от Т2ЗД. В изследваната група OR при сравняване на алелните честоти между двете групи (болни и здрави) е в интервала от 1.3-1.4. Подобни резултати са установени и в последващи репликативни проучвания [354]. Причината за този ефект е свързана с по-ниски нива на AdipoqR иРНК при носителите на рискови алели. Установена е връзка и между полиморфния вариант rs266729, локализиран в промотора на адипонектиновия ген (-11377C> G) и нивата на плазмените маркери на оксидативния стрес при диабетици, включително молекули окислен LDL [355].

Експериментални изследвания показват, че адипонектин притежава анти-атерогенни и противовъзпалителни свойства. Когато съдовия ендотел е наранен, адипонектин се натрупва във вътрешността на интимата на артериалната стена посредством взаимодействието му с колагени. Адипонектин инхибира TNF-a-индуцираната адхезия на моноцити и експресията на Е-селектин, VCAM-1 и вътреклетъчната адхезионна молекула 1 (ICAM-1) на ендотела. Предполага се, че вътреклетъчният сигнал, в резултат на който адипонектин потиска експресията на адхезионни

молекули, е инхибирането на ендотелната NF-κB сигнализация чрез активирането на cAMP протеин киназа А [356].

Друг изследван в настоящия дисертационен труд полиморфен вариант е rs9939609 в гена *FTO* Беше установено, че полиморфният алел Т на въпросния вариант определя повишен риск за развитие на МИ при жени (OR 2.37 p=0.026).

.В литературата съществуват данни за асоциацията на алел А за въпросния полиморфизъм и по-ниските плазмени нива на холестерола с висока плътност (HDL), триглицеридите, както и с по-висок атерогенен индекс на плазмата и повишен индекс на телесната маса. Освен това, алелът е асоцииран и с повишен риск за фатален и нефатален МИ. Установено е и взаимодействие между *FTO* генотипа и отговора към лекарствена терапия със статини по отношение на изхода от сърдечно-съдово усложнение (като преживяемост/смъртност) [357].

През 2007 г. Frayling и др. [4] първи съобщават, че вариант rs9939609 в гена *FTO* се свързва значително с Т2ЗД при европейци, което напълно се обяснява с ефекта на този вариант върху стойностите на ИТМ. FTO протеинът е силно експресиран в централната нервна система, която регулира енергийния метаболизъм [358]. Въпреки това последните два мета-анализа показват, че rs9939609 влияе на риска от Т2ЗД независимо от ИТМ, както при европейци, така и при източноазиатци [359, 360].

По отношение на връзката между гена *FTO* и риска от ССЗ, Doney и др. [357] съобщават, че алел А на rs9939609 в гена *FTO* увеличава риска от инфаркт на миокарда при изследване на 4 897 пациенти с Т2ЗД в проспективно проучване, като това влияние е независимо от ИТМ, нивата на гликирания хемоглобин, средното артериално налягане, нивата на HDL-C, триглицеридите и общия холестерол. Въпреки това последващи подобни проучвания достигат до противоречиви заключения [361-370]. Установено е, че вариант в гена *FTO* повлиява усвояването на висококалорийната храна, а не участва в регулирането на енергийния разход [371]. В допълнение, вариантът rs9939609 във *FTO* се свързва с повишен риск от диабет и свързаните с него метаболитни нарушения (включително по-високи нива на инсулин на гладно, а също така и на глюкоза, триглицериди, и по-ниски стойности на HDL холестерол) [372].

Полиморфни варианти във FTO се свързват с повишен риск за хипертония посредством регулиране на симпатиковата модулация на вазомоторния тонус. Според Hubacek и др. вариантът rs9939609 може да увеличи риска от ССЗ чрез друг механизъм, а именно чрез евентуалното му въздействие върху ДНК метилирането. Така този вариант може да взаимодейства с нездравословния начин на живот (например високо съдържание на мазнини в храната и липсата на физическа активност), както и да повлияе на епигенетичния статус като в крайна сметка допринесе за развитието на ССЗ [364].

Провеждането на геномни асоциативни изследвания показва, че rs9939609 е свързан с риск от затлъстяване при европейци и азиатци. Тъй като затлъстяването води до повишен риск от сърдечно-съдово заболяване, няколко проучвания са изследвали връзката между този вариант на гена *FTO* и ИБС риска като получените резултати са противоречиви.

Общо 10 проучвания (включващи 19 153 пациенти с ИБС и 103 720 контроли) са включени в мета-анализ от 2013 г. Резултатите показват, че вариантът rs9939609 е значително свързан с риска от ССЗ преди (OR = 1.18, CI95 = 1.7-1.30, p = 0.001) и след отчитане влиянието на ИТМ и други конвенционални сърдечно-съдови рискови фактори (OR = 1,16, CI95 = 1.5-1.27, p = 0.003) [373].

Продуктът на гена за манозо-свързващ лектин 2 (*MBL2*) участва в активирането на каскадата на комплемента, която има отношение към механизмите на атеросклероза. Въз основа на едно пилотно проучване е изказана хипотезата, че функционални полиморфизми в гена *MBL2*, водещи до синтез на нефункционален протеин, са свързани с развитие на миокарден инфаркт. Установено е, че вариантните хаплотипи, водещи до MBL2 дефицит са свързани с два пъти по-висок риск от инфаркт на миокарда (OR 2.04, 95% CI 1.29-3.24). След корекция за конвенционалните сърдечно-съдови рискови фактори, този резултат не се променя. Това подкрепя тезата, че дефицитът на MBL2 може да доведе до развитие на атеросклероза или руптура на плаката [374].

Установени са седем основни хаплотипа, които кодират промени в серумните нива на MBL2 и активирането на комплемента. Последните данни показват, че тези халотипи може да доведат и до промени във функцията на MBL и неговите циркулиращи нива [375].

Друг ген, полиморфни варианти в който се асоциират с повишен риск по отношение на Т2ЗД, е *IRS-1*. В няколко големи проучвания полиморфизми във въпросния ген се асоциират с Т2ЗД [376-378]. Един от тези варианти, G972R (Gly972Arg), е с почти два пъти по-висока честота при инсулино-резистентни пациенти като носителството на алела R се свързва с 25% увеличение на риска за развитие на Т2ЗД. При тези индивиди обикновено заболяването се развива в ранна възраст и има по-тежко протичане [379]. Това го смъкнах от по горе! Виж дали му е тук мястото! Baroni и колектив са изследвали честотата на полиморфен вариант в гена за субстрат 1 на инсулиновите рецептори (*IRS1*) при 318 пациенти с ангиографски доказана ИБС и тази честота е 0.50%. Вариантът се среща 2.5 пъти по-често при болни в сравнение с контроли. Когато се преизчисли за други рискови фактори, относителният риск от ангиографска коронарна болест в резултат на носителството на варианта в IRS-1 е 3-кратно, и той се увеличава до 7 пъти и 23 пъти, съответно, при пациенти със затлъстяване и при пациенти с инсулинова резистентност. Това изследване осигурява нов кандидат ген, потенциално допринасящ за генетично предразположение към заболяване на коронарните артерии. Механизмите, чрез които заместването на глицин с аргинин в кодон 972 на гена *IRS-1* допринася за повишен риск от коронарна болест все още не са изяснени. IRS-1 действа като сигнална молекула. Когато е фосфорилиран, IRS-1 се свързва с висок афинитет към протеини с SRC хомоложни 2-домени, включително фосфатидилинозитол 39-киназа. При анализ на няколко проучвания е установено, че вариантът в кодон 972 има обща честота от 10.7% при пациенти с неинсулин зависим захарен диабет, в сравнение с 5.8% в здрави индивиди, което предполага връзка с предразположение към инсулинова резистентност. Освен това пациентите с този дефект имат по-ниски нива на инсулин на гладно и на С-пептид [380].

Трансфекционни изследвания са показали, че замяната в кодон 972 в гена *IRS-1* произвежда дефектна белтъчна молекула и води до промени в рецепторната сигнализация, включително понижена IRS-1-свързана фосфатидилинозитол 39-киназна активност и намалена инсулин-стимулирана ДНК синтеза. Тези изследвания показват, че полиморфният вариант в *IRS-1* би могъл да допринесе за синдрома на инсулинова резистентност, който включва затлъстяване, Т2ЗД, хипертония и хипертриглицеридемия. Има значителни доказателства, че диабетът и инсулиновата резистентност повишат риска от ИБС [381]. Това обяснява потенциалния механизъм, при който варианти в *IRS-1* биха могли да допринесат за повишен риск от сърдечна исхемия при индивиди с диабет и други метаболитни нарушения. Въпреки че замяната в кодон 972 в гена *IRS-1* в доклада на Baroni et al. се свързва с по-висока честота на диабет и хипертриглицеридемия, установеният повишен риск за коронарна болест остава независим от диабетното заболяване [380].

Има много предизвикателства пред идентифицирането на генетични варианти, които влияят на риска от Т2ЗД, 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 Т2ЗД, 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.

5.1.11. 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 наблюдавани 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 устновени 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 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 Т2ЗД. 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 Т2ЗД. 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.

През 2015 год колективът на Musameh и съавт. публикуват изследване на епистатичните вазаимодействия между 913 на брой независими единични нуклеотидни полиморфизма, проведено при 2 101 пациенти с ИБС от British Heart Foundation Family Heart Study и 2 426 контроли без данни за сърдечни заболявания. Резултатите от проведеното изследване показват, че нито един от анализираните взаимодействия не запазва статистическа значимост след корекция за множествени тествания ($P<1.2x10-7$), както и мнозинството от предполагащи взаимодействия не са били възпроизведени във валидиращата група от пациенти и контроли [382]. Тези констатации показват липса на значими междугенни взаимодействия сред гените, чийто белтъчни продукти взимат участие в основните известни пътища в сърдечно-съдовата патология.

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 [383]. 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 [384].

Доказателствата от експерименталните проучвания и асоциативните анализи показват, че междуалелните взаимодействия на различни гени могат да допринесат за индивидуалното предразположение към към комплексните заболявания [385-388]. 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 [389]. Например, приоритизиране на онези единични еднонуклеотидни варианти въз основа на асоциацията им като единичен маркер от GWAS анализите [390].

Включването на информация относно знания за протеин-протеинови взаимодействия и участие в биологични пътища са други подходящи критерии за подбор на полиморфизми за тестване на потенциални епистатични взаимодействия в контекста на сърдечно-съдовите заболявания и по-конкретно - ИБС [391, 392]. Докато междугенните взаймодействия включват локуси1 които показват индивидуално влияние по отношение на риска от заболяване, то е известно, че епистатичните локуси може да допринесат за промяната на генетичния риск без да се налага съществуването на еднолокусен ефект върху този риск [393].

5.2. Оптимизиране на терапията с аценокумарол

Витамин К антагонистите, в това число и аценокумарол, са широко използвани за лечение и профилактика на венозни и артериални тромбози. Това са медикаменти с тесен терапевтичен индекс, които показват широка междуиндивидуална фармакокинетична и фармакодинамична вариабилност. Известно е, че необходимата доза антикоагулант за достигане на терапевтично ниво на протромбиновото време (INR) варира в широки граници, както между отделните индивиди, така и при различни състояния на един индивид. В основата на тази вариабилност лежат множество фактори, като част от тях са възраст, пол, телесно тегло, диета, коморбидност, комедиация и генетични фактори [394].

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 последните няколко години в резултат на провеждането на голям брой ретроспективни проучвания беше установено, че полиморфни варианти в гените *CYP2C9* и *VKORC1* обясняват приблизително една трета от вариабилността в дозата индиректен антикоагулант. Появиха се предположения, че информацията за генотипа би могла да се използва за предвиждане на първоначалната и/или поддържаща доза кумариново производно при пациенти с повишен риск от тромбози. Въпреки че вече съществуват няколко малки рандомизирани контролирани проучвания в тази насока, все още няма ясни доказателства за ефективността на тази стратегия при дозирането на аценокумарол и варфарин с цел подобряване на безопасността и ефикасността на лечението с тях [395]. Икономическите предимства при използване на фармакогенетични алгоритми също остават неясни.

В нашето изследване целихме 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.

Целта на нашето проучване беше да се определи влиянието на различни клинични показатели, както и на полиморфни варианти в гените *CYP2C9, VKORC1* и *APOE* върху дневната поддържаща доза АЦ при български пациенти с различни показания за антикоагулантна терапия. Към настоящия етап влиянието на полиморфни замени в тези гени върху дозирането на пероралните антикоагуланти като варфарин, аценокумарол и фенпрокумон е изследвано при различни етнически групи [132, 133, 135, 137, 396-400].

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 [210]. 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.

До този момент два полиморфни варианта в гена *VKORC1* (*-1639G>A* в промоторната област и *1173C>T* в интрон 1) се асоциират с изискване за значително по-ниска доза от приемания антикоагулант. Тези два полиморфизма се намират в пълна неравновесна скаченост един с друг, като определят хаплотипите *VKORC1*1* (референтен) и *VKORC1*2A* (алтернативен). Носителството на полиморфен алел за тези варианти се свързва със значителна редукцията на оптималната доза антикоагулант, необходима за достигане на прицелни стойности на INR в интервал между 2 и 4. През последните няколко години тази зависимост е установена и в последствие потвърдена при различни популационни групи, като влиянието на полиморфизмите във въпросния ген върху оптималната доза антикоагулант варира при различните проучвания [131-133, 135-140].

Генът *CYP2C9* кодира ензим, отговорен за окислителния метаболизъм на лекарства като варфарин, аценокумарол, фенпрокумон, фенитоин и други рутинно използвани медикаменти в клиничната практика (http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm). Този ензим показва значителна междуиндивидуална вариабилност по отношение на експресия и каталитична активност, дължаща се на функционално значими генетични варианти в гена, който го кодира. До този момент в *CYP2C9* са установени около 30 хаплотипа, формирани при самостоятелното или при комбинираното участие на отделни полиморфни замени. Двата най-широко изследвани варианта във въпросниая ген са: *CYP2C9*2* (430C>T, водещ до аминокиселинна замяна Arg144Cys) и *CYP2C9*3* (1075A>C, водещ до аминокиселинна замяна Ile359Leu). Тези алелни варианти кодират експресията на протеини с понижена ензимна активност: около 12% (*CYP2C9*2*) и 5% (*CYP2C9*3*) от ензимната активност на тези, кодирани от референтния алел *CYP2C9*1* [99, 210]. Въпреки това тези полиморфни варианти оказват по-слабо влияние върху оптималната

поддържаща доза аценокумарол, докато *VKORC 1*2A* има най-голям дял в наблюдаваните различия в дозата [127, 133]. При *CYP2C9* във връзка с чувствителността на индивидите към антикоагулантна терапия са изследвани и генетични варианти в *CYP3A5* и *CYP2C19*[38, 48].

Освен това беше установено, че възрастта се свързва значително с дозата аценокумарол. В проведеното от нас изследване възрастта допринася за 6.4% от промяната в дозата медикамент като води до намаляване на оптималната доза медикамент с 0.033 мг/ден за всяка година. По този начин по-възрастните пациенти се нуждаят от значително по-ниска доза аценокумарол от по-младите индивиди. Други проучвания също демонстрират влиянието на възрастта върху дозата аценокумарол, но механизмът на това влияние все още не е напълно изяснен [137, 398, 401, 402]. Някои изследвания посочват, че активността на ензима CYP2C9 не намалява с възрастта, докато други сочат обратното [127, 403]. Известно е, че бъбречната функция намалява с възрастта, но при едно проучване само пациенти с краен стадий на бъбречно заболяване са показали намалена CYP2C активност [404]. Също така, при по-възрастни пациенти, които са на диета с ниско съдържание на витамин К, това би могло да доведе до недостиг на въпросния витамин. Доказано е, че ниските нива на витамин К зависимите фактори на кръвосъсирването могат да бъдат свързани с нивото на витамин К [120].

Индексът на телесна маса (ИТМ) е друг клиничен параметър, свързан с терапевтичното дозиране на аценокумарол. В настоящото изследване беше намерена пряка връзка между стойностите на ИТМ и оптималната доза медикамент, която обаче не се запази при множественото тестване. Поради тази причина ефектът на ИТМ върху вариабилността в дозата аценокумарол беше отчетен като незначителен. Индексът на телесна маса е включен като значим параметър за предсказване на оптималната доза аценокумарол в алгоритмите, създадени от Borobia и съавт [133] и Van Schie и съавт. [127], което е в противоречие с получените от нас данни.

Няколко изследвания отчитат пола като променлива, повлияваща терапевтичния отговор при дозирането на аценокумарол. Той присъства като параметър в алгоритъма на проучването EU-PACT [127, 405]. В нашето изследване не бяха установени разлики в терапевтичната доза антикоагулант между двата пола. Това е в съответствие с други проучвания, които също така не отчитат пола като фактор, влияещ върху оптималната доза за постигане на стабилно INR [127, 133, 405].

Проведеното от нас проучване не показа съществени различия в поддържащата доза антикоагулант при пациенти, приемащи съпътстваща терапия с медикаменти, които оказват влияние върху метаболизма на антагонистите на витамин К, като амиодарон и статини. В алгоритъма, разработен от EU-PACT, приемът на амиодарон е параметърът с най-малка предиктивна стойност от всички изследвани фактори (R^2 0.2%) [127, 133, 405]. В свои изследвания Van Schie и др [127, 133, 405] съобщават, че използването на статини заедно с аценокумарол води до лек спад в средната дневна доза аценокумарол (0,11 мг при пациенти, лекувани с аторвастатин и 0.29 мг при пациенти, лекувани със симвастатин). За разлика от това, алгоритъмът на EU-PACT не включват статини като предиктивен параметър, най-вероятно поради тяхното слабо въздействие върху дозата аценокумарол [127].

Освен генетични полиморфизми в *CYP2C9* и *VKORC1*, различни проучвания съобщават, че полиморфни варианти в гена *CYP4F2* също са важни предиктори на подържащата доза аценокумарол, като допринасят за 1-2% от дозовата вариабилност. [144]. Предишни изследвания включват и този фактор в създадените от тях алгоритми [128, 144, 145]. Проучване на целия геном, проведено от Teichert и др [146, 147] показва, че освен клинични променливи като възраст, пол, индекс на телесна маса и прицелно INR, генетични полиморфизми в гените *CYP2C9, VKORC1, CYP4F2* и *CYP2C18* определят 48,8% от вариабилността в дозата аценокумарол. Въпреки това влиянието на *CYP2C18* е едва 1,2%, като това влияние не е определено като значимо. Други изследвания в тази насока показват, че ефектът на *CY2C18* е свързан с изискване на по – ниски доза от медикамента [148, 149].

В България само едно проучване (Саръева и съавт.) съобщава за асоциация на генетични вариации с дозата орален антикоагулант [99, 210]. В него са изследвани гени, участващи в

метаболизма и транспорта на аценокумарол (а имено *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 [99, 210]. 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 [127, 128, 131-133, 137, 396, 397, 406, 407]. 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%) [127] или Borobia и съавт. (60.6%) [133]. Това се обяснява с факта, че в алгоритъма, разработен от Borobia и съавт. [133] 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. 12**. 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 свръхдозирането при тези пациенти и възникване на животозастрашаващи хеморагии.

Наблюдаваното отклонение на математическия модел е -0.23±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±0.81мг/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, третирани 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 малкия 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.

В заключение бихме могли да кажем, че полиморфните варианти в гените *CYP2C9* и *VKORC1* (*CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1*2A* и *VKORC1*3)* оказват съществено влияние върху средната дневна поддържаща доза от кумариновия антикоагулант при българи, което съответства на резултатите, получени за други популационни групи от европейски и азиатски произход[127-129, 133, 137, 139, 396, 403]. Основавайки се на резултатите от настоящото проучване беше създаден фармакогенетичен алгоритъм за предсказване на оптималната начална/поддържаща доза аценокумарол, като моделът е разработен специално за български пациенти с повишен риск от тромбози и показание за прием на антикоагуланти. Допълнителни изследвания с добавянето на други генетични фактори като например полиморфизми *в CYP4F2, CYP2C18, GGCX* и *EPHX1* при по-голям размер на извадката от пациенти биха могли да допринесат значително за подобряване на настоящия дозиращ модел.

