

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје
Медицински факултет – Скопје
Универзитетска клиника за кардиологија – Скопје



**АСОЦИРАНОСТ НА ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ НА
МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕИНАЗА – 1, НА МАТРИКС
МЕТАЛОПРОТЕИНАЗА – 9 И НА АЗОТЕН ОКСИД
СИНТЕТАЗА – 3 СО КОРОНАРНАТА АРТЕРИСКА
БОЛЕСТ КАЈ ПОМЛАДА ПОПУЛАЦИЈА**

-ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА-

Ас. д-р Марјан Бошев
Универзитетска клиника за кардиологија - Скопје

Ментор
Науч. сов. д-р Светлана Станковиќ

Скопје, 2024 година

Посветено на мојата фамилија,

*На моите родители Снежана и Јорго кои ми го осветлија животниот пат,
На мојот брат Виктор, за неговата пожртвуваност и братска љубов,
На моите ќерки Ана и Теа, непресушен извор на мојата среќа и радост,
На мојата сопруга Биљана, за нејзината љубов, поддршка и истрајност*

СОДРЖИНА

КОРИСТЕНИ КРАТЕНКИ И АКРОНИМИ.....	iv
АПСТРАКТ.....	v
ABSTRACT.....	viii
1. ВОВЕД.....	1
2. МОТИВ.....	12
3. ЦЕЛИ.....	12
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	13
4.1. Тип на студијата.....	13
4.2. Испитувана популација.....	13
4.3. Клинички испитувања.....	15
4.4. Постапка на земање примероци крв.....	15
4.5. Молекуларно-генетски анализи.....	15
4.6. Дефиниции.....	18
5. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА.....	20
6. РЕЗУЛТАТИ.....	22
7. ДИСКУСИЈА.....	64
.	
8. ЗАКЛУЧОК.....	88
9. РЕФЕРЕНЦИ.....	91

КОРИСТЕНИ КРАТЕНКИ И АКРОНИМИ

КАБ	коронарна артериска болест
АМИ	акутен миокарден инфаркт
АПС	стабилна ангина пекторис
АПНС	нестабилна ангина пекторис
АКС	акутен коронарен синдром
НСТЕМИ	миокарден инфаркт без СТ-сегмент елевација
СТЕМИ	миокарден инфаркт со СТ-сегмент елевација
ICAM-1	intercellular adhesion molecule – 1
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule – 1
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
IL-1 β	interleukin-1 beta
IL-6	interleukin-6
IL-12	interleukin-12
TGF- β	tumor growth factor beta
IL-10	interleukin-10
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
КСТ	коронарен стрес-тест
ЕХОК	Ехокардиографија
МПИС	миокардна перфузиона сцинтиграфија
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
PCR	полимеразно-верижна реакција
RT-PCR	полимеразно-верижна реакција во реално време
SNP	single-nucleotide polymorphism (единечен нуклеотиден полиморфизам)
MMP	matrix metalloproteinases (матрикс металопротеинази)
TIMP	tissue inhibitor of MMP (ткивен инхибитор на MMP)
NO	азот (II) оксид (азотен моноксид)
eNOS	endothelial nitric-oxide synthase (ендотелна азотен оксид синтетаза)
cGMP	цикличен гванозин монофосфат
LM	left main (лево главно стебло)
LAD	left anterior descending (лева предна десцендентна артерија)
Diag	diagonal (дијагонална артерија)
Cx	circumflex (циркумфлексна артерија)
OM	obtuse marginal (оптузна маргинална гранка)
Ri	ramus intermedius (интермедиерна гранка)
RCA	right coronary artery (десна коронарна артерија)
ПКИ	перкутана коронарна интервенција
CABG	coronary artery bypass graft (аорто-коронарен бајпас)
GWAS	genome-wide association study (геном-асоцијативни студии)
OCT	optical coherence tomography (оптичка кохерентна томографија)
IVUS	intravascular ultrasound (интраваскуларен ултразвук)
FFR	fractional flow reserve (фракционална резерва на протокот)
BMI	body mass index (индекс на телесна маса)
SCAD	spontaneous coronary artery dissection (спонтанa коронарна артериска дисекција)

АПСТРАКТ

Кус вовед

Коронарната артериска болест (КАБ) претставува комплексно заболување кое се должи на меѓусебна интеракција на бројни, таканаречени традиционални ризик-фактори и коморбидни состојби (како што се дислипидемијата, пушењето цигари, дебелината, дијабетесот, артериската хипертензија), факторите на средината и генетските фактори. Доказите за генетскиот придонес кон развојот на КАБ, особено последниве 2 децении, се силни и конзистентни. Од особено значење е што голем број утврдени генски полиморфизми кај помлада популација со КАБ се наоѓаат во непосредна близина или се лоцирани во самите гени поврзани со инфламаторниот одговор и процесите на ткивно одржување и ремоделирање.