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 [408-410]. 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. [408] 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. [409] 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. [410] 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 [411, 412]. 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 [412]. От друга страна, съществуват и изследвания, които определят тази стратегия като финансово неизгодна и необоснована [411]. 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 [413]. 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.

Както беше споменато по-горе, пациентите, носители на полиморфен вариант за някои от изследваните генетични маркери, имат по-висок риск от кървене вследствие на лечение с аценокумарол, поради висока чувствителност и изискването на ниски дози медикамент. Стратегията свързана с използването на генотипа би могла да намали този риск и следователно генотипирането е по-ефикасна стратегия именно при тези пациенти. Това се обяснява с високия брой тромбоемболични събития, които показват, че дозите при съответните пациенти са били по-високи от оптималните такива. В научната периодика могат да бъдат открити множество дискусии относно използването на фармакогенетични модели за оптимизиране на терапията с аценокумарол [414-416].

Фармакогенетично направляваното дозиране на аценокумарол и други кумаринови производни изглежда обещаващ метод за подобряване на безопасността и ефикасността на лечение с перорални антикоагуланти. Към настоящия момент отговорът към терапията с аценокумарол се оценява чрез измерване стойностите на INR след първите няколко дни от лечението. Адаптирането на предписаната доза към нуждите на пациента се осъществява едва след това първо измерване. През първите няколко дни от лечението всички пациенти получават сходна натоварваща доза. Чрез използването на фармакогенетични алгоритми за определяне на натоварваща доза лечението вече може да бъде персонализирано. Това обаче ще бъде възможно само ако резултатите за генотипа на пациентите са на разположение преди започване на самата терапия. Поради това за тази цел е желателно да съществува бърз, възпроизводим и точен метод за генотипиране на подбраните полиморфни варианти. Според твърденията на Meckley и др. използването на фармакогенетичен алгоритъм може да подобри здравето при по-високи разходи за здравеопазване в сравнение с стандартните грижи, но все още няма достатъчно информация за ефективността на този тип стратегия [413].

5.3. Оптимизиране на терапията с клопидогрел

В настоящето проучване е изследвана връзката между наличието на подбрани 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 НКБ гр. София.

Първата стъпка в анализа на влиянието на генетичните фактори върху отговора към лекарствена терапия с КЛД беше избор на панел от полиморфни маркери, които биха имали потенциално значение при лечението на пациентите с тиенопиридини и оптимизиране на терапията. За тази цел бяха подбрани единични нуклеотидни полиморфизми, показали значима асоциация с риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване (ИБС и АХ), диабет, инсулинова резистентност, затлъстяване и нива на липиди в кръвта при провеждането на цялостен геномен скан при европейци (**Табл. 4.10** и **4. 22 в раздел «Резултати»**), като в анализа бяха включени и трите най-често изследвани варианти в контекста на клопидогрелова резистентност - *CYP2C19*2, CYP2C19*17* и *CYP3A5*3*. Хипотезата, проверена в нашето изследване беше, дали вариации в

генома срещащи се с висока честота в общата популация и свързващи се с промени в патофизиологията на атеросклерозата, диабета и повишените стойности на АН, биха оказали влияние и върху начина, по който лекуваните пациенти се повлияват от терапията с КЛД. Възможно е различните патофизиологични механизми, лежащи в основата на сърдечните заболявания, да се повлияват по различен начин от лечението със съответните медикаменти.

Вариабилността в отговора към лекарствена терапия с клопидогрел е свързана с различни биологични, генетични и клинични фактори [417]. Високата остатъчна тромбоцитна активност при лечение с този медикамент зависи от различни демографски и клинични показатели като високо телесно тегло, наличие на диабет, лекарствени взаимодействия, чревна резорбция, увеличен брой тромбоцити, изява на ОКС, които също оказват съществено влияние върху ефикасността на терапията и проявата на нежелани странични ефекти като резултат от лечението [418]. Генетичните биомаркери представляват единични нуклеотидни замени в гени, кодиращи прицелни рецептори на лекарствената молекула, както и такива в гените за метаболизиращите лекарството ензими. Всеки полиморфизъм води до промяна в конформацията на прицелните рецептори и изменение на метаболизиращата активност на ензимите, участващи в процеса на активиране на пролекарството [419].

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" метаболизатори на този тип медикаменти [418].

Сред основните механизми, отговорни за недостатъчния отговор към терапията с клопидогрел и повишената трамбоцитна активност, са носителството на полиморфни варианти в различни гени: такива, които кодират основни компоненти от структурата на тромбоцитите: гликопротеин GpCa (*ITGA2*), GpIIIa (*ITGB3*), GpIb α (*GP1BA*), GpVI (*GP6*), рецепторите за АДФ P2Y12 (*P2Y12*) и P2Y1 (*P2Y1*), P-селектин (*SELP*), циклооксигеназа 1 (*COX1*), циклооксигеназа 2 (*COX2*), ендотелната синтаза на азотния оксид (*eNOS*), както и гени, кодиращи различни изоформи на ензимите от групата на Цитохром P450 семейството, участващи в метаболизирането на клопидогрел (*CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19*) [420, 421]. Въпреки това независимо от генетичните и негенетични фактори част от фармакокинетиката и фармакодинамиката на клопидогрел остава неизяснена, което предполага търсенето на нови маркери, които в комбинация биха обяснили по-висок процент от вариабилността в отговора към тиенопиридинови производни.

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 [110, 422]. 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 [423, 424]. 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 [54, 98, 425]. 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 [426, 427] и клинични фактори като диабет и наднормено тегло [422, 428].

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 [50, 78, 429-432]. 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 [433]. 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%) [433].

Голям брой проучвания, проведени в различни популации, включително японски, китайски, корейски, италиански, германия, и френски, съобщават, че сред здрави индивиди и пациенти, лекувани с КЛД, носителите с най-малко един вариант на *CYP2C19* алели (*2, *3) са показали недостатъчен или липсващ отговор към лечението с клопидогрел, поради намаляване на образуването на активния метаболит. Това определя и по-висок относителен риск от настъпването на неблагоприятни сърдечно-съдови инциденти сред носителите на такъв алел [434].

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 метаболизм на CYP2C19 субстратите [94]. Това е доказано в редица фармакологични изследвания. В малка подгрупа от пациенти (N=237), Geisler et al.[71] 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 [435]. Suh et al. [435] 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 показа по-значителна инхибиция на тромбоцитната агрегация от CYP3A5 неекспресорите след лечението с КЛД [435].

Изследователската група на Kim et al. [113] в проучване проведено в Южна Корея докладва, че наличието на *CYP3A5*3* алел не е значим фактор, причиняващ интериндивидуална променливост във фармакокинетиката и антиагрегантният ефект на КЛД. Резултатите на Frere et al. [436] в проучване, проведено сред френското население показват, че полиморфният вариант *CYP3A5*3* не оказва влияние върху реактивността на тромбоцитите и последващия отговор към терапия с клопидогрел. Липсата на асоциацията на полиморфизма *CYP3A5*3* с отговора към КЛД при нашите пациенти е в съответствие с други проучвания, проведени в различни популационни групи

[436]. Разликата се изразява в различното разпределение на генотипните честоти за полиморфен вариант *CYP3A5*3* в българската популация в сравнение с докладваните за Кавказката раса.

Имайки предвид, че наличието на функционални полиморфизми в гените *CYP2C19* и *CYP3A5* определя отговора към лечението с клопидогрел, някои изследователи препоръчат изборът на терапия да се основава на генотипа на пациента. Важно е да се отбележи, че повечето от тези проучвания са направени за западни популации, затова се отчита вероятността резултатите от подобни изследвания за българското население да бъдат различни.

Влиянието на *CYP2C19*2* върху клиничната ефикасност на клопидогрел е в съответствие с докладваните в литературата резултати. В научната литература съществуват и доклади, които са в противовес с получените от нас данни. В рандомизирано, двойно сляпо, плацебо-контролирано проучване, проведено при пациенти от Европа и Латинска Америка, Pare G et al.[437] съобщават, че *CYP2C19* генотип не оказва значително влияние върху ефекта от лечението с клопидогрел и следователно носителите на нефункционален алел не показват нежелани сърдечно-съдови събития. В друго проучване, проведено при 79 пациенти с ОКС, носителите на алел *CYP2C19*2* не са показали значително въздействие върху антитромбоцитния ефект на медикамента [438]. Множество фактори могат да обяснят несъответствието на резултатите, включително дизайна на проучването, участието на пациенти с ОКС, подложени или не на ПКИ, вида на метода за анализ на тромбоцитната агрегация, продължителността на проследяването, вариация в началната и поддържащата доза КЛД и не на последно масто – популационната група, която е била анализирана [438].

При някои от докладваните в литературата проучвания, свързани с вариабилността в отговора към терапия с клопидогрел, се цитира прилагането на по-високи дози от медикамента, добавяне или редуване на терапията с други антитромботични лекарства (напр. тикагрелол и цилостразол,) [439] и използването на индуктори на ензима CYP2C19 [440] при пациенти с нефункционални алели на *CYP2C19*. Според проучване на Cuisset et al. [441], увеличаването на дозата на клопидогрел при пациенти, подложени на ПКИ, които не са отговорили адекватно на лекарството, е ефективен вариант при тези, които не са носители на алел *CYP2C19*2*. В проучването на Park et al. [442] към терапията с клопидогрел е добавен и втори антитромбоцитен медикамент, цилостразол, което води до значително намаляване на тромбоцитната активност при пациенти, носещи, нефункционални алели.

За останалите значими асоциации, получени в резултат на работата по настоящия дисертационен труд, няма данни за връзка с терапевтичния отговор към КЛД. За потвърждаване на тези асоциации е необходимо разширяване на обема на изследваните групи и валидирането на получените резултати в независима група от пациенти.

Възможните патофизиологични механизми, които стоят в основата на т. нар. състояние на «резистентност» към терапия с клопидогрел са следните: нередовен прием на медикамента или неадекватно дозиране, което води до намалена бионаличност; промени в процеса на екскреция на активния метаболит на лекарството; усилване на механизмите за тромбоцитно активиране; повишена експресия на P2Y12 рецептори на повърхността на тромбоцитите в резултат на генетични промени; повишена секреция на АДФ от плътните гранули на тромбоцитите; промени в метаболизма на клопидогрел и производството на неговия активен метаболит чрез промени във функционалността на ензимите, отговорни за трансформацията на пролекарството; затлъстяване; повишени стойности на холестерол в кръвта; инсулинова резистентност [65]. Полиморфен вариант *CYP2C19*2* обяснява само 12% от междуиндивидуалните различия по отношение на терапията с клопидогрел, което показва, че съществуват и други генетични маркери, имащи отношение към ефикасността на антитромботичната терапия. Съвсем наскоро, Scripps Clinic проведе геномно асоциативно проучване при 392 пациенти на терапия с клопидогрел и са открити два нови гена *ATP2B2* и *TIAM2*, водещи до повишена тромбоцитна реактивност и тромбообразуване и съответно недостатъчен отговор към антитромботечна терапия с тиенопиридини (непубликувани данни). Всичко това предполага търсенето на нови вариации в генома, които да обясняват по-висок процент от вариабилността в отговора към антиагрегантна терапия.

Проведеното фармакогенетично проучване е пилотно за България и е необходимо потвърждаване на показаните асоциации в по-голяма група от пациенти, подложени на терапия с КЛД. Възможно е част от показалите първоначално асоциация с лечението варианти да отпаднат, докато при други да се засили влиянието им по отношение на отговора към лекарствена терапия с тиенопиридинови производни.

5.3.1. Локус 9p21

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. Musunuru 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 агрерометрия. 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 [443].

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 [443]. 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 [444]. 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 [445, 446].

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.

Връзката между генната експресия на некодиращата РНК *ANRIL* и носителството на определени полиморфни варианти в локус 9p21 е докладвана в различни проучвания и при различни етнически групи [450, 451]. Изследователската група на Jarinova и съавт. през 2009 год. съобщават, че консервативна последователност в рамките на този локус притежава активност на енхансер, и че асоциирания с нея хаплотип променя регулаторната последователност на ANRIL и повлиява нивата на експресия на тази РНК. Авторите предполагат, че по този начин експресионните промени на ANRIL корелират с промени в експресията на други гени, особено на тези, кодиращи протеини, участващи в пътищата, свързани с клетъчна пролиферация [452]. По този начин, рискови алели в региона 9p21.3 могат да действат като променят нивата ANRIL експресията и на свой ред потенциално да повлияят голямо разнообразие от реакции в съдовата патология.

Молекулното профилиране на локус 9p21 е задължително за идентифициране на патологично - асоциирания вариант, който надеждно се свързва със сърдечно-съдовата патология. Разбирането на молекулярната основа на участието на 9p21.3 в ССЗ може да има важни последици за изясняването, превенцията и лечението им, както и на свързаните с тях усложнения.

5.3.2. IL6R

Интерлевкин-6 (IL6) представлява многофункционален цитокин, който е от съществено значение за регулацията на имунния отговор, кръвообразуването и възпалителните реакции в тяхната остра фаза. При хората се кодира от гена *IL6* [453]. Протеинът се секретира от Т-клетките и макрофагите, които стимулират имунния отговор по време на инфекция или след травма, особено изгаряния или друго увреждане на тъканите, водещи до възпаление [453]. Интерлевкин 6 представлява провъзпалителелен цитокин, за който е известно, че променя експресията на гените за лекарствени транспортери в черния дроб. Възпалението е процес, който води до значително увреждане на основните пътища за чернодробната детоксикация на ксенобиотици, като по този начин оказва съществено влияние върху фармакокинетиката на лекарства и ксенобиотици [454]. Възпалителният процес се свързва с промени в чернодробната експресия на лекарство - метаболизиращите ензими, включително тези от групата на цитохром Р450 [455], както и на лекарствените транспортери [456, 457].

Интерлевкин 6 оказва своите въздействия посредством хетеродимерен рецептор, състоящ се от 2 мембранно-свързани гликопротеина, IL6R-α и GP130 (отговорен за сигналната трансдукция и стабилизирането на алфа-комплекса). Още през далечната 1988 год. Yamasaki et al. изолират кДНК на рецептора за интерлевкин-6. Авторите показват, че тази ДНК кодира протеин, състоящ се от 468 аминокиселини (АК), включително един сигнален пептид от около 19 АК и функционален домен от около 90 АК, подобен на домена на имуноглобулиновото суперсемейство. В цитоплазмения домен на IL6R, състоящ се от около 82 АК, липсва тирозин - киназен домен, за разлика от рецепторите за останалите растежни фактори [458].

Генът за IL6R се състои от 10 екзона. Функционални анализи на Schuster и съавт. от 2003 год. показват, че димерният IL6R съществува в плазмената мембрана в отсъствието на IL6 [459]. Свързването на лиганда IL6 към рецептора изглежда не оказва влияние върху димеризацията на IL6R. Авторите на научната публикация стигнат до заключението, че димеризацията на IL6R може да протече, както на повърхността на клетката, така и в разтвор [459].

Въз основа на генетичните доказателства при човек, IL6R сигнализацията изглежда има съществена роля в развитието на ИБС. Инхибирането на IL6R може да осигури нов терапевтичен подход за превенция на коронарна болест на сърцето, което дава основание за тестване в подходящо проведени, рандомизирани проучвания [460].

В нашето изследване ние установихме, че носителството на полиморфен алел Т 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 интегриновия 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 [456]

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 [456].

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 медиирани от възпаление промени в тяхната експресия и регулация [461].

Всъщност, лечението с проинфламаторния фактор липополизахарид (LPS) е установено, че води до по-ясно изразена промяна в чернодробната експресия на основните транспортерни протеини: в това число и на P-гликопротеин (ABCB1a). Проинфламаторните цитокини като интерлевкин IL -1α, тумор-некрозен фактор-α (TNF-α) и IL-6 вероятно допринасят за променена експресия на чернодробните лекарствени транспортери, настъпваща по време на възпаление. Прилагането на IL-1α, TNF- α, или IL-6 води до понижена експресия на различни синусоидални или каналикуларни лекарствени транспортери. По същия начин, третирането на човешки хепатоцити с IL-1α показва промена в експресията на някои основни чернодробни транспортери [456, 457].

Въпреки това, предположението, че TNF-α и IL-6 също повлияват човешки чернодробни транспортери остава не добре изяснено, въпреки че MDR1 (ABCB1), MRP2, и MRP3 (ABCC3) представляват основни таргети на TNF- α или IL-6 в някои човешки чернодробни клетъчни линии [462].

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 [463, 464] в допълнение към потискането на различни чернодробни и екстрахепатални лекарство-метаболизиращи ензими [465, 466].

Възпалението медиира промени в експресията на множество мембранно-свързани лекарствени транспортери, принадлежащи главно към ATP-свързващото касетно суперсемейство (ABCB) и суперсемейството 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 [467].

Транспортерите от групите на ABCB и SLC притежават широка субстратна специфичност и показват взаимодействия с множество клинично значими субстрати, включително антидиабетни медикаменти, антихистамини, статини, антиинфекциозни, антинеоплазмени, антиретровирусни съдови агенти, имуносупресори, стероиди, опиоиди, токсини и много глюкуронид-, глутатион- и сулфат-конюгирани метаболити [467].

5.3.3. eNOS

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 [468].

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 [469].

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 [469].

Предполага се, че ендогенните L-аргинин аналози (напр асиметричен диметиларгинин), които инхибират NOS активността, са замесени в активирането на тромбоцитите при пациенти с хипертония [469].

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 O2 - и/или пероксинитрит-генериращ ензим [469].

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. Ин витро е доказано, че NO произведен от тромбоцити само слабо инхибира активирането на тромбоцитите чрез колаген или тромбин. [470].

Изследванията, извършени с помощта на тромбоцити от eNOS-дефицитни мишки показват, че липсата на тромбоцитен NO променя хемостатичния отговор ин виво чрез увеличаване на на участието на тромбоцитите за подпомагане на eNO в регулацията на хемостазата [471].

Интересното е, че последните данни показват, че вместо предотвратяване на тромбоцитната активация и агрегация, eNO може действително да стимулира тромбоцити [472].

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 [473]. 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 e*NOS* да се свързва и с резистентността към клопидогрел.

Генът *eNOS* обхваща 21 Kbp и притежава 26 екзона. Локализиран е в хромозомен локус 7q35-36. Биологичната роля на eNOS при хипертонията е добре изяснена. Нокаут мишки с дефицит на eNOS, развиват хипертония като възрастни [474], докато индукция на eNOS кДНК при мишки води до понижаване на АН [475]. Геномна последователност на eNOS е високо полиморфна. Именно това е причината да се твърди, че полиморфизмите в гена *eNOS* могат да имат функционален потенциал да влияят върху крайната бионаличност на ензима и по този начин имат отношение към артериалното налягане (АН), а в конкретния случай и върху реактивността на тромбоцитите.

Редица клинични проучвания и експерименти с животни показват, че промяна в метаболизма на азотния окис (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 [475, 476].

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 Ca2+ -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.) [469]. 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 [477].

5.3.4. NPR3

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 A, B и C), които взаимодействат с три различни рецептора (НП рецептор А, НП рецептор В и НП рецептор С - NPRC) [478].

NPRC е определящ фактор за плазмената концентрация на НП. Локалната експресия на NPRC е свързана с дейността на НП в бъбреците. Вътреклетъчният домейн на NPRC модулира съкращението и релаксацията на гладкомускулните клетки. Генетични вариации в гена за NPRC вероятно имат отражение върху дейността на НП чрез повлияване на плазмените нива или NPRC - медиираните съдови ефекти. Генът за този рецептор - *NPR3,* се намира в хромозомен локус 5p14-p13. Той се простира върху 70 KB и съдържа осем екзона. В рамките на общата популация алелни варианти в гена *NPR3* се асоциират с артериална хипертония [479, 480].

Натриуретичните пептиди представляват къси аминокиселинни последователности, които участват в регулацията на кръвния обем, кръвно налягане, белодробна хипертония, сърдечната функция, както и някои метаболитни и растежни процеси. Множество транскрипционни варианти кодират различни изоформи на този ген [480-482].

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 [468].

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 [483].

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 [484].

Подобни резултати получават и Abaci и съавт [485]. 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 [486, 487].

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.

5.3.5. Гени, свързани с предразположение към диабет

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 [488].

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 T 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 A 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 [489]

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 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 [489].

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 [488].

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 дразнители, като по този начин допринасят за ускоряване на тромбопоезата в сравнение с недиабетици [488, 490].

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, острото 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 [488, 490].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 [488, 490].

5.3.6. *APOE*

В проведеното от нас проучване установихме, че носителството на полиморфен алел Т за rs7412 в гена *APOE* се свързва с близо четерикратно 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 Т 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 [491].

Това може да обясни получената от нас зависимост. Освен това съществуват проучвания, които докладват, че аполипопротеин(APO) 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 [492].

Както е известно, apo-E 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 [492].

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 [493].

Докато свободният аполипопротеин Е има слаб инхибиторен ефект по отношение на тромбоцитната реактивност, то комплексът от апоЕ и фосфолипиди (apo-E'DMPC) инхибира в по-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-E'DPMC 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 [493].

Съществуват предположения, според които извънклетъчният NO освободен от тромбоцитите посредством apoE стимулацията на NO-синтазната активност, има потенциал да функционира по паракринен начин. Също така, apoE би могъл да действа директно върху други видове клетки, за да предизвика производството на NO, включително и нервни клетки и Т-лимфоцити [493].

5.3.7. PHACTR1

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 ваимодействия между полиморфни варианти rs7865618 и rs1537378 в локус 9p21 (съответно алели A и T) 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 заболяванията. 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 хиляди промени в генома, които взети самостоятелно оказват изключително слаб ефект. Основната цел на генетиката на сърдечно-съдовите заболявания е идентифициране на промени в човешкия геном, имащи отношение към сърдечно-съдовите увреждания. Целта е в последствие 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. Проучванията 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 [494]. 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, не се променят с течение на времето и могат да се установят само веднъж, като това може да бъде в началото на живота, докато останалите конвенционални рискови фактори варират в голяма степен. Това би позволило промяната в начина на живот и прилагането на необходимите инвазивни и неинвазивни интервенции да започне 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 [494].

Генетичните проучвания представляват интересен подход, който може да подпомогне по-доброто разбиране на етиопатогенезата на сърдечно-съдовите заболявания и евентуално да позволи по-добра идентификация на високорисковите индивиди. Данните, публикувани до момента обаче не подкрепят категорично въвеждането в клиничната практика на рутинни изследвания за гореописаните 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 [495].

В заключение, целта на нашето проучване беше да се установят основните генетични фактори, оказващи влияние върху ефикасността от терапията с клопидогрел след тромбоза на стента в български пациенти. Беше проучена ролята на три базови замени в гените *CYP2C19* и *CYP3A5*, като само носителството на нефункционален алел *CYP2C19*2* показа съществено влияние върху антитромбоцитния ефект на клопидогрел. 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. Такива генетични фактори са наличие на полиморфни варианти в гените *PON1* и *ABCB1*, който също участват в метаболизма на КЛД до активен метаболит. Освен това е необходимо валидирането на получените асоциации за новоустановените полиморфни варианти в това проучване в независима група от пациенти.

С оглед по-прецизното определяне на влиянието на генетичните фактори върху ефикасността от лечението с клопидогрел, е необходимо проследяване във времето на пациентите, подложени на терапия, отчитане на странични реакции като кървене, тромбози или сърдечно-съдови усложнения, възникнали в хода на лечението. Това ще даде възможност за по-безопасно и ефикасно лечение на пациентите и избягване на странични ефекти от терапията.

Въпреки че алелните варианти *CYP2C19*2* и *CYP2C19*17* изглежда имат ограничено въздействие върху клопидогреловия отговор, възможността за подбор на подходящите антитромбоцитни медикаменти, които биха намалили повторните исхемични събития и кървене се дискутира непрекъснато. Съчетаното изследване на генотипа и фенотипа, както и конкретната клинична картина биха имали съществено значение за определяне на бъдещи клинични ползи, намаляване на лекарствени взаимодействия, както и избор на икономически ефикасна схема и доза [418].

Проучването на ролята на полиморфизмите в различни гени върху действието на лекарствения продукт, включително фармакокинетиката и фармакодинамиката му, би могло да помогне да се подобри ефикасността и безопасността при терапията с тези медикаменти.

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

6.1. 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% отвариабилността 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 (R2=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 метаболизатор на базата на генотипа и подобряване на ефективността при лечение с аценокумарол и клопидогрел.

6.2.4. Приноси с потвърдителен характер

6.2.4.1Потвърдена е връзката между носителството на полиморфен вариант *CYP2C19*2*, определящ слаб метаболизиращ фенотип, и недостатъчния или липсващ отговор към приложената антиагрегантна терапия с клопидогрел.

6.2.4.2Потвърдена е връзката на полиморфните варианти в гените *VKORC1* и *CYP2C9* с оптималтната доза аценокумарол при български пациенти с повишен риск от тромбози.

6.2.4.3Потвърдена е връзката мужду възрастта и изискването на по-ниски дози антикоагулант при възрастни пациенти.

6.2.4.4Анализирани 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*

7. *ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА*

[1] Allender S SP, Peto V, et al. European Cardiovascular disease statistics. 2008 Edition. British Heart Foundation Helath 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] Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. Nat Rev Cardiol. 2014 May;11(5):276-89.
[5] Hart RG, Aguilar MI. Anticoagulation in atrial fibrillation: selected controversies including optimal anticoagulation intensity, treatment of intracerebral hemorrhage. J Thromb Thrombolysis. 2008 Feb;25(1):26-32.
[6] Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. Annals of internal medicine. 2007 Jun 19;146(12):857-67.
[7] Gong I. Pharmacogenetics of Oral Anticoagulants and Antiplatelets 2013.
[8] Пенев М, Дукова-Пенева П. Лабораторна хематология. 2007.
[9] Di Nisio M, Middeldorp S, Buller HR. Direct thrombin inhibitors. The New England journal of medicine. 2005 Sep 8;353(10):1028-40.
[10] Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. The New England journal of medicine. 2009 Sep 17;361(12):1139-51.
[11] Laux V, Perzborn E, Kubitza D, Misselwitz F. Preclinical and clinical characteristics of rivaroxaban: a novel, oral, direct factor Xa inhibitor. Semin Thromb Hemost. 2007 Jul;33(5):515-23.
[12] Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. The New England journal of medicine. 2011 Sep 8;365(10):883-91.
[13] Rossi. Adelaide: Australian Medicines Handbook. 2006 [cited; Available from:
[14] Randall MD, Neil, Karen E Disease management. 2004 [cited; Available from:
[15] Mitri Z, Esmerian MO, Simaan JA, Sabra R, Zgheib NK. Pharmacogenetics and personalized medicine: the future for drug prescribing. Le Journal medical libanais. Apr-Jun;58(2):101-4.
[16] Schalekamp T, de Boer A. Pharmacogenetics of oral anticoagulant therapy. Current pharmaceutical design. 2010;16(2):187-203.
[17] Постаджиян А. Непосрещни нужди в антитромбоцитна терапия при лечението на остър коронарен синдром. Мединфо. 2011;бр.1.
[18] Topol EJS, Nicholas J. Catapulting clopidogrel pharmacogenomics forward. Nature Medicine 2011 [cited; Available from:
[19] Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Auerbach A, Raisch DW, Kim B, et al. Clopidogrel-associated TTP: an update of pharmacovigilance efforts conducted by independent researchers, pharmaceutical suppliers, and the Food and Drug Administration. Stroke. 2004 Feb;35(2):533-7.
[20] Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2004 Jul 24-30;364(9431):331-7.
[21] Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. N Engl J Med. 2000 Jun 15;342(24):1773-7.
[22] Committee CS. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). 1996 [cited; Available from:
[23] Hankey GJ. Current oral antiplatelet agents to prevent atherothrombosis. Cerebrovasc Dis. 2001;11 Suppl 2:11-7.
[24] Harker LA, Boissel JP, Pilgrim AJ, Gent M. Comparative safety and tolerability of clopidogrel and aspirin: results from CAPRIE. CAPRIE Steering Committee and Investigators. Clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events. Drug Saf. 1999 Oct;21(4):325-35.
[25] Sanofi-Synthelabo B-MSa. Clopidogrel (Plavix). 2007 [cited; Available from:
[26] Pare G, Ross S, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, et al. Effect of PON1 Q192R Genetic Polymorphism on Clopidogrel Efficacy and Cardiovascular Events in the Clopidogrel in the Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial and the Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial With Irbesartan for Prevention of Vascular Events. Circ Cardiovasc Genet. Apr 1;5(2):250-6.
[27] Chan MY, Tan K, Tan HC, Huan PT, Li B, Phua QH, et al. CYP2C19 and PON1 polymorphisms regulating clopidogrel bioactivation in Chinese, Malay and Indian subjects. Pharmacogenomics. Apr;13(5):533-42.
[28] Ancrenaz V, Desmeules J, James R, Fontana P, Reny JL, Dayer P, et al. Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. Br J Pharmacol. Mar 16.
[29] Camps J, Joven J, Mackness B, Mackness M, Tawfik D, Draganov D, et al. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. Nat Med. Sep;17(9):1041-2; author reply 2-4.

[30] Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. Nat Med. Sep;17(9):1040-1; author reply 2-4.
[31] Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Bonnet JL, Gachet C, Alessi MC. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. Nat Med. Sep;17(9):1039; author reply 42-4.
[32] Lewis JP, Fisch AS, Ryan K, O'Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. Paraoxonase 1 (PON1) gene variants are not associated with clopidogrel response. Clin Pharmacol Ther. Oct;90(4):568-74.
[33] Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, et al. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. Circ Cardiovasc Genet. Aug 1;4(4):429-36.
[34] Банкова А. Клопидогрел-съвременният антитромбоцитен медикамент. При кого? В каква доза? За колко дълго? Българска кардиология. 2010;Том XVI, Приложение 2:30-40.
[35] Ahmad T, Voora D, Becker RC. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? Nat Rev Cardiol. Oct;8(10):560-71.
[36] Steinhubl SR. Genotyping, clopidogrel metabolism, and the search for the therapeutic window of thienopyridines. Circulation. Feb 2;121(4):481-3.
[37] Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. Eur Heart J. Feb 27.
[38] Hulot JS, Collet JP, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, et al. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. Circ Cardiovasc Interv. Oct 1;4(5):422-8.
[39] Lewis JP, Shuldiner AR. Paraoxonase 1 Q192R Variant and Clopidogrel Efficacy: Fact or Fiction? Circ Cardiovasc Genet. Apr 1;5(2):153-5.
[40] Baas T. Once a PON-1 an enzyme Published online Jan 27 2011. 2011;SciBX 4(4); 10.1038/scibx.2011.93
[41] Beitelshees AL, Horenstein RB, Vesely MR, Mehra MR, Shuldiner AR. Pharmacogenetics and clopidogrel response in patients undergoing percutaneous coronary interventions. Clin Pharmacol Ther. Mar;89(3):455-9.
[42] Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. Pharmacogenetics and genomics. 2010 Jul;20(7):463-5.
[43] Osnabrugge RL, Kappetein AP, Janssens AC. Carriage of reduced-function CYP2C19 allele among patients treated with clopidogrel. Jama. Feb 2;305(5):467-8; author reply 8.
[44] Goswami S, Cheng-Lai A, Nawarskas J. Clopidogrel and genetic testing: is it necessary for everyone? Cardiol Rev. Mar-Apr;20(2):96-100.
[45] Geisler T, Bigalke B, Schwab M. CYP2C19 genotype and outcomes of clopidogrel treatment. N Engl J Med. Feb 3;364(5):481; author reply 2.
[46] Siasos G, Tousoulis D, Stefanadis C. CYP2C19 genotype and outcomes of clopidogrel treatment. N Engl J Med. Feb 3;364(5):481-2.
[47] Mega JL, Topol EJ, Sabatine MS. CYP2C19 genotype and cardiovascular events. Jama. Apr 11;307(14):1482-3; author reply 4-5.
[48] Shuldiner AR, Vesely MR, Fisch A. CYP2C19 genotype and cardiovascular events. Jama. Apr 11;307(14):1482; author reply 4-5.
[49] Хазърбасанов Д. Резистентност към клопидогрел. Клинично значение и терапевтични възможности. 2011 [cited http://bulsic.org]; Available from:
[50] 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. Thrombosis research. Apr;129(4):441-6.
[51] Постаджиян А. Антиагреганти при остър коронарен синдром – какво сочат доказателствата? Мединфо. 2012;брой 1.
[52] Гочева Н, Аврамов, Д., Паскалева Резистентност към лечението с аспирин и клопидогрел. Мединфо. 2008;бр.1
[53] Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. Chem Res Toxicol. Feb 20;25(2):348-56.
[54] 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.
[55] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. J Am Coll Cardiol. 2007 Apr 10;49(14):1505-16.
[56] Storey RF. Biology and pharmacology of the platelet P2Y12 receptor. Curr Pharm Des. 2006;12(10):1255-9.
[57] Alexopoulos D, Xanthopoulou I. Clopidogrel dosing based on genotype. Jama. Mar 14;307(10):1024; author reply -5.
[58] Д. Х. Вариабилност на клопидогреловия отговор след перкутанни коронарни интервенции при пациенти с исхемична болест на сърцето: литературен обзор. Българска кардиология. 2009;том XV(№1):10-7.
[59] Пехливанова Д-рМ, Георгиев д-р Борислав, Гочева доц. Нина. Клопидогрел дисулфат: приложение при остър коронарен синдром. 2010 [cited; Available from:
[60] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. Circulation. 2003 Jun 17;107(23):2908-13.

[61] Gurbel PA, Bliden KP. Durability of platelet inhibition by clopidogrel. Am J Cardiol. 2003 May 1;91(9):1123-5.
[62] П а с к а л е в а И, Д. Динева, Б. Георгиев и В. Байчева. Ефект на клопидогрел (ACTAVIS) върху АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация, проследена в 30-дневен период. 2008 [cited; Available from:
[63] П а с к а л е в а И, Д, Динева и Н. Гочева. . Оценка на антитромбоцитната терапия. Профилактика, диагностика, терапия – актуални проблеми 2008 [cited; Available from:
[64] Gurbel PA, Bliden KP, Etherington A, Tantry US. Assessment of clopidogrel responsiveness: measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients. Thromb Res. 2007;121(1):107-15.
[65] Papathanasiou A, Goudevenos J, Tselepis AD. Resistance to aspirin and clopidogrel: possible mechanisms, laboratory investigation, and clinical significance. Hellenic J Cardiol. 2007 Nov-Dec;48(6):352-63.
[66] Wenaweser P, Hess O. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. J Am Coll Cardiol. 2005 Sep 6;46(5):CS5-6.
[67] Tolleson TR, Newby LK, Harrington RA, Bhapkar MV, Verheugt FW, Berger PB, et al. Frequency of stent thrombosis after acute coronary syndromes (from the SYMPHONY and 2nd SYMPHONY trials). Am J Cardiol. 2003 Aug 1;92(3):330-3.
[68] Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. J Am Coll Cardiol. 2005 Jan 18;45(2):246-51.
[69] Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. Am J Cardiol. 2004 Feb 15;93(4):456-8.
[70] Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Platelet adenosine diphosphate P2Y12 receptor antagonism: benefits and limitations of current treatment strategies and future directions. Rev Esp Cardiol. Jan;63(1):60-76.
[71] 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.
[72] Kastrati A vBN, Joost A, et al. . Loading with 600 mg clopidogrel in patients with coronary artery disease with and without chronic clopidogrel therapy. 2004 [cited; Available from:
[73] Hochholzer W, Trenk D, Frundi D, Blanke P, Fischer B, Andris K, et al. Time dependence of platelet inhibition after a 600-mg loading dose of clopidogrel in a large, unselected cohort of candidates for percutaneous coronary intervention. Circulation. 2005 May 24;111(20):2560-4.
[74] 2: A. Higher clopidogrel dose prior to PCI improved outcomes. 2005 [cited; Available from:
[75] Kastrati A SA, Schomig E. . Are we making efficient use of clopidogrel? . 2004 [cited; Available from:
[76] Lee P-Y CW-H, Ng W, et al. . Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. 2005 [cited; Available from:
[77] Jinnai T, Horiuchi H, Makiyama T, Tazaki J, Tada T, Akao M, et al. Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan. Circ J. 2009 Aug;73(8):1498-503.
[78] 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.
[79] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol. 2000;1(6):REVIEWS3003.
[80] Hasler JA ER, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V,Helvig C, Falck JR, Farrell G, Kaminsky L S, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. . Human cytochromes P450. Molecular Aspects of Medicine. 1999 [cited; Available from:
[81] Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. Clin Pharmacokinet. 2002;41(12):913-58.
[82] Lewis N, Williams TD, Chipman K. Functional analysis of xenobiotic response elements (XREs) in CYP 1A of the European Flounder (Platichthys flesus). Mar Environ Res. 2004 Aug-Dec;58(2-5):101-5.
[83] Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacol Ther. 2007 Dec;116(3):496-526.
[84] Fox KA, Birkhead J, Wilcox R, Knight C, Barth JH. British Cardiac Society Working Group on the definition of myocardial infarction. Ann Clin Biochem. 2004 Jul;41(Pt 4):263-71.
[85] Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, et al. A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Jan;284(1):356-61.
[86] Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, Bell D, Krahn PM, et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. Pharmacogenetics. 1997 Feb;7(1):59-64.
[87] Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. Br J Clin Pharmacol. 2003 Dec;56(6):653-7.
[88] Oh IY, Park KW, Kang SH, Park JJ, Na SH, Kang HJ, et al. Association of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism with clopidogrel response variability and cardiovascular events in Koreans treated with drug-eluting stents. Heart. Jan;98(2):139-44.
[89] Kubota T, Chiba K, Ishizaki T. Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. Clin Pharmacol Ther. 1996 Dec;60(6):661-6.
[90] Herrlin K, Massele AY, Jande M, Alm C, Tybring G, Abdi YA, et al. Bantu Tanzanians have a decreased capacity to metabolize omeprazole and mephenytoin in relation to their CYP2C19 genotype. Clin Pharmacol Ther. 1998 Oct;64(4):391-401.