Во оваа студија се испитувани следниве генски полиморфизми: -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1, потоа -1562 C>T, познат и како C-1562T (rs3918242) во генот MMP-9, како и полиморфизмот -786 T>C, познат и како T-786C или E298D (rs2070744) во генот за ендотелната азотен оксид синтетаза (eNOS).

Цел

Основната цел на студијата беше да се определи постоењето на генетска асоцијација на полиморфизмите MMP-1 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C>T (rs 3918242) и eNOS T>C (rs2070744) од една страна, со појавата на коронарографски верифицирана сигнификантна коронарна артериска болест кај помлада македонска популација пациенти од друга страна.

Материјали и методи

Во оваа проспективна, опсервациска, генетско-асоцијативна студија на случаи и контроли, анализирани се генетските податоци од испитувана група составена од 40 случаи на возраст до 45-годишна возраст со ангиографски докажана сигнификантна КАБ и контролна група составена од 40 пациенти на возраст до 45 години, но со уреден ангиографски наод или со ангиографски наод без сигнификантни коронарни лезии.

Определувањето на генотиповите на трите генски полиморфизми е извршено со генотипизација користејќи TaqMan-флуоресцентни сонди и PCR-амплификацијата во реално време (RT-PCR). За проценка на генетската поврзаност се користени статистички анализи и генетско-асоцијативни модели за споредба на фреквенциите на генотиповите и алелите на испитуваните генски полиморфизми меѓу пациентите со и без сигнификантна коронарна артериска болест.

Резултати

Во однос на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1, носителите на хомозиготниот генотип 2G/2G според генотипскиот модел имаат 5,641 пати поголема веројатност (OR - odds ratio) за појава на коронарна артериска болест од тие со референтниот генотип 1G/1G при што оваа поврзаност е статистички значајна ($p=0,045$).

Дополнителна потврда на сигнификантно зголемената веројатност кај носителите на генотипови со присутниот алел 2G е добиена и при анализите со доминантниот, рецесивниот, алелниот и адитивниот модел.

Евалуацијата на резултатите за полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 покажаа дека хомозиготниот варијантен генотип TT е поврзан со 6,316 пати повисока веројатност за појава на значајна коронарна артериска болест кај помлади од 45 години, отколку носителите на неваријантниот генотип CC ($p=0,034$). Зголемени и статистички значајни вредности на веројатносниот индекс се добиени и при користење на доминантниот, хетерозиготниот, алелниот и адитивниот генетски асоцијативен модел.

Резултатите од анализите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS покажаа дека носителите на хомозиготниот варијантен генотип CC имаат 4,219 пати повисоки шанси за развој на сигнификантна КАБ отколку тие со генотипот TT кој е користен како референтен, а овие разлики се статистички сигнификантни ($p=0,042$). Значајно повисоки веројатносни индекси се добиени и при користењето на доминантниот, хетерозиготниот, алелниот и адитивниот генетски модел.

Со мултиваријантната логистичка регресија се потврди дека хомозиготните варијантни и хетерозиготните генотипови на трите

полиморфизми ја зголемуваат вредноста на β -коефициентите за веројатноста од појава на сигнификантна коронарна артериска болест во однос на референтниот хомозиготен неваријантен генотип за секој полиморфизам.

Вредноста на површината под ROC-кривата ($AUC=0,761$) укажува на добра предиктивност на мултиваријантниот модел на комбинираните ефекти на трите полиморфизми во однос на појавата на сигнификантна коронарна артериска болест. Моделот успешно го класифицирал присуството или отсуството на сигнификантна коронарна артериска болест кај 66,25% од случаите. Специфичноста, односно стапката на вистински негативни случаи во однос на постоење на сигнификантна КАБ изнесува 75%, додека сензитивноста, односна стапката на вистински позитивни случаи во однос на коронарната артериска болест е 57,50%.

Заклучок

Добиените резултати од студијата јасно укажуваат на постоење на генетска асоцијација на полиморфизмите MMP-1 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C>T (rs 3918242) и eNOS T>C (rs2070744) со сигнификантна коронарна артериска болест кај македонска популација на возраст до 45 години.

Тоа сугерира дека е потребно да се извршат дополнителни истражувања со вклучување на поголем број испитаници со цел истите да се валидираат и да се евалуира апликативноста на овие потенцијални генски маркери во персонализираниот пристап при клиничката предикција на ризикот од појава на коронарна артериска болест кај помлади пациенти.