[91] Brackbill ML, Kidd RS, Abdoo AD, Warner JG, Jr., Harralson AF. Frequency of CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, and CYP2C19 variant alleles in patients receiving clopidogrel that experience repeat acute coronary syndrome. Heart Vessels. 2009 Mar;24(2):73-8.
[92] Edeki TI, Goldstein JA, de Morais SM, Hajiloo L, Butler M, Chapdelaine P, et al. Genetic polymorphism of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in African-Americans. Pharmacogenetics. 1996 Aug;6(4):357-60.
[93] Califf RM, Abdelmeguid AE, Kuntz RE, Popma JJ, Davidson CJ, Cohen EA, et al. Myonecrosis after revascularization procedures. J Am Coll Cardiol. 1998 Feb;31(2):241-51.
[94] 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. Clin Pharmacol Ther. 2006 Jan;79(1):103-13.
[95] Frere C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi MC, Hulot JS. The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. J Thromb Haemost. 2009 Aug;7(8):1409-11.
[96] Li Y, Tang HL, Hu YF, Xie HG. The gain-of-function variant allele CYP2C19*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. J Thromb Haemost. Feb;10(2):199-206.
[97] Park J. Backtracking on CYP2C19 genotyping in clopidogrel therapy? Biomark Med. Dec;4(6):791.
[98] Mega JL, Close SL, 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] 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.
[100] Osman A. Studies on warfarin treatment with emphasis on interindividual variations and drug monitoring. Linköping University Medical Dissertations No 1000 ISBN: 978-91-85715-45-9 ISSN: . 2007.
[101] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. Lancet. 2010 Oct 16;376(9749):1312-9.
[102] Jaitner J, Morath T, Byrne RA, Braun S, Gebhard D, Bernlochner I, et al. No association of ABCB1 C3435T genotype with clopidogrel response or risk of stent thrombosis in patients undergoing coronary stenting. Circulation. 2012 Feb 1;5(1):82-8, S1-2.
[103] Herbert JM, Savi P. P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. Seminars in vascular medicine. 2003 May;3(2):113-22.
[104] Ziegler S, Schillinger M, Funk M, Felber K, Exner M, Mlekusch W, et al. Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y12, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2005 Jul;36(7):1394-9.
[105] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, et al. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. Thrombosis research. 2005;116(6):491-7.
[106] Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. Nature medicine. 2011 Jan;17(1):110-6.
[107] Sibbing D, Steinhubl SR, Schulz S, Schomig A, Kastrati A. Platelet aggregation and its association with stent thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients: initial evidence of a therapeutic window. Journal of the American College of Cardiology. Jul 20;56(4):317-8.
[108] Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, et al. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. J Thromb Haemost. Aug;8(8):1685-93.
[109] Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. N Engl J Med. 2005 Mar 24;352(12):1179-89.
[110] 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.
[111] Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, et al. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. J Thromb Haemost. Feb;8(2):250-6.
[112] Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluis-Ganella C, Lucas G, Tomas M, et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. Heart. Jan;98(2):100-8.
[113] Kim KA, Park PW, Park JY. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and antiplatelet effect of clopidogrel in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol. 2008 Jun;64(6):589-97.
[114] Namazi S, Kojuri J, Khalili A, Azarpira N. The impact of genetic polymorphisms of P2Y12, CYP3A5 and CYP2C19 on clopidogrel response variability in Iranian patients. Biochem Pharmacol. Apr 1;83(7):903-8.
[115] Smith SM, Judge HM, Peters G, Armstrong M, Fontana P, Gaussem P, et al. Common sequence variations in the P2Y12 and CYP3A5 genes do not explain the variability in the inhibitory effects of clopidogrel therapy. Platelets. 2006 Jun;17(4):250-8.
[116] Kangelaris KN, Bent S, Nussbaum RL, Garcia DA, Tice JA. Genetic testing before anticoagulation? A systematic review of pharmacogenetic dosing of warfarin. J Gen Intern Med. 2009 May;24(5):656-64.

[117] Pengo V, Pegoraro C, Cucchini U, Iliceto S. Worldwide management of oral anticoagulant therapy: the ISAM study. Journal of thrombosis and thrombolysis. 2006 Feb;21(1):73-7.
[118] Esmerian MO, Mitri Z, Habbal MZ, Geryess E, Zaatari G, Alam S, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on warfarin and acenocoumarol in a sample of Lebanese people. J Clin Pharmacol. 2011 Oct;51(10):1418-28.
[119] Gage BF, Lesko LJ. Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. J Thromb Thrombolysis. 2008 Feb;25(1):45-51.
[120] Kovac MK, Rakicevic LB, Radojkovic DP. Extreme sensitivity to acenocoumarol therapy in patient with both VKORC.-1639 A/A and CYP2C9*1/*3 genotypes. Journal of thrombosis and thrombolysis. 2011 Oct;32(3):368-71.
[121] van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP, Briet E. Assessment of a bleeding risk index in two cohorts of patients treated with oral anticoagulants. Thromb Haemost. 1996 Jul;76(1):12-6.
[122] Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. Circulation. 2007 May 29;115(21):2689-96.
[123] Li T, Lange LA, Li X, Susswein L, Bryant B, Malone R, et al. Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. J Med Genet. 2006 Sep;43(9):740-4.
[124] Levine MN, Raskob G, Landefeld S, Kearon C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. Chest. 1998 Nov;114(5 Suppl):511S-23S.
[125] Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, Watson MS, Flockhart DA, Gage B, et al. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. Genet Med. 2008 Feb;10(2):139-50.
[126] 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.
[127] 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.
[128] 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.
[129] 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.
[130] 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.
[131] 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.
[132] 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. Thromb Haemost. 2013 Jan;109(1):146-53.
[133] 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.
[134] Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Pharmacogenetic aspects of coumarinic oral anticoagulant therapies. Indian J Clin Biochem. 2011 Jul;26(3):222-9.
[135] Bazan NS, Sabry NA, Rizk A, Mokhtar S, Badary O. Validation of pharmacogenetic algorithms and warfarin dosing table in Egyptian patients. Int J Clin Pharm. 2012 Dec;34(6):837-44.
[136] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. Blood. 2005 Jul 1;106(1):135-40.
[137] 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.
[138] Kaur A, Khan F, Agrawal SS, Kapoor A, Agarwal SK, Phadke SR. Cytochrome P450 (CYP2C9*2,*3) & vitamin-K epoxide reductase complex (VKORC1 -1639G<A) gene polymorphisms & their effect on acenocoumarol dose in patients with mechanical heart valve replacement. Indian J Med Res. 2013 Jan;137(1):203-9.
[139] Kovac MK, Maslac AR, Rakicevic LB, Radojkovic DP. The c.-1639G>A polymorphism of the VKORC1 gene in Serbian population: retrospective study of the variability in response to oral anticoagulant therapy. Blood Coagul Fibrinolysis. 2010 Sep;21(6):558-63.
[140] Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, Chahid Y, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. Clin Pharmacol Ther. 2006 Jul;80(1):13-22.
[141] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. N Engl J Med. 2005 Jun 2;352(22):2285-93.
[142] Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. J Thromb Haemost. 2007 Nov;5(11):2227-34.
[143] Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Valle B, Bandres F, Calvo E, et al. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. PloS one. 2010;5(6):e11210.

[144] Perez-Andreu V, Roldan V, Anton AI, Garcia-Barbera N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. Blood. 2009 May 14;113(20):4977-9.
[145] Pavani A, Naushad SM, Mishra RC, Malempati AR, Pinjala R, Kumar TR, et al. Retrospective evidence for clinical validity of expanded genetic model in warfarin dose optimization in a South Indian population. Pharmacogenomics. 2012 Jun;13(8):869-78.
[146] Sconce E, Avery P, Wynne H, Kamali F. Vitamin K supplementation can improve stability of anticoagulation for patients with unexplained variability in response to warfarin. Blood. 2007 Mar 15;109(6):2419-23.
[147] Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, Hofman A, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. Human molecular genetics. 2009 Oct 1;18(19):3758-68.
[148] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. Human genetics. 2007 Mar;121(1):23-34.
[149] Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PK, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. The pharmacogenomics journal. 2004;4(1):40-8.
[150] Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science. 1988 Apr 29;240(4852):622-30.
[151] Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. Indian J Med Res. Oct;132:363-78.
[152] 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.
[153] Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis. 1988 Jan-Feb;8(1):1-21.
[154] Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2002 Mar 15;155(6):487-95.
[155] D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M. Oral anticoagulants: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors. Blood Rev. 2008 May;22(3):127-40.
[156] Vecsler M, Loebstein R, Almog S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. Thrombosis and haemostasis. 2006 Feb;95(2):205-11.
[157] Khwaiter SH. Risk factors associated with coronary artery disease in Gaza. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biological Sciences- Medical Technology. 2009.
[158] Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. European heart journal. Nov 7;35(42):2950-9.
[159] Илиев РВ. Реваскуларизация на миокарда без екстракорпорално кръвообръщение. Дисертационен труд. 2012.
[160] Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. Circulation. 2000 Jan 25;101(3):329-35.
[161] Dominiczak AF, Munroe PB. Genome-wide association studies will unlock the genetic basis of hypertension: pro side of the argument. Hypertension. 2010 Dec;56(6):1017-20; discussion 25.
[162] Ehret GB, Caulfield MJ. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. European heart journal. 2013 Apr;34(13):951-61.
[163] Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell. 2001 Feb 23;104(4):545-56.
[164] Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. Annals of internal medicine. 2003 Nov 4;139(9):761-76.
[165] Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF, Rodriguez-Iturbe B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. The New England journal of medicine. 2002 Mar 21;346(12):913-23.
[166] Матеев Х, Гочева, Н. Артериална хипертония – позната и не съвсем. Медикарт. 2011;V(6):12-6.
[167] Ръководство за поведение на общопрактикуващия лекар при артериална хипертония
Национално сдружение на общопрактикуващите лекари в България 2007.
[168] Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Journal of hypertension. 2013 Jul;31(7):1281-357.
[169] McCarthy MI, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. Hum Mol Genet. 2008 Oct 15;17(R2):R156-65.
[170] Dube JB, Hegele RA. Genetics 100 for cardiologists: basics of genome-wide association studies. Can J Cardiol. Jan;29(1):10-7.
[171] Ганев В. Нови генетични маркери за атеросклероза. *От науката до леглото наболния - принципи на поведение при социално-значимите заболявания в ежедневната практика - профилактика, диагностика, терапия и актуални проблеми*. София: Хавитис 2006:31-9.
[172] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. Science (New York, NY. 2007 Jun 8;316(5830):1491-3.
[173] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. Science (New York, NY. 2007 Jun 8;316(5830):1488-91.

[174] Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, Vidaud M, Vidaud D, Bieche I. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. Cancer Res. 2007 Apr 15;67(8):3963-9.
[175] Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. Trends Genet. 2013 Jun;28(6):267-75.
[176] 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.
[177] 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.
[178] Hiura Y, Fukushima Y, Yuno M, Sawamura H, Kokubo Y, Okamura T, et al. Validation of the association of genetic variants on chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial infarction in a Japanese population. Circ J. 2008 Aug;72(8):1213-7.
[179] Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. Hum Mol Genet. 2008 Aug 1;17(15):2320-8.
[180] Saleheen D, Alexander M, Rasheed A, Wormser D, Soranzo N, Hammond N, et al. Association of the 9p21.3 locus with risk of first-ever myocardial infarction in Pakistanis: case-control study in South Asia and updated meta-analysis of Europeans. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jul;30(7):1467-73.
[181] Ogawa N, Imai Y, Morita H, Nagai R. Genome-wide association study of coronary artery disease. International journal of hypertension. 2010;2010:790539.
[182] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. PLoS Genet. 2010;6(12):e1001233.
[183] Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. J Neurooncol. 2001 Feb;51(3):219-29.
[184] Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. Nature genetics. 2008 Dec;40(12):1472-7.
[185] 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.
[186] Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. Stroke. 2008 May;39(5):1586-9.
[187] Wahlstrand B, Orho-Melander M, Delling L, Kjeldsen S, Narkiewicz K, Almgren P, et al. The myocardial infarction associated CDKN2A/CDKN2B locus on chromosome 9p21 is associated with stroke independently of coronary events in patients with hypertension. J Hypertens. 2009 Apr;27(4):769-73.
[188] Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Krischek B, Auburger G, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. Nature genetics. 2010 May;42(5):420-5.
[189] 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.
[190] 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.
[191] 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.
[192] Ardissino D, Berzuini C, Merlini PA, Mannuccio Mannucci P, Surti A, Burtt N, et al. Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. Jul 19;58(4):426-34.
[193] Consortium. CADCDG. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. Nature genetics. 2011 Apr;43(4):339-44.
[194] Schunkert H, Konig IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. Nature genetics. 2011 Apr;43(4):333-8.
[195] Barbalic M, Reiner AP, Wu C, Hixson JE, Franceschini N, Eaton CB, et al. Genome-wide association analysis of incident coronary heart disease (CHD) in African Americans: a short report. PLoS Genet. 2011 Aug;7(8):e1002199.
[196] Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, et al. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. Lancet. 2011 Jan 29;377(9763):383-92.
[197] Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. J Thromb Haemost. 2008 Jan;6(1):62-9.
[198] Wauters E, Carruthers KF, Buysschaert I, Dunbar DR, Peuteman G, Belmans A, et al. Influence of 23 coronary artery disease variants on recurrent myocardial infarction or cardiac death: the GRACE Genetics Study. Eur Heart J. 2012 Nov 15.
[199] Davies RW, Wells GA, Stewart AF, Erdmann J, Shah SH, Ferguson JF, et al. A genome-wide association study for coronary artery disease identifies a novel susceptibility locus in the major histocompatibility complex. Circ Cardiovasc Genet. 2012 Apr 1;5(2):217-25.
[200] Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. The New England journal of medicine. 2007 Aug 2;357(5):443-53.

[201] Prasannan P, Pike S, Peng K, Shane B, Appling DR. Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary calls. J Biol Chem. 2003 Oct 31;278(44):43178-87.
[202] Walkup AS, Appling DR. Enzymatic characterization of human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. Arch Biochem Biophys. 2005 Oct 15;442(2):196-205.
[203] Randak C, Roschinger W, Rolinski B, Hadorn HB, Applegarth DA, Roscher AA. Three siblings with nonketotic hyperglycinaemia, mildly elevated plasma homocysteine concentrations and moderate methylmalonic aciduria. J Inherit Metab Dis. 2000 Jul;23(5):520-2.
[204] Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. Circulation. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III15-9.
[205] Tiret L, Godefroy T, Lubos E, Nicaud V, Tregouet DA, Barbaux S, et al. Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. Circulation. 2005 Aug 2;112(5):643-50.
[206] Shivani Vats VSaAB. Genetic Links between Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes 2013.
[207] Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. Nature genetics. 2009 Jun;41(6):677-87.
[208] Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. Nature genetics. 2009 Jun;41(6):666-76.
[209] Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. Nature. 2011 Oct 6;478(7367):103-9.
[210] Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganev 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.
[211] Newton-Cheh C JT, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS,, Zhao JH HS, Eyheramendy S, Papadakis K, Voight BF, Scott LJ, Zhang F,, Farrall M TT, Wallace C, Chambers JC, Khaw KT, Nilsson P, van der Harst P,, Polidoro S GD, Onland-Moret NC, Bots ML, Wain LV, Elliott KS, Teumer A, , Luan J LG, Kuusisto J, Burton PR, Hadley D, McArdle WL; Wellcome Trust Case, Control Consortium BM, Dominiczak A, Newhouse SJ, Samani NJ, Webster J,, et al. Genome-wide association study identifies eight loci
associated with blood pressure. Nat Genet. 2009 Jun;41(6):666-76. doi:
10.1038/ng.361. Epub 2009 May 10. PubMed PMID: 19430483; PubMed Central PMCID:
PMC2891673. 2009.
[212] 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.
[213] Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. Hypertension. 2012 Feb;59(2):248-55.
[214] Tabara Y, Kohara K, Kita Y, Hirawa N, Katsuya T, Ohkubo T, et al. Common variants in the ATP2B1 gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. Hypertension. 2010 Nov;56(5):973-80.
[215] Tabara Y, Kohara K, Miki T. Hunting for genes for hypertension: the Millennium Genome Project for Hypertension. Hypertens Res. 2012 Jun;35(6):567-73.
[216] Takeuchi F, Isono M, Katsuya T, Yamamoto K, Yokota M, Sugiyama T, et al. Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population. Circulation. 2010 Jun 1;121(21):2302-9.
[217] Hong KW, Jin HS, Lim JE, Kim S, Go MJ, Oh B. Recapitulation of two genomewide association studies on blood pressure and essential hypertension in the Korean population. J Hum Genet. 2010 Jun;55(6):336-41.
[218] Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. Nat Genet. 2011 Jun;43(6):531-8.
[219] Динева Д, Паскалева, И. , Гочева, Н., Байчева В. и Георгиев, Б. , . Тромбоцитен отговор при лечение с клопидогрел и аспирин при пациенти с имплантирани коронарни стентове , оценен чрез импедансна агрегометрия на апарат Multiplate Българска кардиология. 2011;XVII(2):16-25.
[220] Д и н е в а Д. Мониториране на тромбоцитната активност чрез импедансна агрегометрия при лечение с клопидогрел и/или аспирин при високо рискови пациенти с коронарна артериална болест. Автореферат. 2013.
[221] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet. 2007 Sep;81(3):559-75.
[222] Йосифова АГ. "Асоциативно проучване на кандидат гени и цялостен геномен скрининг при пациенти с биполярно афективно разстройство". Медицински университет - София; 2011.
[223] Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. Am J Hum Genet. 2001 Jul;69(1):138-47.
[224] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.
[225] 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.

[226] П а с к а л е в а И, Д. Динева, Б. Георгиев и В. Байчева. Ефект на клопидогрел (ACTAVIS) върху АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация, проследена в 30-дневен период. Наука кардиология. 2008;3:140-4.
[227] 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.
[228] 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.
[229] 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.
[230] Торбова С. БЛ, Байчев В. Артериална хипертония и исхемична болест на сърцето. Медицински преглед. 1997(28 (4):):3-11.
[231] Берберян КМ. Исхемична болест на сърцето. Дисертация за присъждане на научна и образователна степен "Доктор". 2000.
[232] 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.
[233] Roberts R. Genetics of coronary artery disease: an update. Methodist DeBakey cardiovascular journal. 2014 Jan-Mar;10(1):7-12.
[234] Lieb W, Jansen H, Loley C, Pencina MJ, Nelson CP, Newton-Cheh C, et al. Genetic predisposition to higher blood pressure increases coronary artery disease risk. Hypertension. 2013 May;61(5):995-1001.
[235] 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.
[236] 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.
[237] Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya IV, Kozhuhov MA, Ivakin VE, et al. A common polymorphism G-50T in cytochrome P450 2J2 gene is associated with increased risk of essential hypertension in a Russian population. Dis Markers. 2008;24(2):119-26.
[238] 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.
[239] Alghasham A, Ali A, Ismail H, Dowaidar M, Settin AA. CYP2J2 -50 G/T and ADRB2 G46A gene polymorphisms in Saudi subjects with hypertension. Genet Test Mol Biomarkers. 2012 Sep;16(9):1027-31.
[240] 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.
[241] Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. Curr Opin Cardiol. 1994 Sep;9(5):619-26.
[242] 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.
[243] 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.
[244] Naraharisetti SB, Lin YS, Rieder MJ, Marciante 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.
[245] Heo SG, Hwang JY, Uhmn 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.
[246] 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.
[247] 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.
[248] 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.
[249] Graner M, Kahri J, Varpula M, Salonen RM, Nyyssonen 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.
[250] 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.
[251] 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.
[252] 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.
[253] 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.

[254] 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.
[255] 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 hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences. 2004 Jun;19(2):150-4.
[256] 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.
[257] 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.
[258] Stengard JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. Hum Genet. 1998 Aug;103(2):234-41.
[259] Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. Am J Cardiol. 1993 Jan 15;71(2):160-5.
[260] Lehtinen S, Luoma P, Nayha S, Hassi J, Ehnholm C, Nikkari T, et al. Apolipoprotein A-IV polymorphism in Saami and Finns: frequency and effect on serum lipid levels. Ann Med. 1998 Apr;30(2):218-23.
[261] Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. Ann Intern Med. 2004 Jul 20;141(2):137-47.
[262] Mooijaart SP, Berbee JF, van Heemst D, Havekes LM, de Craen AJ, Slagboom PE, et al. ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. PLoS Med. 2006 Jun;3(6):e176.
[263] 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.
[264] Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. Biochimie. 2012 Oct;94(10):2157-63.
[265] 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.
[266] Philippova M, Joshi MB, Pfaff D, Kyriakakis E, Maslova K, Erne P, et al. T-cadherin attenuates insulin-dependent signalling, eNOS activation, and angiogenesis in vascular endothelial cells. Cardiovascular research. 2012 Mar 1;93(3):498-507.
[267] Harris AR, Peter L, Bellis J, Baum B, Kabla AJ, Charras GT. Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012 Oct 9;109(41):16449-54.
[268] Gao H, Kim YM, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. Diabetes. 2013 Dec;62(12):4277-83.
[269] Uetani E, Tabara Y, Kawamoto R, Onuma H, Kohara K, Osawa H, et al. CDH13 genotype-dependent association of high-molecular weight adiponectin with all-cause mortality: the J-SHIPP study. Diabetes care. 2014 Feb;37(2):396-401.
[270] 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.
[271] 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.
[272] 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.
[273] Chaudhary J, Walia M, Matharu J, Escher E, Grover AK. Caloxin: a novel plasma membrane Ca2+ pump inhibitor. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Apr;280(4):C1027-30.
[274] Liu L, Ishida Y, Okunade G, Shull GE, Paul RJ. Role of plasma membrane Ca2+-ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Apr;290(4):C1239-47.
[275] Carafoli E. The Ca2+ pump of the plasma membrane. J Biol Chem. 1992 Feb 5;267(4):2115-8.
[276] Gros R, Afroze T, You XM, Kabir G, Van Wert R, Kalair W, et al. Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure. Circ Res. 2003 Oct 3;93(7):614-21.
[277] Fontana V, McDonough CW, Gong Y, El Rouby NM, Sa AC, Taylor KD, et al. Large-scale gene-centric analysis identifies polymorphisms for resistant hypertension. Journal of the American Heart Association. 2014 Dec;3(6):e001398.
[278] Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. Cardiovascular research. 2007 Jul 15;75(2):247-60.
[279] Consortium TCADCDG. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. Nature genetics. 2011 Apr;43(4):339-44.
[280] Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. Nature genetics. 2009 Mar;41(3):334-41.
[281] 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.
[282] Ran C, Graae L, Magnusson PK, Pedersen NL, Olson L, Belin AC. A replication study of GWAS findings in migraine identifies association in a Swedish case-control sample. BMC medical genetics. 2014;15:38.

[283] Allen PB, Greenfield AT, Svenningsson P, Haspeslagh DC, Greengard P. Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004 May 4;101(18):7187-92.
[284] Pechlivanis S, Muhleisen TW, Mohlenkamp S, Schadendorf D, Erbel R, Jockel KH, et al. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. BMC medical genetics. 2013;14:23.
[285] Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. Journal of molecular and cellular cardiology. 1997 Jan;29(1):265-72.
[286] Niemiec P, Gorczynska-Kosiorz S, Iwanicki T, Krauze J, Trautsolt W, Grzeszczak W, et al. The rs10757278 polymorphism of the 9p21.3 locus is associated with premature coronary artery disease in Polish patients. Genet Test Mol Biomarkers. Sep;16(9):1080-5.
[287] Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, et al. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. J Hum Genet. 2008;53(4):357-9.
[288] 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.
[289] Roberts R, Stewart AF. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. Clin Chem. 2012 Jan;58(1):104-12.
[290] Dandona S, Stewart AF, Chen L, Williams K, So D, O'Brien E, et al. Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 2010 Aug 3;56(6):479-86.
[291] Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, et al. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. Jama. 1994 Apr 6;271(13):999-1003.
[292] Sesso HD SM, Rosner B, Hennekens CH,, Gaziano JM MJ, Glynn RJ. Systolic and
diastolic blood pressure, pulse pressure, and
mean arterial pressure as predictors of cardiovascular
disease risk in men. Hypertension. 2000;36:
801–7.
[293] Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. Jama. 2009 Nov 11;302(18):1993-2000.
[294] Consortium WTCC. Genome-wide association
study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared
controls. Nature. 2007;447:661– 678.
[295] Folkersen L, Kyriakou T, Goel A, Peden J, Malarstig A, Paulsson-Berne G, et al. Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. PloS one. 2009;4(11):e7677.
[296] Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. Feb;32(2):196-206.
[297] Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. Molecular cell. 2010 Jun 11;38(5):662-74.
[298] 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). Annals of human genetics. 2008 Sep;72(Pt 5):654-7.
[299] 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.
[300] 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.
[301] Olsson S, Csajbok LZ, Jood K, Nylen 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.
[302] 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.
[303] 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.
[304] 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.
[305] Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology. Journal of lipid research. 2008 Jul;49(7):1595-9.
[306] Joffe HV, Xu R, Johnson FB, Longtine J, Kucher N, Goldhaber SZ. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. Thromb Haemost. 2004 Jun;91(6):1123-8.
[307] Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. The Journal of biological chemistry. 2006 Mar 10;281(10):6211-8.

[308] Brautbar A, Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. Nature reviews. 2011 May;8(5):253-65.
[309] Lambert G, Charlton F, Rye KA, Piper DE. Molecular basis of PCSK9 function. Atherosclerosis. 2009 Mar;203(1):1-7.
[310] Costet P, Krempf M, Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. Trends in biochemical sciences. 2008 Sep;33(9):426-34.
[311] Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. The Journal of clinical investigation. 2006 Nov;116(11):2995-3005.
[312] Liang H, Chaparro-Riggers J, Strop P, Geng T, Sutton JE, Tsai D, et al. Proprotein convertase substilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2012 Feb;340(2):228-36.
[313] Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. The Biochemical journal. 2007 Sep 1;406(2):203-7.
[314] Essalmani R, Susan-Resiga D, Chamberland A, Abifadel M, Creemers JW, Boileau C, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. The Journal of biological chemistry. 2011 Feb 11;286(6):4257-63.
[315] Mayne J, Dewpura T, Raymond A, Bernier L, Cousins M, Ooi TC, et al. Novel loss-of-function PCSK9 variant is associated with low plasma LDL cholesterol in a French-Canadian family and with impaired processing and secretion in cell culture. Clinical chemistry. 2011 Oct;57(10):1415-23.
[316] Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. The Journal of biological chemistry. 2004 Nov 26;279(48):50630-8.
[317] Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. Journal of lipid research. 2003 Nov;44(11):2109-19.
[318] Schiffrin EL. Endothelin in hypertension. Curr Opin Cardiol. 1995 Sep;10(5):485-94.
[319] Schiffrin EL. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Hypertension. 1995 Jun;25(6):1135-43.
[320] Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM. Endothelin-1 gene expression and vascular hypertrophy in DOCA-salt hypertension compared to spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 1995 Dec;22(1):S188-90.
[321] 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.
[322] 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.
[323] 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.
[324] Milicevic Z, Raz I, Beattie SD, Campaigne BN, Sarwat S, Gromniak E, et al. Natural history of cardiovascular disease in patients with diabetes: role of hyperglycemia. Diabetes care. 2008 Feb;31 Suppl 2:S155-60.
[325] Pechlivanis S, Muhleisen TW, Mohlenkamp S, Schadendorf D, Erbel R, Jockel KH, et al. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. BMC medical genetics.14:23.
[326] Amoli MM, Amiri P, Tavakkoly-Bazzaz J, Charmchi E, Hafeziyeh J, Keramatipour M, et al. Replication of TCF7L2 rs7903146 association with type 2 diabetes in an Iranian population. Genetics and molecular biology. 2010 Jul;33(3):449-51.
[327] Potapov VA, Shamkhalova MN, Smetanina SA, Bel'chikova LN, Suplotova LA, Shestakova MV, et al. [Polymorphic markers TCF7L2 rs12255372 and SLC30A8 rs13266634 confer susceptibility to type 2 diabetes in a Russian population]. Genetika. 2010 Aug;46(8):1123-31.
[328] Gambino R, Bo S, Gentile L, Musso G, Pagano G, Cavallo-Perin P, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) polymorphism and hyperglycemia in an adult Italian population-based cohort. Diabetes care. 2010 Jun;33(6):1233-5.
[329] Ereqat S, Nasereddin A, Cauchi S, Azmi K, Abdeen Z, Amin R. Association of a common variant in TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus in the Palestinian population. Acta diabetologica. 2010 Dec;47 Suppl 1:195-8.
[330] Chang YC, Chiu YF, Ho LL, Ting CT, Shih KC, Curb JD, et al. TCF7L2 genetic variants and progression to diabetes in the Chinese population: pleiotropic effects on insulin secretion and insulin resistance. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2010 Feb;88(2):183-92.
[331] Bouhaha R, Choquet H, Meyre D, Abid Kamoun H, Ennafaa H, Baroudi T, et al. TCF7L2 is associated with type 2 diabetes in nonobese individuals from Tunisia. Pathologie-biologie. 2010 Dec;58(6):426-9.
[332] Bielinski SJ, Pankow JS, Folsom AR, North KE, Boerwinkle E. TCF7L2 single nucleotide polymorphisms, cardiovascular disease and all-cause mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Diabetologia. 2008 Jun;51(6):968-70.
[333] Sousa AG, Marquezine GF, Lemos PA, Martinez E, Lopes N, Hueb WA, et al. TCF7L2 polymorphism rs7903146 is associated with coronary artery disease severity and mortality. PloS one. 2009;4(11):e7697.
[334] Ангелова ОА. Асоциативно проучване на полиморфни варианти в гени за адипокини при диабет на бременността. Дипломна работа за придобиване на научно-образователна степен "магистър". 2012(ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА, МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ).
[335] Hart Sailors ML, Folsom AR, Ballantyne CM, Hoelscher DM, Jackson AS, Linda Kao WH, et al. Genetic variation and decreased risk for obesity in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Diabetes Obes Metab. 2007 Jul;9(4):548-57.
[336] Marquezine GF, Pereira AC, Sousa AG, Mill JG, Hueb WA, Krieger JE. TCF7L2 variant genotypes and type 2 diabetes risk in Brazil: significant association, but not a significant tool for risk stratification in the general population. BMC medical genetics. 2008;9:106.

[337] Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, Novelli G, et al. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. Acta diabetologica. 2013 Oct;50(5):789-99.
[338] Muendlein A, Saely CH, Geller-Rhomberg S, Sonderegger G, Rein P, Winder T, et al. Single nucleotide polymorphisms of TCF7L2 are linked to diabetic coronary atherosclerosis. PloS one. 2011;6(3):e17978.
[339] Pechlivanis S, Scherag A, Muhleisen TW, Mohlenkamp S, Horsthemke B, Boes T, et al. Coronary artery calcification and its relationship to validated genetic variants for diabetes mellitus assessed in the Heinz Nixdorf recall cohort. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2010 Sep;30(9):1867-72.
[340] Friedlander Y, Li G, Fornage M, Williams OD, Lewis CE, Schreiner P, et al. Candidate molecular pathway genes related to appetite regulatory neural network, adipocyte homeostasis and obesity: results from the CARDIA Study. Ann Hum Genet. Sep 1;74(5):387-98.
[341] Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J, et al. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin. Diabetes. 1998 May;47(5):847-50.
[342] Gu HF, Abulaiti A, Ostenson CG, Humphreys K, Wahlestedt C, Brookes AJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. Diabetes. 2004 Feb;53 Suppl 1:S31-5.
[343] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab. 2001 May;86(5):1930-5.
[344] Schondorf T, Maiworm A, Emmison N, Forst T, Pfutzner A. Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk. Clin Lab. 2005;51(9-10):489-94.
[345] Gu HF. Biomarkers of adiponectin: plasma protein variation and genomic DNA polymorphisms. Biomark Insights. 2009;4:123-33.
[346] Siitonen N, Pulkkinen L, Lindstrom J, Kolehmainen M, Eriksson JG, Venojarvi M, et al. Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. BMC Med Genet.12:5.
[347] Ferrarezi DA, Cheurfa N, Reis AF, Fumeron F, Velho G. Adiponectin gene and cardiovascular risk in type 2 diabetic patients: a review of evidences. Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia. 2007 Mar;51(2):153-9.
[348] Hoefle G, Muendlein A, Saely CH, Risch L, Rein P, Koch L, et al. The -11377 C>G promoter variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men. Thrombosis and haemostasis. 2007 Mar;97(3):451-7.
[349] Gable DR, Matin J, Whittall R, Cakmak H, Li KW, Cooper J, et al. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. Annals of human genetics. 2007 Jul;71(Pt 4):453-66.
[350] Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Berni A, Tiberti C, et al. The adiponectin gene SNP+276G>T associates with early-onset coronary artery disease and with lower levels of adiponectin in younger coronary artery disease patients (age <or=50 years). Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2005 Sep;83(9):711-9.
[351] Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. 2003 Mar;148(3):293-300.
[352] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev. 2005 May;26(3):439-51.
[353] Qi L, Doria A, Manson JE, Meigs JB, Hunter D, Mantzoros CS, et al. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2006 May;55(5):1512-6.
[354] Soccio T, Zhang YY, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G, et al. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. Diabetes. 2006 Oct;55(10):2763-70.
[355] Prior SL, Gable DR, Cooper JA, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, et al. Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. European heart journal. 2009 May;30(10):1263-9.
[356] Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. Clin Appl Thromb Hemost. 2006 Apr;12(2):163-8.
[357] Doney AS, Dannfald J, Kimber CH, Donnelly LA, Pearson E, Morris AD, et al. The FTO gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. Circ Cardiovasc Genet. 2009 Jun;2(3):255-9.
[358] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. Science (New York, NY. 2007 May 11;316(5826):889-94.
[359] Li H, Kilpelainen TO, Liu C, Zhu J, Liu Y, Hu C, et al. Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. Diabetologia. 2012 Apr;55(4):981-95.
[360] Hertel JK, Johansson S, Sonestedt E, Jonsson A, Lie RT, Platou CG, et al. FTO, type 2 diabetes, and weight gain throughout adult life: a meta-analysis of 41,504 subjects from the Scandinavian HUNT, MDC, and MPP studies. Diabetes. 2011 May;60(5):1637-44.
[361] Ahmad T, Chasman DI, Mora S, Pare G, Cook NR, Buring JE, et al. The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. American heart journal. 2010 Dec;160(6):1163-9.

[362] He M, Cornelis MC, Franks PW, Zhang C, Hu FB, Qi L. Obesity genotype score and cardiovascular risk in women with type 2 diabetes mellitus. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2010 Feb;30(2):327-32.
[363] Hubacek JA, Pikhart H, Peasey A, Kubinova R, Bobak M. FTO variant, energy intake, physical activity and basal metabolic rate in Caucasians. The HAPIEE study. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 2010;60(1):175-83.
[364] Hubacek JA, Stanek V, Gebauerova M, Pilipcincova A, Dlouha D, Poledne R, et al. A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2010 Aug 5;411(15-16):1069-72.
[365] Dlouha D, Adamkova V, Lanska V, Hubacek JA. Lack of association between a new tag SNP in the FTO gene and BMI in Czech-Slavonic population. Eur J Hum Genet. 2010 Dec;18(12):1274; author reply 5.
[366] Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab US, Tolppanen AM, Stancakova A, Lindstrom J, et al. Association of the FTO gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism--the Finnish Diabetes Prevention Study. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2011 Sep;21(9):691-8.
[367] Winter Y, Back T, Scherag A, Linseisen J, Rohrmann S, Lanczik O, et al. Evaluation of the obesity genes FTO and MC4R and the type 2 diabetes mellitus gene TCF7L2 for contribution to stroke risk: The Mannheim-Heidelberg Stroke Study. Obesity facts. 2011;4(4):290-6.
[368] Berzuini C, Vansteelandt S, Foco L, Pastorino R, Bernardinelli L. Direct genetic effects and their estimation from matched case-control data. Genetic epidemiology. 2012 Sep;36(6):652-62.
[369] Borglykke A, Grarup N, Sparso T, Linneberg A, Fenger M, Jeppesen J, et al. Genetic variant SLC2A2 [corrected] Is associated with risk of cardiovascular disease - assessing the individual and cumulative effect of 46 type 2 diabetes related genetic variants. PloS one. 2012;7(11):e50418.
[370] Nordestgaard BG, Palmer TM, Benn M, Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Davey Smith G, et al. The effect of elevated body mass index on ischemic heart disease risk: causal estimates from a Mendelian randomisation approach. PLoS medicine. 2012;9(5):e1001212.
[371] Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. Molecular nutrition & food research. 2011 Jan;55(1):136-49.
[372] Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruokonen A, et al. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. Diabetes. 2008 May;57(5):1419-26.
[373] Liu C, Mou S, Pan C. The FTO gene rs9939609 polymorphism predicts risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2013;8(8):e71901.
[374] Vengen IT, Madsen HO, Garred P, Platou C, Vatten L, Videm V. Mannose-binding lectin deficiency is associated with myocardial infarction: the HUNT2 study in Norway. PloS one. 2012;7(7):e42113.
[375] Collard CD, Shernan SK, Fox AA, Bernig T, Chanock SJ, Vaughn WK, et al. The MBL2 'LYQA secretor' haplotype is an independent predictor of postoperative myocardial infarction in whites undergoing coronary artery bypass graft surgery. Circulation. 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I106-12.
[376] Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1110-5.
[377] Kovacs P, Hanson RL, Lee YH, Yang X, Kobes S, Permana PA, et al. The role of insulin receptor substrate-1 gene (IRS1) in type 2 diabetes in Pima Indians. Diabetes. 2003 Dec;52(12):3005-9.
[378] Orkunoglu Suer FE, Mergen H, Bolu E, Ozata M. Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Turkish with type 2 diabetes mellitus. Endocr J. 2005 Oct;52(5):593-8.
[379] Jellema A, Zeegers MP, Feskens EJ, Dagnelie PC, Mensink RP. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. Diabetologia. 2003 Jul;46(7):990-5.
[380] Baroni MG, D'Andrea MP, Montali A, Pannitteri G, Barilla F, Campagna F, et al. A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1999 Dec;19(12):2975-80.
[381] Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). BMJ (Clinical research ed. 1998 Mar 14;316(7134):823-8.
[382] Musameh MD, Wang WY, Nelson CP, Lluis-Ganella C, Debiec R, Subirana I, et al. Analysis of gene-gene interactions among common variants in candidate cardiovascular genes in coronary artery disease. PloS one. 2015;10(2):e0117684.
[383] 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. Nature genetics. 2012 Jan;45(1):25-33.
[384] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature. 2009 Oct 8;461(7265):747-53.
[385] Mackay TF. The genetic architecture of quantitative traits. Annual review of genetics. 2001;35:303-39.
[386] Segre D, Deluna A, Church GM, Kishony R. Modular epistasis in yeast metabolism. Nature genetics. 2005 Jan;37(1):77-83.
[387] 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 research. 2001 Jun;11(6):959-80.
[388] 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. Journal of lipid research. 2012 Nov;53(11):2425-8.
[389] Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. Nature reviews. 2009 Jun;10(6):392-404.

[390] Marchini J, Donnelly P, Cardon LR. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. Nature genetics. 2005 Apr;37(4):413-7.
[391] Jia P, Zheng S, Long J, Zheng W, Zhao Z. dmGWAS: dense module searching for genome-wide association studies in protein-protein interaction networks. Bioinformatics (Oxford, England). 2011 Jan 1;27(1):95-102.
[392] Emily M, Mailund T, Hein J, Schauser L, Schierup MH. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. Eur J Hum Genet. 2009 Oct;17(10):1231-40.
[393] Tsai CT, Hwang JJ, Ritchie MD, Moore JH, Chiang FT, Lai LP, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and coronary artery disease in a large angiographic cohort: detection of high order gene-gene interaction. Atherosclerosis. 2007 Nov;195(1):172-80.
[394] Schwarz UI, Stein CM. Genetic determinants of dose and clinical outcomes in patients receiving oral anticoagulants. Clinical pharmacology and therapeutics. 2006 Jul;80(1):7-12.
[395] Kurnik D, Loebstein R, Halkin H, Gak E, Almog S. 10 years of oral anticoagulant pharmacogenomics: what difference will it make? A critical appraisal. Pharmacogenomics. 2009 Dec;10(12):1955-65.
[396] Smires FZ, Habbal R, Moreau C, Assaidi A, Loriot 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. Pathol Biol (Paris). 2013 Jun;61(3):88-92.
[397] 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.
[398] Pathare A, Al Khabori M, Alkindi S, Al Zadjali S, Misquith R, Khan H, et al. Warfarin pharmacogenetics: development of a dosing algorithm for Omani patients. Journal of human genetics. 2012 Oct;57(10):665-9.
[399] Rusdiana T, Araki T, Nakamura T, Subarnas A, Yamamoto K. Responsiveness to low-dose warfarin associated with genetic variants of VKORC1, CYP2C9, CYP2C19, and CYP4F2 in an Indonesian population. European journal of clinical pharmacology. 2013 Mar;69(3):395-405.
[400] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. Blood. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.
[401] Jose R, Chandrasekaran A, Sam SS, Gerard N, Chanolean S, Abraham BK, et al. CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. Fundamental & clinical pharmacology. 2005 Feb;19(1):101-5.
[402] Visser LE, van Schaik RH, van Vliet M, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, et al. The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. Thrombosis and haemostasis. 2004 Jul;92(1):61-6.
[403] Puehringer H, Loreth RM, Klose G, Schreyer B, Krugluger W, Schneider B, et al. VKORC1 -1639G>A and CYP2C9*3 are the major genetic predictors of phenprocoumon dose requirement. European journal of clinical pharmacology. 2010 Jun;66(6):591-8.
[404] Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. Human molecular genetics. 2005 Jul 1;14(13):1745-51.
[405] Arboix M, Laporte JR, Frati ME, Rutllan M. Effect of age and sex on acenocoumarol requirements. British journal of clinical pharmacology. 1984 Oct;18(4):475-9.
[406] 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.
[407] 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.
[408] 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.
[409] 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.
[410] 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.
[411] 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.
[412] 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.
[413] 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.
[414] Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. European journal of clinical pharmacology. 2008 Oct;64(10):953-60.
[415] Carcas AJ, Borobia AM, Velasco M, Abad-Santos F, Diaz MQ, Fernandez-Capitan C, et al. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2012;13:239.