Клучни зборови: коронарна артериска болест, генски полиморфизми, MMP-1, MMP-9, eNOS, пациенти на возраст до 45 години.

ABSTRACT

Brief introduction

Coronary artery disease (CAD) is a complex disease due to the interaction of numerous, so-called traditional risk factors and comorbid conditions (such as dyslipidemia, cigarette smoking, obesity, diabetes, arterial hypertension), environmental factors and genetic factors. The evidence for a genetic contribution to the development of CAD, especially in the last two decades is strong and consistent. Of particular importance is that a number of established gene polymorphisms in the younger CAD population are in close proximity or are located in the very genes involved in the inflammatory response and the processes of tissue maintenance and remodeling.

The following gene polymorphisms were investigated in this study: -1607 1G/2G (rs1799750) in the MMP-1 gene, then -1562 C>T, also known as C-1562T (rs3918242) in the promoter region of the MMP-9 gene, as well as the polymorphism -786 T>C, also known as T-786C or E298D (rs2070744) in the promoter region of the gene for endothelial nitric oxide synthetase (eNOS).

Aim

The main aim of the study was to determine the genetic association of the polymorphisms MMP-1 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C>T (rs 3918242) and eNOS T>C (rs2070744) from one side with the occurrence of angiographically verified significant coronary artery disease in a younger Macedonian population from other side.

Materials and methods

In this prospective, observational, genetic-association, case-control study, the genetic data of a study group consisting of 40 cases up to 45 years of age with angiographically verified significant CAD and a control group consisting of 40 patients up to 45 years of age having normal angiographic results or angiographic results without significant coronary lesions. Genotypes of the three gene

polymorphisms were determined using TaqMan fluorescent probes and real-time PCR amplification (RT-PCR). To evaluate the genetic association, statistical analyzes and genetic-association models were used to compare the frequencies of genotypes and alleles of the investigated gene polymorphisms between patients with and without significant coronary artery disease.

Results

Regarding the rs1799750 polymorphism in the MMP-1 gene, the carriers of the homozygous genotype 2G/2G according to the genotypic model have 5,641 times higher probability (OR - odds ratio) of coronary artery disease than those with the reference genotype 1G/1G, while this association is statistically significant ($p=0,045$). Additional confirmation of the significantly increased probability in carriers of genotypes with the present 2G allele was also obtained by the dominant, recessive, allelic and additive models.

Evaluation of the results for the rs3918242 polymorphism in the MMP-9 gene showed that the homozygous variant genotype TT was associated with a 6,316-fold higher probability of development of significant coronary artery disease in patients up to 45 years of age than carriers of the non-variant genotype CC ($p=0,034$). Increased and statistically significant values of the probability index were also obtained when using the dominant, heterozygous, allelic and additive genetic-associative models.

The results of the analyzes of the rs2070744 polymorphism in the eNOS gene showed that the carriers of the homozygous variant genotype CC have 4,219 times higher odds of developing significant CAD than those with the TT genotype used as a reference, and these differences are statistically significant ($p=0,042$). Significantly higher probability ORs were also obtained using the dominant, heterozygous, allelic and additive genetic models.

Multivariate logistic regression confirmed that the homozygous variant and heterozygous genotypes of the three polymorphisms increase the values of the beta-coefficients for the probability of significant coronary artery disease regarding the reference homozygous non-variant genotype for each polymorphism.

The value of area under the ROC curve ($AUC=0,761$) indicates a good predictive power of the multivariate model of the combined effects of the three polymorphisms

in relation to the occurrence of significant coronary artery disease in younger patients. The model successfully classified the presence or absence of significant coronary artery disease in 66.25% of cases. The specificity, i.e. the rate of true negative cases in relation to the existence of significant CAD is 75%, while the sensitivity, i.e. the rate of true positive cases in relation to coronary artery disease is 57.50%.

Conclusion

The results of this study clearly indicate the existence of a genetic association of MMP-1 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C>T (rs3918242) and eNOS T>C (rs2070744) polymorphisms with significant coronary artery disease in Macedonian population up to 45 years old. This suggests that further studies are needed involving a larger number of subjects to validate and evaluate the applicability of these potential genetic markers in a personalized approach to the clinical prediction of coronary artery disease risk in younger patients.

Key words: coronary artery disease, gene polymorphisms, MMP-1, MMP-9, eNOS, patients up to 45 years old.