[416] van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, de Boer A, et al. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. Pharmacogenomics. 2009 Oct;10(10):1687-95.
[417] Постаджиян Ад-р. Непосрещни нужди в антитромбоцитна терапия при лечението на остър коронарен синдром. 2009 [cited; Available from:
[418] 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 тромбоцитна агрегация при пациенти на лечение с тиенопиридини. Българска кардиология. 2013;том XIX, № 4(Дружество на кардиолозите в българя).
[419] White Thomas J AGCSB. Genome-based biomarkers for adverse drug effects, patient enrichment and prediction of drug response, and their incorporation into clinical trial design Personalized Medicine (2006) 3(2), 177–185. 2006.
[420] Fatini C, Sticchi E, Bolli P, Marcucci R, Giusti B, Paniccia R, et al. Platelet aggregability is modulated by eNOS locus in non-type 2 diabetic patients with acute coronary syndrome. Nutr Metab Cardiovasc Dis. Jan;21(1):11-7.
[421] Fatini C, Sticchi E, Bolli P, Marcucci R, Giusti B, Paniccia R, et al. eNOS gene influences platelet phenotype in acute coronary syndrome patients on dual antiplatelet treatment. Platelets. 2009 Dec;20(8):548-54.
[422] Cuisset T, Cayla G, Silvain J. Clopidogrel resistance: what's new? Arch Cardiovasc Dis. Jun-Jul;103(6-7):349-53.
[423] Bhattacharyya S, Rakhit R. Cytochrome P450 2C19 polymorphism and clopidogrel after MI. Lancet. 2009 Apr 4;373(9670):1171; author reply 2-3.
[424] 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.
[425] 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.
[426] 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.
[427] 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.
[428] 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.
[429] 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.
[430] 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.
[431] 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.
[432] 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.
[433] 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.
[434] Ramirez AH, Delaney JT, Shuldiner AR. Carrying one or two reduced-function CYP2C19 alleles is associated with an increased risk of major adverse cardiovascular events in people undergoing percutaneous coronary intervention and treated with clopidogrel. Evid Based Med. Aug;16(4):124-5.
[435] Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang IJ, 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.
[436] Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. The American journal of cardiology. 2008 Apr 15;101(8):1088-93.
[437] Pare G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. The New England journal of medicine. Oct 28;363(18):1704-14.
[438] Smith SMG BR, Daly ME, Storey RF. . Inhibition of platelet aggregation
by clopidogrel is unaffected by the CYP2C19 681G>A polymorphism in
patients with coronary artery disease abstract. J Am Coll Cardiol 2007;49:375A. 2007.
[439] Tantry US, Bliden KP, Wei C, Storey RF, Armstrong M, Butler K, et al. First analysis of the relation between CYP2C19 genotype and pharmacodynamics in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: the ONSET/OFFSET and RESPOND genotype studies. Circ Cardiovasc Genet. Dec;3(6):556-66.
[440] Lau WC WT, Shields T, Rubenfire M, Tantry, US GP. The effect of St John's Wort on the
pharmacodynamic response of clopidogrel in
hyporesponsive volunteers and patients: increased

platelet inhibition by enhancement of CYP3A4
metabolic activity. J Cardiovasc Pharmacol 2011;
57(1): 86-93. 2011.
[441] Cuisset T, Quilici J, Cohen W, Fourcade L, Saut N, Pankert M, et al. Usefulness of high clopidogrel maintenance dose according to CYP2C19 genotypes in clopidogrel low responders undergoing coronary stenting for non ST elevation acute coronary syndrome. The American journal of cardiology. Sep 15;108(6):760-5.
[442] Park KW PJ, Lee SP, Oh IY, Suh JW, Yang, HM ea. Cilostazol attenuates on-treatment platelet
reactivity in patients with CYP2C19 loss of function
alleles receiving dual antiplatelet therapy: a genetic
substudy of the CILON-T randomised controlled
trial. . Heart 2011; 89(7):641-7. 2011.
[443] 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.
[444] del Zoppo GJ. The role of platelets in ischemic stroke. Neurology. 1998 Sep;51(3 Suppl 3):S9-14.
[445] 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.
[446] 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.
[447] Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. The eukaryotic genome as an RNA machine. Science. 2008 Mar 28;319(5871):1787-9.
[448] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. Cell. 2009 Feb 20;136(4):629-41.
[449] Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. Human molecular genetics. 2008 Mar 15;17(6):806-14.
[450] Cunnington MS, Keavney B. Genetic mechanisms mediating atherosclerosis susceptibility at the chromosome 9p21 locus. Curr Atheroscler Rep. 2011 Jun;13(3):193-201.
[451] Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. PLoS Genet. 2010 Apr;6(4):e1000899.
[452] Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2009 Oct;29(10):1671-7.
[453] Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. Genomics. 1988 Apr;2(3):203-8.
[454] Slaviero KA, Clarke SJ, Rivory LP. Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. The Lancet. 2003 Apr;4(4):224-32.
[455] Renton KW. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. Current drug metabolism. 2004 Jun;5(3):235-43.
[456] 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.
[457] Lee G, Piquette-Miller M. Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays. Journal of pharmaceutical sciences. 2003 Nov;92(11):2152-63.
[458] Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science. 1988 Aug 12;241(4867):825-8.
[459] Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, et al. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):9528-35.
[460] Hingorani AD, Casas JP. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. Lancet. 2012 Mar 31;379(9822):1214-24.
[461] 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.
[462] Bohan A, Chen WS, Denson LA, Held MA, Boyer JL. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. The Journal of biological chemistry. 2003 Sep 19;278(38):36688-98.
[463] Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. Seminars in dialysis. 2004 Nov-Dec;17(6):432-7.
[464] 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.
[465] 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.

[466] 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.
[467] 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.
[468] 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.
[469] 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.
[470] 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.
[471] 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.
[472] 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.
[473] 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.
[474] Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. J Clin Invest. 1998 Dec 15;102(12):2061-71.
[475] 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.
[476] Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. Hypertension. 2006 Oct;48(4):700-10.
[477] 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.
[478] 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.
[479] Aoi N, Soma M, Nakayama T, Rahmutula D, Kosuge K, Izumi Y, et al. Variable number of tandem repeat of the 5'-flanking region of type-C human natriuretic peptide receptor gene influences blood pressure levels in obesity-associated hypertension. Hypertens Res. 2004 Oct;27(10):711-6.
[480] Pitzalis MV, Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Iacoviello M, Forleo C, Lucarelli K, et al. Allelic variants of natriuretic peptide receptor genes are associated with family history of hypertension and cardiovascular phenotype. J Hypertens. 2003 Aug;21(8):1491-6.
[481] Garg R, Oliver PM, Maeda N, Pandey KN. Genomic structure, organization, and promoter region analysis of murine guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A gene. Gene. 2002 May 29;291(1-2):123-33.
[482] Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Aoi N, Izumi Y, et al. Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. Endocrine. 2002 Mar;17(2):85-90.
[483] 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.
[484] 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.
[485] 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.
[486] 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.
[487] 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.
[488] Angiolillo DJ, Suryadevara S. Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus. Best practice & research. 2009 Jun;23(3):375-88.
[489] 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.
[490] Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in diabetes: efficacy and limitations of current treatment strategies and future directions. Diabetes care. 2009 Apr;32(4):531-40.
[491] 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.
[492] 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.
[493] 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.
[494] 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.

[495] 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

8. ПРИЛОЖЕНИЯ

Табл. 8. 1. Разпределение на пациентите според генотипа и отговора към лекарствена терапия с клопидогрел.

Вариант				Модел	Общо				Мъже				Жени			
Хр.	**Ген**	**Алел 1**	**Алел 2**		**Резистентни пациенти**	**Толерантни пациенти**	**OR**	**P стойност**	**Резистентни пациенти**	**Толерантни пациенти**	**OR**	**P стойност**	**Резистентни пациенти**	**Толерантни пациенти**	**OR**	**P стойност**
1	***PCSK9* rs11206510**	C	T	Генотипен	1/16/31	4/16/34	-	0.59	0/9/21	3/13/22	-	0.25	1/7/10	1/3/12	-	0.52
		C	T	Алелен	18/78	24/84	0.81	0.54	9/51	19/57	0.53	0.15	9/27	5/27	1.80	0.34
1	***CYP2J2* rs890283**	A	C	Генотипен	1/7/40	2/7/44	-	1	1/4/26	2/6/29	-	0.74	0/3/14	0/1/15	-	0.48
		A	C	Алелен	9/87	11/95	0.89	0.81	6/56	10/64	0.69	0.49	3/31	1/31	3.00	0.33
1	***IL6R* rs2229238**	T	C	Генотипен	2/11/37	2/25/27	--	0.15	2/10/20	0/17/21	-	1	0/1/17	2/8/6	-	0.01
		T	C	Алелен	15/85	29/79	0.48	0.04	14/50	17/59	0.97	0.94	1/35	12/20	0.05	0.0003
2	***IRS1* rs1801278**	T	C	Генотипен	0/6/44	0/4/50	-	0.60	0/5/27	0/2/36	-	0.26	0/1/17	0/2/14	-	0.58
		T	C	Алелен	6/94	4/104	1.66	0.44	5/59	2/74	3.14	0.16	1/35	2/30	0.43	0.49
3	***ADIPOQ* rs266729**	G	C	Генотипен	3/24/23	1/21/32	-	0.36	1/17/14	1/17/20	-	0.69	2/7/9	0/4/12	-	0.19
		G	C	Алелен	30/70	23/85	1.58	0.15	19/45	19/57	1.27	0.53	11/25	4/28	3.08	0.07
3	***ADIPOQ* rs2241766**	G	T	Генотипен	0/11/38	0/10/41	-	1	0/5/26	0/5/30	-	1	0/6/12	0/5/11	-	1
		G	T	Алелен	11/87	11/92	1.06	0.74	5/57	5/65	1.14	0.84	6/30	5/27	1.08	0.91
3	***ADIPOQ* rs1501299**	T	G	Генотипен	3/16/29	12/14/28	-	0.23	1/12/19	9/9/20	-	0.26	2/4/10	3/5/8	-	0.56
		T	G	Алелен	22/74	38/70	0.55	0.06	14/50	27/49	0.51	0.09	8/24	11/21	0.64	0.41
5	***NPR3, C5orf23* rs1173771**	A	G	Генотипен	3/25/22	10/31/13	-	0.023	1/15/16	6/22/10	-	0.21	2/10/6	4/9/3	-	0.39
		A	G	Алелен	31/69	51/57	0.50	0.016	17/47	34/42	0.45	0.026	14/22	17/15	0.56	0.23
6	***PHACTR1* rs9349379**	G	A	Генотипен	5/20/23	15/21/18	-	0.07	3/14/14	12/14/12	-	0.08	2/6/9	3/7/6	-	0.48
		G	A	Алелен	30/66	51/57	0.51	0.019	20/42	38/38	0.48	0.035	10/24	13/19	0.61	0.34
6	***MTHFD1L* rs6922269**	A	G	Генотипен	3/21/26	4/24/26	-	0.85	3/14/15	2/19/17	-	1	0/7/11	2/5/9	-	0.69
		A	G	Алелен	27/73	32/76	0.88	0.67	20/44	23/53	1.05	0.90	7/29	9/23	0.62	0.40
7	***CYP3A5* rs776746**	T	C	Генотипен	0/9/41	0/10/44	-	1	0/6/26	0/9/29	-	0.86	0/3/15	0/1/15	-	0.47
		T	C	Алелен	9/91	10/98	0.97	0.94	6/58	9/67	0.77	0.64	3/33	1/31	2.82	0.36
7	***LEP* rs7799039**	A	G	Генотипен	17/18/15	11/23/20	-	0.29	13/11/8	7/18/13	-	0.12	4/7/7	4/5/7	-	1
		A	G	Алелен	52/48	45/63	1.52	0.06	37/27	32/44	1.88	0.06	15/21	13/19	1.04	0.93
7	***eNOS* rs3918226**	T	C	Генотипен	1/11/37	0/4/50	-	0.03	1/5/25	0/2/36	-	0.14	0/6/12	0/2/14	-	0.21
		T	C	Алелен	13/85	4/104	3.98	0.01	7/55	2/74	4.71	0.08	6/30	2/30	3.00	0.18
9	***9p21* rs7865618**	G	A	Генотипен	8/21/21	8/21/25	-	0.91	5/14/13	3/15/20	-	0.28	3/7/ 8	5/6/5	-	0.32
		G	A	Алелен	37/63	37/71	1.13	0.68	24/40	21/55	1.57	0.21	13/23	16/16	0.57	0.25
9	***9p21* rs1537378**	T	C	Генотипен	9/24/17	5/21/26	-	0.20	7/16/9	2/15/19	-	0.10	2/8/8	3/6/7	-	0.95
		T	C	Алелен	42/58	31/73	1.71	0.01	30/34	19/53	2.46	0.02	12/24	12/20	0.83	0.72
9	***9p21* rs7857345**	T	C	Генотипен	3/22/25	3/21/30	-	0.79	2/17/13	2/14/22	-	0.37	1/5/12	1/7/88	-	0.56
		T	C	Алелен	28/72	27/81	1.17	0.62	21/43	18/58	1.57	0.23	8/29	9/23	0.70	0.40
9	***9p21* rs10757274**	A	G	Генотипен	10/23/15	8/26/20	-	0.68	7/16/8	6/17/15	-	0.46	3/7/7	2/9/ 5	-	1
		A	G	Алелен	43/53	42/66	1.27	0.39	30/32	29/47	1.52	0.23	13/21	13/19	0.90	0.84

9	***9p21*** **rs2383206**	G	A	Генотипен	9/23/14	14/25/12	-	0.59	5/12/12	9/18/8	-	0.27	2/11/4	4/7/ 5	-	1
		G	A	Алелен	41/51	53/49	0.74	0.30	22/36	36/34	0.58	0.13	15/19	15/17	0.89	0.82
9	***9p21*** **rs10757278**	A	G	Генотипен	11/24/13	10/29/15	-	0.86	8/15/8	8/19/11	-	0.89	3/9.2005	2/10/4	-	1
		A	G	Алелен	46/50	49/59	1.11	0.72	31/31	35/41	1.17	0.64	15/19	14/18	1.02	0.98
9	***ABO*** **rs579459**	C	T	Генотипен	8/16/26	10/21/23	-	0.63	5/9/18	7/15/16	-	0.49	3/7/8	3/6/7	-	1
		C	T	Алелен	32/68	41/67	0.77	0.37	19/45	29/47	0.68	0.29	13/23	12/20	0.94	0.91
10	***MBL2*** **rs1800450**	T	C	Генотипен	1/16/33	0/14/40	-	0.63	0/11/21	0/10/28	-	0.78	1/5/12	0/4/12	-	0.57
		T	C	Алелен	18/82	14/94	1.47	0.31	11/53	10/66	1.37	0.51	7/29	4/28	1.69	0.44
10	***CYP2C19*2*** **rs4244285**	A	G	Генотипен	2/33/15	0/18/36	-	0.016	1/20/11	0/14/24	-	0.10	1/13/4	0/4/12	-	0.09
		A	G	Алелен	37/63	18/90	2.94	0.001	22/42	14/62	2.32	0.03	15/21	4/28	1.69	0.52
10	***CYP2C19*17*** **rs12248560**	T	C	Генотипен	3/17/30	1/23/30	-	0.23	1/14/17	1/17/20	-	0.42	2/3/13	0/6/10	-	0.39
		T	C	Алелен	23/77	25/83	0.99	1	16/48	19/57	1	1	7/29	6/26	1.05	1
10	***TCF7L2*** **rs7903146**	T	C	Генотипен	7/18/24	6/21/27	-	0.89	5/9/18	6/15/17	-	0.57	2/9/6	0/6/10	-	0.26
		T	C	Алелен	32/66	33/75	1.10	0.75	19/45	27/49	0.77	0.46	13/21	6/26	2.68	0.08
10	***TCF7L2*** **rs290481**	T	C	Генотипен	2/13/35	1/16/37	-	1	0/7/25	0/12/26	-	0.58	2/6/10	1/4/11	-	0.45
		T	C	Алелен	17/83	18/90	1.02	0.95	7/57	12/64	0.65	0.40	10/26	6/26	1.67	0.38
12	***ATP2B1*** **rs2681472**	G	A	Генотипен	4/18/27	1/20/33	-	0.45	2/12/17	1/14/23	-	0.63	2/6/10	0/6/10	-	0.47
		G	A	Алелен	26/72	22/86	1.41	0.29	16/46	16/60	1.30	0.51	10/26	6/26	1.67	0.38
15	***CYP2C8*3*** **rs1050968**	C	T	Генотипен	0/9/40	0/12/41	-	0.86	0/5/27	0/8/29	-	0.68	0/4/13	0/4/12	-	1
		C	T	Алелен	9/89	12/94	0.79	0.62	5/59	8/66	0.70	0.55	4/30	4/28	0.93	0.93
16	***FTO*** **rs9939609**	A	T	Генотипен	8/28/14	8/26/19	-	0.69	6/16/10	6/18/13	-	0.93	2/12/4	2/8/6	-	0.74
		A	T	Алелен	44/56	42/64	1.20	0.52	28/36	30/44	1.14	0.70	16/20	12/20	1.33	0.56
16	***CDH13*** **rs11646213**	A	T	Генотипен	13/22/15	9/30/15	-	0.41	8/15/9	6/21/11	-	0.61	5/7/6	3/9/4	-	1
		A	T	Алелен	48/52	48/60	1.15	0.61	31/33	33/43	1.22	0.55	17/19	15/17	1.01	0.98
19	***APOE*** **rs429358**	C	T	Генотипен	0/19/31	2/15/37	-	0.96	0/9/23	1/11/26	-	0.84	0/10/8	1/4/11	-	0.49
		C	T	Алелен	19/81	19/89	1.10	0.79	9/55	13/63	0.79	0.62	10/26	6/26	1.67	0.38
19	***APOE*** **rs7412**	T	C	Генотипен	0/10/40	0/3/51	-	0.09	0/7/25	0/3/35	-	0.26	0/3/15	0/0/16	-	0.26
		T	C	Алелен	10/90	3/105	3.89	0.03	7/57	3/73	2.99	0.11	3/33	0/32	NAN	0.09
20	***GNAS-EDN3*** **rs6015450**	G	A	Генотипен	1/8/41	1/6/47	-	0.89	1/3/28	0/2/36	-	0.23	0/5/13	1/4/11	-	0.68
		G	A	Алелен	10/90	8/100	1.39	0.62	5/59	2/74	3.14	0.16	5/31	6/26	0.70	0.59

Табл. 8. 2. Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с АХ и популационната група от индивиди с български произход.

Хр.	Ген	Вариант	Алел 1	Алел 2	Модел	Общо			Мъже			Жени		
						АХ	Контроли	P	АХ	Контроли	P	АХ	Контроли	P
1	*PCSK9*	rs11206510	C	T	Генотипен	11/79/207	15/125/356	0.77	5/20/59	5/54/182	0.19	6/59/148	10/71/174	0.80
			C	T	Алелен	101/493	155/837	0.47	30/138	64/418	0.15	71/355	91/419	0.64
1	*CYP2J2*	rs890293	A	C	Генотипен	1/22/157	2/50/419	0.65	1/3/50	0/23/209	1	0/19/107	2/27/210	0.72
			A	C	Алелен	24/336	54/888	0.53	5/103	23/441	0.89	19/233	31/447	0.59
1	*IL6R*	rs2229238	T	C	Генотипен	13/112/172	24/171/300	0.66	3/31/50	11/88/141	1	10/81/122	13/83/159	0.47
			T	C	Алелен	138/456	219/771	0.61	37/131	110/370	0.81	101/325	109/401	0.39
5	*NPR3, C5orf23*	rs1173771	A	G	Генотипен	53/146/99	87/241/166	0.99	16/41/27	40/118/82	0.87	37/105/72	47/123/84	0.94
			A	G	Алелен	252/344	415/573	0.91	73/95	198/282	0.62	179/249	217/291	0.78
6	*PHACTR1*	rs9349379	G	A	Генотипен	36/151/109	76/225/189	0.27	5/45/33	36/105/98	0.07	31/106/76	40/120/91	0.88
			G	A	Алелен	223/369	377/603	0.75	55/111	177/301	0.37	168/258	200/302	0.90
6	*MTHFD1L*	rs6922269	A	G	Генотипен	15/113/170	34/167/294	0.35	5/30/49	13/77/150	0.80	10/83/121	21/90/144	0.27
			A	G	Алелен	143/453	235/755	0.91	40/128	103/377	0.53	103/325	132/378	0.52
7	*eNOS3*	rs3918226	T	C	Генотипен	3/48/246	5/79/410	1	2/13/69	2/41/196	1	1/35/177	3/38/214	1
			T	C	Алелен	54/540	89/899	0.96	17/151	45/433	0.79	37/389	44/466	0.97
9	*ABO*	rs579459	C	T	Генотипен	20/137/140	34/209/250	0.58	5/32/47	16/101/122	0.74	15/105/93	18/108/128	0.32
			C	T	Алелен	177/417	277/709	0.47	42/126	133/345	0.48	135/291	144/364	0.27
12	*ATP2B1*	rs2681472	G	A	Генотипен	8/86/202	8/138/348	0.53	5/19/60	3/69/168	0.86	3/67/142	5/69/180	0.74
			G	A	Алелен	102/490	154/834	0.39	29/139	75/405	0.62	73/351	79/429	0.49
15	*CYP2C8*	rs1050968	C	T	Генотипен	5/62/225	6/89/385	0.56	4/19/59	2/39/194	0.11	1/43/166	4/50/191	0.75
			C	T	Алелен	72/512	101/859	0.27	27/137	43/427	0.01	45/375	58/432	0.59
16	*CDH13*	rs11646213	A	T	Генотипен	46/129/122	83/245/166	0.10	8/44/32	40/111/89	0.27	38/85/90	43/134/77	0.01
			A	T	Алелен	221/373	411/577	0.08	60/108	191/289	0.35	161/265	220/288	0.09
19	*APOE*	rs429358	C	T	Генотипен	3/48/231	2/84/410	0.71	2/18/60	1/32/208	0.15	1/30/171	1/52/202	0.34
			C	T	Алелен	54/510	88/904	0.64	22/138	34/448	0.01	32/372	54/456	0.17
19	*APOE*	rs7412	T	C	Генотипен	0/27/256	4/66/420	0.09	0/8/73	2/29/210	0.96	0/19/183	2/37/210	0.15
			T	C	Алелен	27/539	74/906	0.03	8/154	33/449	0.39	19/385	41/457	0.03
20	*GNAS, EDN3*	rs6015450	G	A	Генотипен	4/56/238	9/98/387	0.72	0/23/61	7/52/180	1	4/33/177	2/46/207	1
			G	A	Алелен	64/532	116/872	0.54	23/145	66/412	0.97	41/387	50/460	0.91

Табл. 8. 3. 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.

Хр.	Ген	Вариант	Алел 1	Алел 2	Модел	Общо			Мъже			Жени		
						ИБС (с и без ИМ)	Контроли	P	ИБС (с и без ИМ)	Контроли	P	ИБС (с и без ИМ)	Контроли	P
1	*PCSK9*	rs11206510	C	T	Генотипен	8/87/226	15/125/356	0.77	4/59/142	5/54/182	0.56	4/28/84	10/71/174	0.58
			C	T	Алелен	103/539	155/837	0.82	67/343	64/418	0.20	36/196	91/419	0.44
1	*CYP2J2*	rs890293	A	C	Генотипен	5/32/217	2/50/419	0.09	4/18/128	0/23/209	0.05	1/14/89	2/27/210	0.78
			A	C	Алелен	42/466	54/888	0.06	26/274	23/441	0.04	16/192	31/447	0.57
1	*IL6R*	rs2229238	T	C	Генотипен	18/93/213	24/171/300	0.21	11/61/135	11/88/141	0.27	7/32/78	13/83/159	0.59
			T	C	Алелен	129/519	219/771	0.28	83/331	110/370	0.30	46/188	109/401	0.59
2	*IRS1*	rs1801278	T	C	Генотипен	0/37/282	0/53/347	0.51	0/23/182	0/30/177	0.65	0/14/100	0/23/170	1
			T	C	Алелен	37/601	53/747	0.52	23/387	30/384	0.34	14/214	23/363	0.93
3	*ADIPOQ*	rs266729	G	C	Генотипен	22/129/170	45/197/250	0.49	13/91/103	19/93/127	0.51	9/38/67	26/104/123	0.20
			G	C	Алелен	173/469	287/697	0.33	117/297	131/347	0.78	56/172	156/350	0.08
3	*ADIPOQ*	rs2241766	G	T	Генотипен	3/56/217	3/97/391	0.86	3/35/131	1/51/187	0.89	0/21/86	2/46/204	1
			G	T	Алелен	62/490	103/879	0.65	41/297	53/425	0.65	21/193	50/454	0.96
3	*ADIPOQ*	rs1501299	T	G	Генотипен	31/120/170	43/221/230	0.11	19/77/111	20/107/113	0.28	12/43/59	23/114/117	0.44
			T	G	Алелен	182/460	307/681	0.24	115/299	147/333	0.35	67/161	160/348	0.57
5	*NPR3,C5orf23*	rs1173771	A	G	Генотипен	53/175/96	87/241/166	0.33	30/114/63	40/118/82	0.46	23/61/33	47/123/84	0.64
			A	G	Алелен	281/367	415/573	0.59	174/240	198/282	0.81	107/127	217/291	0.44
6	*PHACTR1*	rs9349379	G	A	Генотипен	60/143/114	76/225/189	0.43	42/94/67	36/105/98	0.14	18/49/47	40/120/91	0.64
			G	A	Алелен	263/371	377/603	0.23	178/228	177/301	0.046	85/143	200/302	0.51
6	*MTHFD1L*	rs6922269	A	G	Генотипен	23/122/179	34/167/294	0.48	15/81/111	13/77/150	0.16	8/41/68	21/90/144	0.89
			A	G	Алелен	168/480	235/755	0.31	111/303	103/377	0.06	57/177	132/378	0.66
7	*LEP*	rs7799039	A	G	Генотипен	78/141/102	91/250/153	0.08	52/93/62	45/123/71	0.22	26/48/40	46/127/82	0.35
			A	G	Алелен	297/345	432/556	0.31	197/217	213/265	0.37	100/128	219/291	0.82
7	*eNOS3*	rs3918226	T	C	Генотипен	4/52/266	5/79/410	0.95	2/31/172	2/41/196	0.98	2/21/94	3/38/214	0.53
			T	C	Алелен	60/584	89/899	0.83	35/375	45/433	0.65	25/209	44/466	0.37
9	*9p21*	rs7865618	G	A	Генотипен	42/147/135	84/245/166	0.04	21/104/82	32/130/78	0.24	21/43/53	52/115/88	0.13
			G	A	Алелен	231/417	413/577	0.01	146/268	194/286	0.13	85/149	219/291	0.09
9	*9p21*	rs1537378	T	C	Генотипен	38/122/112	79/237/178	0.36	22/83/63	40/123/78	0.45	16/39/49	39/114/100	0.37
			T	C	Алелен	198/346	395/593	0.17	127/209	203/279	0.22	71/137	192/314	0.34
9	*9p21*	rs7857345	T	C	Генотипен	23/117/182	39/192/263	0.65	12/83/110	13/97/130	0.98	11/34/72	26/95/133	0.24
			T	C	Алелен	163/481	270/718	0.37	107/303	123/357	0.87	56/178	147/361	0.16
9	*9p21*	rs10757274	A	G	Генотипен	55/161/106	103/256/136	0.18	36/106/64	57/125/59	0.15	19/55/42	46/131/77	0.53
			A	G	Алелен	271/373	462/528	0.07	178/234	239/243	0.06	93/139	223/285	0.33
9	*9p21*	rs2383206	A	G	Генотипен	57/147/88	107/233/148	0.68	39/93/52	45/123/69	0.85	18/54/36	62/110/79	0.23
			A	G	Алелен	261/323	447/529	0.67	171/197	213/261	0.66	90/126	234/268	0.22

9	***9p21***	**rs10757278**	A	G	Генотипен	68/163/89	111/247/129	0.85	48/103/54	60/118/61	0.92	20/60/35	51/129/68	0.72
			A	G	Алелен	299/341	469/505	0.57	199/211	238/240	0.71	100/130	231/265	0.44
9	***ABO***	**rs579459**	C	T	Генотипен	37/144/143	34/209/250	0.04	24/90/93	16/101/122	0.14	13/54/50	18/108/128	0.25
			C	T	Алелен	218/430	277/709	0.02	138/276	133/345	0.07	80/154	144/364	0.12
10	***MBL2***	**rs1800450**	T	C	Генотипен	7/93/224	13/115/365	0.22	4/61/142	8/62/169	1	3/32/82	5/53/196	0.25
			T	C	Алелен	107/541	141/845	0.22	69/345	78/400	0.89	38/196	63/445	0.16
10	***TCF7L2***	**rs7903146**	T	C	Генотипен	33/134/147	49/215/230	0.95	21/83/98	20/98/122	0.73	12/51/49	29/117/108	0.97
			T	C	Алелен	200/428	313/675	0.94	125/279	138/342	0.48	75/149	175/333	0.80
10	***TCF7L2***	**rs290481**	T	C	Генотипен	12/100/209	32/159/303	0.20	5/62/138	17/82/140	0.03	7/38/71	15/77/163	0.88
			T	C	Алелен	124/518	223/765	0.12	72/338	116/362	0.01	52/180	107/403	0.66
12	***ATP2B1***	**rs2681472**	G	A	Генотипен	14/105/204	8/138/348	0.02	11/72/123	3/69/168	0.03	3/33/81	5/69/180	0.92
			G	A	Алелен	133/513	154/834	0.01	94/318	75/405	0.01	39/195	79/429	0.70
15	***CYP2C8***	**rs1050968**	C	T	Генотипен	3/67/223	6/89/385	0.34	3/40/139	2/39/194	0.32	0/27/84	4/50/191	1
			C	T	Алелен	73/513	101/859	0.24	46/318	43/427	0.11	27/195	58/432	0.90
16	***FTO***	**rs9939609**	A	T	Генотипен	47/170/104	99/235/158	0.12	32/111/62	42/121/76	0.74	15/59/42	57/114/82	0.10
			A	T	Алелен	264/378	433/551	0.25	175/235	205/273	0.95	89/143	228/278	0.09
16	***CDH13***	**rs11646213**	A	T	Генотипен	53/157/111	83/245/166	0.96	33/109/63	40/111/89	0.30	20/48/48	43/134/77	0.08
			A	T	Алелен	263/379	411/577	0.81	175/235	191/289	0.38	88/144	220/288	0.17
19	***APOE***	**rs429358**	C	T	Генотипен	5/71/247	2/84/410	0.13	2/47/157	1/32/208	0.023	3/24/90	1/52/202	0.42
			C	T	Алелен	81/565	88/904	0.02	51/361	34/448	0.01	30/204	54/456	0.37
19	***APOE***	**rs7412**	T	C	Генотипен	1/39/277	4/66/420	0.63	0/24/177	2/29/210	0.87	1/15/100	2/37/210	0.92
			T	C	Алелен	41/593	74/906	0.41	24/378	33/449	0.60	17/215	41/457	0.67
20	***GNAS, EDN3***	**rs6015450**	G	A	Генотипен	5/49/270	9/98/387	0.21	3/25/179	7/52/180	0.01	2/24/91	2/46/207	0.43
			G	A	Алелен	59/589	116/872	0.09	31/383	66/412	0.002	28/206	50/460	0.44

Табл. 8. 4. 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.

Хр.	Ген	Вариант	Алел 1	Алел 2	Модел	Общо			Мъже			Жени		
						ИБС	Контроли	P	ИБС	Контроли	P	ИБС	Контроли	P
1	*PCSK9*	rs11206510	C	T	Генотипен	5/42/77	15/125/356	0.11	3/26/46	5/54/182	0.03	2/16/31	10/71/174	0.76
			C	T	Алелен	52/196	155/837	0.04	32/118	64/418	0.02	20/78	91/419	0.57
1	*CYP2J2*	rs890283	A	C	Генотипен	3/12/90	2/50/419	0.36	3/06/50	0/23/209	0.04	0/6/40	2/27/210	1
			A	C	Алелен	18/192	54/888	0.12	12/106	23/441	0.03	6/86	31/447	0.99
1	*IL6R*	rs2229238	T	C	Генотипен	4/39/82	24/171/300	0.52	2/24/50	11/88/141	0.51	2/15/32	13/83/159	0.89
			T	C	Алелен	47/203	219/771	0.25	28/124	110/370	0.24	19/79	109/401	0.66
2	*IRS1*	rs1801278	T	C	Генотипен	0/19/104	0/53/347	0.78	0/13/62	0/30/177	0.75	0/6/42	0/23/170	1
			T	C	Алелен	19/227	53/747	0.55	13/137	30/384	0.57	6/90	23/363	0.91
3	*ADIPOQ*	rs266729	G	C	Генотипен	9/51/64	45/197/250	0.80	4/39/33	19/93/127	0.72	5/12/31	26/104/123	0.09
			G	C	Алелен	69/179	287/697	0.68	47/105	131/347	0.41	22/74	156/350	0.14
3	*ADIPOQ*	rs2241766	G	T	Генотипен	1/22/87	3/97/391	1	1/11/54	1/51/187	0.84	0/11/33	2/46/204	0.86
			G	T	Алелен	24/196	103/879	0.85	13/119	53/425	0.68	11/77	50/454	0.46
3	*ADIPOQ*	rs1501299	T	G	Генотипен	14/42/66	43/221/230	0.11	9/26/41	20/107/113	0.25	5/16/25	23/114/117	0.45
			T	G	Алелен	70/174	307/681	0.47	44/108	147/333	0.69	26/66	160/348	0.54
5	*NPR3,C5orf23*	rs1173771	A	G	Генотипен	20/67/38	87/241/166	0.63	8/45/23	40/118/82	0.24	12/22/15	47/123/84	0.63
			A	G	Алелен	107/143	415/573	0.82	61/91	198/282	0.81	46/52	217/291	0.44
6	*PHACTR1*	rs9349379	G	A	Генотипен	20/50/53	76/225/189	0.56	14/32/29	36/105/98	0.75	6/18/24	40/120/91	0.2
			G	A	Алелен	90/156	377/603	0.59	60/90	177/301	0.51	30/66	200/302	0.11
6	*MTHFD1L*	rs6922269	A	G	Генотипен	10/47/68	34/167/294	0.60	7/30/39	13/77/150	0.18	3/17/29	21/90/144	0.96
			A	G	Алелен	67/183	235/755	0.31	44/108	103/377	0.06	23/75	132/378	0.62
7	*LEP*	rs7799039	A	G	Генотипен	33/52/37	91/250/153	0.09	20/34/22	45/123/71	0.35	13/18/15	46/127/82	0.22
			A	G	Алелен	118/126	432/556	0.19	74/78	213/265	0.40	44/48	219/291	0.11
7	*eNOS3*	rs3918226	T	C	Генотипен	0/27/98	5/79/410	0.54	0/13/63	2/41/196	1	0/14/35	3/38/214	0.21
			T	C	Алелен	27/223	89/899	0.39	13/139	45/433	0.75	14/84	44/466	0.08
9	*9p21*	rs7865618	G	A	Генотипен	18/56/51	84/245/166	0.31	8/38/30	32/130/78	0.50	10/18/21	52/115/88	0.48
			G	A	Алелен	92/158	413/577	0.16	54/98	194/286	0.28	38/60	219/291	0.44
9	*9p21*	rs1537378	T	C	Генотипен	11/51/48	79/237/178	0.16	6/34/26	40/123/78	0.26	5/17/22	39/114/100	0.41
			T	C	Алелен	73/147	395/593	0.06	46/86	203/279	0.13	27/61	192/314	0.19
9	*9p21*	rs7857345	T	C	Генотипен	11/48/66	39/192/263	0.95	5/31/40	13/97/130	0.92	6/17/26	26/95/133	0.89
			T	C	Алелен	70/180	270/718	0.83	41/111	123/357	0.74	29/69	147/361	0.9
9	*9p21*	rs10757274	A	G	Генотипен	23/61/39	103/256/136	0.63	15/35/25	57/125/59	0.31	8/26/14	46/131/77	0.94
			A	G	Алелен	107/139	462/528	0.37	65/85	239/243	0.18	42/54	223/285	0.98
9	*9p21*	rs2383206	A	G	Генотипен	24/59/29	107/233/148	0.58	17/33/17	45/123/69	0.50	7/26/12	62/110/79	0.19
			A	G	Алелен	107/117	447/529	0.59	67/67	213/261	0.30	40/50	234/268	0.7
9	*9p21*	rs10757278	A	G	Генотипен	28/64/31	111/247/129	0.95	19/36/20	60/118/61	0.97	9/28/11	51/129/68	0.71

			A	G	Алелен	120/126	469/505	0.86	74/76	238/240	0.92	46/50	231/265	0.81
9	***ABO***	**rs579459**	C	T	Генотипен	17/52/56	34/209/250	0.05	10/30/36	16/101/122	0.20	7/22/20	18/108/128	0.18
			C	T	Алелен	86/164	277/709	0.05	50/102	133/345	0.45	36/62	144/364	0.09
10	***MBL2***	**rs1800450**	T	C	Генотипен	3/38/84	13/115/365	0.28	1/24/51	8/62/169	1	2/14/33	5/53/196	0.22
			T	C	Алелен	44/206	141/845	0.19	26/126	78/400	0.82	18/80	63/445	0.11
10	***TCF7L2***	**rs7903146**	T	C	Генотипен	14/49/56	49/215/230	0.80	9/31/34	20/98/122	0.55	5/18/22	29/117/108	0.72
			T	C	Алелен	77/161	313/675	0.84	49/99	138/342	0.31	28/62	175/333	0.54
10	***TCF7L2***	**rs290481**	T	C	Генотипен	5/37/82	32/159/303	0.47	0/20/55	17/82/140	0.009	5/17/27	15/77/163	0.38
			T	C	Алелен	47/201	223/765	0.22	20/130	116/362	0.0045	27/71	107/403	0.18
12	***ATP2B1***	**rs2681472**	G	A	Генотипен	4/40/81	8/138/348	0.36	2/23/51	3/69/168	0.73	2/17/30	5/69/180	0.32
			G	A	Алелен	48/202	154/834	0.17	27/125	75/405	0.53	21/77	79/429	0.15
15	***CYP2C8***	**rs1050968**	C	T	Генотипен	1/27/85	6/89/385	0.63	1/17/48	2/39/194	0.12	0/10/37	4/50/191	0.98
			C	T	Алелен	29/197	101/859	0.32	19/113	43/427	0.08	10/84	58/432	0.74
16	***FTO***	**rs9939609**	A	T	Генотипен	18/71/35	99/235/158	0.14	11/42/22	42/121/76	0.70	7/29/13	57/114/82	0.17
			A	T	Алелен	107/141	433/551	0.81	64/86	205/273	0.96	43/55	228/278	0.83
16	***CDH13***	**rs11646213**	A	T	Генотипен	28/59/35	83/245/166	0.25	17/34/23	40/111/89	0.40	11/25/12	43/134/77	0.55
			A	T	Алелен	115/129	411/577	0.12	68/80	191/289	0.18	47/49	220/288	0.31
19	***APOE***	**rs429358**	C	T	Генотипен	3/30/92	2/84/410	0.025	1/16/59	1/32/208	0.1	2/14/33	1/52/202	0.08
			C	T	Алелен	36/214	88/904	0.01	18/134	34/448	0.06	18/80	54/456	0.03
19	***APOE***	**rs7412**	T	C	Генотипен	0/12/111	4/66/420	0.27	0/8/66	2/29/210	0.76	0/4/45	2/37/210	0.37
			T	C	Алелен	12/234	74/906	0.14	8/140	33/449	0.53	4/94	41/457	0.16
20	***GNAS, EDN3***	**rs6015450**	G	A	Генотипен	1/19/105	9/98/387	0.32	0/6/70	7/52/180	0.008	1/13/35	2/46/207	0.25
			G	A	Алелен	21/229	116/872	0.13	6/146	66/412	0.0009	15/83	50/460	0.11

Табл. 8. 5. 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.

Хр.	Ген	Вариант	Алел 1	Алел 2	Модел	Общо			Мъже			Жени		
						ИМ	Контроли	P	ИМ	Контроли	P	ИМ	Контроли	P
1	*PCSK9*	rs11206510	C	T	Генотипен	3/45/149	15/125/356	0.46	1/33/96	5/54/182	1	2/12/53	10/71/174	0.26
			C	T	Алелен	51/343	155/837	0.21	35/225	64/418	0.94	16/118	91/419	0.10
1	*CYP2J2*	rs890283	A	C	Генотипен	2/20/127	2/50/419	0.37	1/12/78	0/23/209	0.35	01/08/1949	2/27/210	0.73
			A	C	Алелен	24/274	54/888	0.15	14/168	23/441	0.18	10/106	31/447	0.42
1	*IL6R*	rs2229238	T	C	Генотипен	14/54/131	24/171/300	0.12	9/37/85	11/88/141	0.20	5/17/46	13/83/159	0.42
			T	C	Алелен	82/316	219/771	0.54	55/207	110/370	0.55	27/109	109/401	0.70
2	*IRS1*	rs1801278	T	C	Генотипен	0/18/178	0/53/347	0.42	0/10/120	0/30/177	0.12	0/8/58	0/23/170	1
			T	C	Алелен	18/374	53/747	0.16	10/250	30/384	0.07	8/124	23/363	0.97
3	*ADIPOQ*	rs266729	G	C	Генотипен	13/78/106	45/197/250	0.51	9/52/70	19/93/127	0.93	4/26/36	26/104/123	0.58
			G	C	Алелен	104/290	287/697	0.30	70/192	131/347	0.84	34/98	156/350	0.26
3	*ADIPOQ*	rs2241766	G	T	Генотипен	2/34/130	3/97/391	0.85	2/24/77	1/51/187	0.59	0/10/53	2/46/204	0.74
			G	T	Алелен	38/294	103/879	0.63	28/178	53/425	0.35	10/116	50/454	0.50
3	*ADIPOQ*	rs1501299	T	G	Генотипен	17/78/104	43/221/230	0.37	10/51/70	20/107/113	0.50	7/27/34	23/114/117	0.74
			T	G	Алелен	112/286	307/681	0.28	71/191	147/333	0.31	41/95	160/348	0.76
5	*NPR3,C5orf23*	rs1173771	A	G	Генотипен	33/108/58	87/241/166	0.41	22/69/40	40/118/82	0.76	11/39/18	47/123/84	0.42
			A	G	Алелен	174/224	415/573	0.56	113/149	198/282	0.62	61/75	217/291	0.66
6	*PHACTR1*	rs9349379	G	A	Генотипен	40/93/61	76/225/189	0.12	28/62/38	36/105/98	0.07	12/31/23	40/120/91	0.91
			G	A	Алелен	173/215	377/603	0.037	118/138	177/301	0.017	55/77	200/302	0.70
6	*MTHFD1L*	rs6922269	A	G	Генотипен	13/75/111	34/167/294	0.61	8/51/72	13/77/150	0.36	5/24/39	21/90/144	0.97
			A	G	Алелен	101/297	235/755	0.52	67/195	103/377	0.20	34/102	132/378	0.83
7	*LEP*	rs7799039	A	G	Генотипен	45/89/65	91/250/153	0.30	32/59/40	45/123/71	0.37	13/30/25	46/127/82	0.69
			A	G	Алелен	179/219	432/556	0.67	123/139	213/265	0.53	56/80	219/291	0.71
7	*eNOS3*	rs3918226	T	C	Генотипен	4/25/168	5/79/410	0.95	2/18/109	2/41/196	0.83	2/7/59	3/38/214	0.98
			T	C	Алелен	33/361	89/899	0.71	22/236	45/433	0.69	11/125	44/466	0.84
9	*9p21*	rs7865618	G	A	Генотипен	24/91/84	84/245/166	0.06	13/66/52	32/130/78	0.32	11/25/32	52/115/88	0.16
			G	A	Алелен	139/259	413/577	0.019	92/170	194/286	0.16	47/89	219/291	0.08
9	*9p21*	rs1537378	T	C	Генотипен	27/71/64	79/237/178	0.64	16/49/37	40/123/78	0.78	11/22/27	39/114/100	0.50
			T	C	Алелен	125/199	395/593	0.66	81/123	203/279	0.56	44/76	192/314	0.80
9	*9p21*	rs7857345	T	C	Генотипен	12/69/116	39/192/263	0.37	7/52/70	13/97/130	1	5/17/46	26/95/133	0.08
			T	C	Алелен	93/301	270/718	0.16	66/192	123/357	0.99	27/109	147/361	0.03
9	*9p21*	rs10757274	A	G	Генотипен	32/100/67	103/256/136	0.17	21/71/39	57/125/59	0.19	11/29/28	46/131/77	0.23
			A	G	Алелен	164/234	462/528	0.06	113/149	239/243	0.09	51/85	223/285	0.18
9	*9p21*	rs2383206	A	G	Генотипен	33/88/59	107/233/148	0.58	22/60/35	45/123/69	0.99	11/28/24	62/110/79	0.40
			A	G	Алелен	154/206	447/529	0.325	104/130	213/261	0.90	50/76	234/268	0.16
9	*9p21*	rs10757278	A	G	Генотипен	40/99/58	111/247/129	0.655	29/67/34	60/118/61	0.83	11/32/24	51/129/68	0.38

			A	G	Алелен	179/215	469/505	0.36	125/135	238/240	0.66	54/80	231/265	0.20
9	***ABO***	**rs579459**	C	T	Генотипен	20/92/87	34/209/250	0.16	14/60/57	16/101/122	0.24	6/32/30	18/108/128	0.64
			C	T	Алелен	132/266	277/709	0.06	88/174	133/345	0.10	44/92	144/364	0.36
10	***MBL2***	**rs1800450**	T	C	Генотипен	4/55/140	13/115/365	0.54	3/37/91	8/62/169	1	1/18/49	5/53/196	0.56
			T	C	Алелен	63/335	141/845	0.47	43/219	78/400	0.97	20/116	63/445	0.48
10	***TCF7L2***	**rs7903146**	T	C	Генотипен	19/85/91	49/215/230	1	12/52/64	20/98/122	0.94	7/33/27	29/117/108	0.90
			T	C	Алелен	123/267	313/675	0.96	76/180	138/342	0.79	47/87	175/333	0.89
10	***TCF7L2***	**rs290481**	T	C	Генотипен	7/63/127	32/159/303	0.31	5/42/83	17/82/140	0.40	2/21/44	15/77/163	0.72
			T	C	Алелен	77/317	223/765	0.22	52/208	116/362	0.19	25/109	107/403	0.55
12	***ATP2B1***	**rs2681472**	G	A	Генотипен	10/65/123	8/138/348	0.01	9/49/72	3/69/168	0.10	1/16/51	5/69/180	0.75
			G	A	Алелен	85/311	154/834	0.009	67/193	75/405	0.001	18/118	79/429	0.50
15	***CYP2C8***	**rs1050968**	C	T	Генотипен	2/40/138	6/89/385	0.49	2/23/91	2/39/194	0.60	0/17/47	4/50/191	0.89
			C	T	Алелен	44/316	101/859	0.38	27/205	43/427	0.30	17/111	58/432	0.66
16	***FTO***	**rs9939609**	A	T	Генотипен	29/99/69	99/235/158	0.25	21/69/40	42/121/76	0.89	8/30/29	57/114/82	0.09
			A	T	Алелен	157/237	433/551	0.16	111/149	205/273	1	46/88	228/278	0.026
16	***CDH13***	**rs11646213**	A	T	Генотипен	25/98/76	83/245/166	0.29	16/75/40	40/111/89	0.12	9/23/36	43/134/77	0.002
			A	T	Алелен	148/250	411/577	0.13	107/155	191/289	0.78	41/95	220/288	0.005
19	***APOE***	**rs429358**	C	T	Генотипен	2/41/155	2/84/410	0.36	1/31/98	1/32/208	0.20	1/10/57	1/52/202	0.73
			C	T	Алелен	45/351	88/904	0.15	33/227	34/448	0.01	12/124	54/456	0.55
19	***APOE***	**rs7412**	T	C	Генотипен	1/27/166	4/66/420	1	0/16/111	2/29/210	1	1/11/55	2/37/210	0.69
			T	C	Алелен	29/359	74/906	0.96	16/238	33/449	0.78	13/121	41/457	0.59
20	***GNAS, EDN3***	**rs6015450**	G	A	Генотипен	4/30/165	9/98/387	0.58	3/19/109	7/52/180	0.23	1/11/56	2/46/207	1
			G	A	Алелен	38/360	116/872	0.24	25/237	66/412	0.09	13/123	50/460	0.93

Табл. 8. 6. Разпределение на алелните и генотипни честоти на изследваните полиморфни варианти в групата на пациентите с ИБС (без прекаран миокарден инфаркт) и ИБС (със прекаран миокарден инфаркт).

Хр.	Ген	Вариант	Алел 1	Алел 2	Модел	Общо			Мъже			Жени		
						ИБС	ИМ	P	ИБС	ИМ	P	ИБС	ИМ	P
1	***PCSK9***	**rs11206510**	C	T	Генотипен	3/45/149	5/42/77	0.01	1/33/96	3/26/46	0.08	02/12/1953	2/16/31	0.21
			C	T	Алелен	51/343	52/196	0.007	35/225	32/118	0.038	16/118	20/78	0.08
1	***CYP2J2***	**rs890283**	A	C	Генотипен	2/20/127	03/12/1990	1	1/12/78	3/6/50	0.59	1/08/49	0/6/40	0.82
			A	C	Алелен	24/274	18/192	0.84	14/168	12/106	0.46	10/106	6/86	0.57
1	***IL6R***	**rs2229238**	T	C	Генотипен	14/54/131	4/39/82	0.74	9/37/85	2/24/50	0.71	5/17/46	2/15/32	1
			T	C	Алелен	82/316	47/203	0.58	55/207	28/124	0.53	27/109	19/79	0.93
2	***IRS1***	**rs1801278**	T	C	Генотипен	0/18/178	0/19/104	0.26	0/10/120	0/13/62	0.09	0/8/58	0/6/42	1
			T	C	Алелен	18/374	19/227	0.10	10/250	13/137	0.04	8/124	6/90	0.95
3	***ADIPOQ***	**rs266729**	G	C	Генотипен	13/78/106	9/51/64	0.92	9/52/70	4/39/33	0.76	4/26/36	5/12/31	0.78
			G	C	Алелен	104/290	69/179	0.69	70/192	47/105	0.36	34/98	22/74	0.62
3	***ADIPOQ***	**rs2241766**	G	T	Генотипен	2/34/130	1/22/87	1	2/24/77	1/11/54	0.63	0/10/53	0/11/33	0.42
			G	T	Алелен	38/294	24/196	0.85	28/178	13/119	0.30	10/116	11/77	0.27
3	***ADIPOQ***	**rs1501299**	T	G	Генотипен	17/78/104	14/42/66	0.55	10/51/70	9/26/41	0.54	7/27/34	5/16/25	0.87
			T	G	Алелен	112/286	70/174	0.88	71/191	44/108	0.69	41/95	26/66	0.76
5	***NPR3,C5orf23***	**rs1173771**	A	G	Генотипен	33/108/58	20/67/38	0.97	22/69/40	8/45/23	0.43	11/39/18	12/22/15	0.36
			A	G	Алелен	174/224	107/143	0.82	113/149	61/91	0.55	61/75	46/52	0.75
6	***PHACTR1***	**rs9349379**	G	A	Генотипен	40/93/61	20/50/53	0.11	28/62/38	14/32/29	0.42	12/31/23	6/18/24	0.26
			G	A	Алелен	173/215	90/156	0.046	118/138	60/90	0.23	55/77	30/66	0.11
6	***MTHFD1L***	**rs6922269**	A	G	Генотипен	13/75/111	10/47/68	0.88	8/51/72	7/30/39	0.68	5/24/39	3/17/29	0.93
			A	G	Алелен	101/297	67/183	0.69	67/195	44/108	0.46	34/102	23/75	0.79
7	***LEP***	**rs7799039**	A	G	Генотипен	45/89/65	33/52/37	0.66	32/59/40	20/34/22	0.95	13/30/25	13/18/15	0.52
			A	G	Алелен	179/219	118/126	0.40	123/139	74/78	0.73	56/80	44/48	0.32
7	***eNOS3***	**rs3918226**	T	C	Генотипен	4/25/168	0/27/98	0.56	2/18/109	0/13/63	1	2/7/59	0/14/35	0.29
			T	C	Алелен	33/361	27/223	0.30	22/236	13/139	0.99	11/125	14/84	0.13
9	***9p21***	**rs7865618**	G	A	Генотипен	24/91/84	18/56/51	0.83	13/66/52	8/38/30	0.99	11/25/32	10/18/21	0.82
			G	A	Алелен	139/259	92/158	0.63	92/170	54/98	0.93	47/89	38/60	0.51
9	***9p21***	**rs1537378**	T	C	Генотипен	27/71/64	11/51/48	0.29	16/49/37	6/34/26	0.47	11/22/27	5/17/22	0.62
			T	C	Алелен	125/199	73/147	0.20	81/123	46/86	0.37	44/76	27/61	0.37
9	***9p21***	**rs7857345**	T	C	Генотипен	12/69/116	11/48/66	0.47	7/52/70	5/31/40	0.94	5/17/46	6/17/26	0.27
			T	C	Алелен	93/301	70/180	0.21	66/192	41/111	0.76	27/109	29/69	0.09
9	***9p21***	**rs10757274**	A	G	Генотипен	32/100/67	23/61/39	0.82	21/71/39	15/35/25	0.56	11/29/28	8/26/14	0.38
			A	G	Алелен	164/234	107/139	0.57	113/149	65/85	0.97	51/85	42/54	0.34
9	***9p21***	**rs2383206**	A	G	Генотипен	33/88/59	24/59/29	0.45	22/60/35	17/33/17	0.55	11/28/24	7/26/12	0.36
			A	G	Алелен	154/206	107/117	0.24	104/130	67/67	0.30	50/76	40/50	0.48

9	***9p21***	**rs10757278**	A	G	Генотипен	40/99/58	28/64/31	0.69	29/67/34	19/36/20	0.86	11/32/24	9/28/11	0.33
			A	G	Алелен	179/215	120/126	0.41	125/135	74/76	0.81	54/80	46/50	0.25
9	***ABO***	**rs579459**	C	T	Генотипен	20/92/87	17/52/56	0.54	14/60/57	10/30/36	0.65	6/32/30	7/22/20	0.65
			C	T	Алелен	132/266	86/164	0.75	88/174	50/102	0.89	44/92	36/62	0.49
10	***MBL2***	**rs1800450**	T	C	Генотипен	4/55/140	3/38/84	0.76	3/37/91	1/24/51	1	1/18/49	2/14/33	0.67
			T	C	Алелен	63/335	44/206	0.56	43/219	26/126	0.86	20/116	18/80	0.45
10	***TCF7L2***	**rs7903146**	T	C	Генотипен	19/85/91	14/49/56	0.82	12/52/64	9/31/34	0.77	7/33/27	5/18/22	0.62
			T	C	Алелен	123/267	77/161	0.83	76/180	49/99	0.47	47/87	28/62	0.54
10	***TCF7L2***	**rs290481**	T	C	Генотипен	7/63/127	5/37/82	0.91	5/42/83	0/20/55	0.16	2/21/44	5/17/27	0.36
			T	C	Алелен	77/317	47/201	0.85	52/208	20/130	0.09	25/109	27/71	0.11
12	***ATP2B1***	**rs2681472**	G	A	Генотипен	10/65/123	4/40/81	0.63	9/49/72	2/23/51	0.20	1/16/51	2/17/30	0.39
			G	A	Алелен	85/311	48/202	0.49	67/193	27/125	0.06	18/118	21/77	0.10
15	***CYP2C8***	**rs1050968**	C	T	Генотипен	2/40/138	1/27/85	1	2/23/91	1/17/48	0.63	0/17/47	0/10/37	0.76
			C	T	Алелен	44/316	29/197	0.83	27/205	19/113	0.45	17/111	10/84	0.55
16	***FTO***	**rs9939609**	A	T	Генотипен	29/99/69	18/71/35	0.41	21/69/40	11/42/22	0.92	8/30/29	7/29/13	0.18
			A	T	Алелен	157/237	107/141	0.41	111/149	64/86	1.00	46/88	43/55	0.14
16	***CDH13***	**rs11646213**	A	T	Генотипен	25/98/76	28/59/35	0.03	16/75/40	17/34/23	0.10	9/23/36	11/25/12	0.01
			A	T	Алелен	148/250	115/129	0.01	107/155	68/80	0.32	41/95	47/49	0.004
19	***APOE***	**rs429358**	C	T	Генотипен	2/41/155	3/30/92	0.36	1/31/98	1/16/59	1	1/10/57	2/14/33	0.10
			C	T	Алелен	45/351	36/214	0.26	33/227	18/134	0.80	12/124	18/80	0.03
19	***APOE***	**rs7412**	T	C	Генотипен	1/27/166	0/12/111	0.31	0/16/111	0/8/66	0.96	1/11/55	0/4/45	0.27
			T	C	Алелен	29/359	12/234	0.20	16/238	8/140	0.72	13/121	4/94	0.11
20	***GNAS, EDN3***	**rs6015450**	G	A	Генотипен	4/30/165	1/19/105	0.83	3/19/109	0/6/70	0.09	1/11/56	1/13/35	0.34
			G	A	Алелен	38/360	21/229	0.62	25/237	6/146	0.037	13/123	15/83	0.18

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ 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** – accepted.

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 review.

Tzveova R., Naydenova G., Yaneva T., Dimitrov G., Vandeva S., Matrozova Y., Pendicheva-Duhlenska 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: 2.77

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. Вындева, Й. Матрозова, Г. Найденова, Д. Пендичева - Духленска, А. Миткова, С. Захариева, 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. Вындева, Й. Матрозова, К. Найденов, О. Белчева, А. Миткова, С. Захариева, 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., Matrozova 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 Montenegrian 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, тромбоемболизмът е водеща причина за заболеваемост и смъртност в следствие на миокарден инфаркт и мозъчен инсулт. Основните медикаменти, които се използват за профилактика и лечение на тромбози са антикоагулантите и тромоцитните 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±2.00 (SD) мг за *CYP2C9 *1*1* и 4.01±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 показа, 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 отхвърляне на установените зависимости. За първи път бяха установени и описани и епистатични вазаимодействия 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 (resspective) 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 dailymaintenance doses of acenocoumarol (3.51 ± 2.00 (SD) mg for *CYP2C9*1*1* and 4.01 ± 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 establishedrelations. 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.