1. ВОВЕД

Коронарна артериска болест: инциденца, дефиниција и етиопатогенеза

Коронарната артериска болест (КАБ) претставува една од главните причини за морбидитет и морталитет на светско ниво и покрај сигнификантниот прогрес во поставувањето на дијагнозата и тераписките модалитети [1-5]. Инциденцата на КАБ кај помлада популација во литературата е релативно ниска и изнесува 2-10% [1, 6, 7, 8]. Кога станува збор за КАБ и „млада“ или „помлада популација“ во литературата постојат одредени разијдувања, но повеќето автори сметаат дека со овие термини би требало да се опфати популација до 45-годишна возраст [2, 5, 6]. Оттука, и во нашето истражување претходно споменатите термини ќе се однесуваат на лица до 45-годишна возраст.

Според најновите сознанија, КАБ претставува комплексно заболување кое со должи на меѓусебна интеракција на бројни, таканаречени традиционални ризик фактори и коморбидни состојби (како што се дислипидемијата, пушењето цигари, дебелината, дијабетесот, артериската хипертензија), факторите на средината и генетските фактори. Некои автори ја дефинираат КАБ како едно комплексно генетско заболување кое не ги следи принципите на Менделово наследување, туку наследувањето се должи на мултипли генски варијанти (полигенско заболување) кои делуваат синхронизирано со факторите на средината и животниот стил во промоција на ова заболување [9]. Според податоци кои се добиени од студии на фамилии и близнаци, се смета дека наследноста на КАБ изнесува помеѓу 40% и 60% [10-14].

Досегашните студии сугерираат дека кај помлада популација како најчести ризик фактори коишто се среќаваат се пушењето цигари, дебелината, дислипидемијата и позитивната фамилијарна историја за КАБ [2, 6, 8], а поретка е инциденцата на артериска хипертензија и дијабетес [1]. Во студијата CARDIA особено е потенциран проблемот на дебелината кај младите Американци, додека, пак, индексот на телесната маса ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) се смета за еден од најбитните ризик-фактори за КАБ во корелација со пушењето цигари и дислипидемијата [8]. Машкиот пол е многу почесто застапен кај акутниот коронарен синдром (АКС) и тоа односот машки : женски пол се движи во рангот од 5:2 до 9:1 [2].

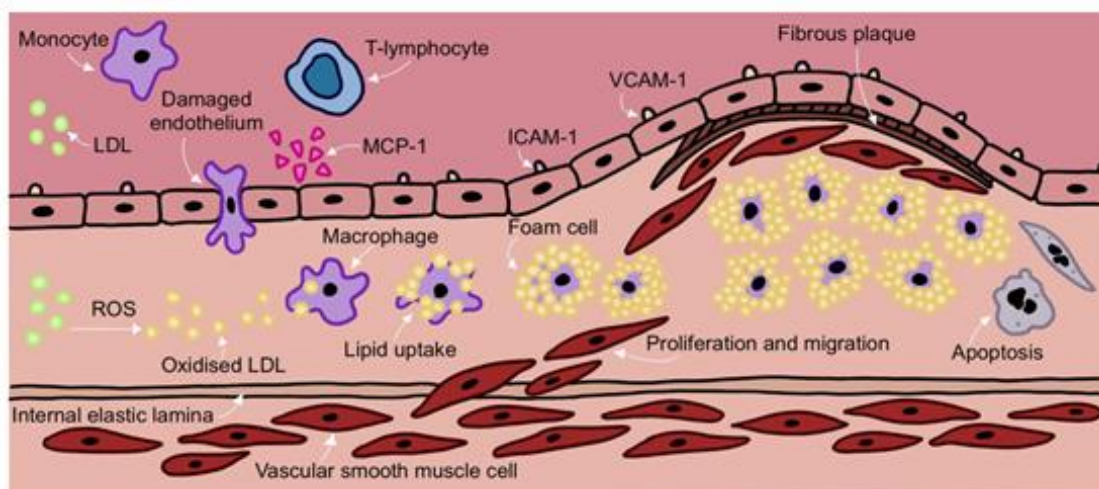
Основниот патогенетски механизам на настанување на КАБ се должи на атеросклерозата и таа претставува основа за манифестација на стабилна ангина пекторис (АПС) - форма на хроничен коронарен синдром - која почесто се гледа кај повозрасната популација. Но, она што е типично за помлада популација е дека преваленцата на АПС е релативно ниска и според некои податоци изнесува од 1,2-11% според едни автори [5], па сè до 24% според други [1, 3]. Спротивно, помладата популација многу почесто како прва манифестација на КАБ ја има најтешката форма на КАБ, односно АКС чија преваленца изнесува над 70% [1].

Во основата на АКС кај помлада популација можат да се наоѓаат атеросклеротични и неатеросклеротични причини.

Атеросклерозата како процес започнува уште во детството и раната детекција може да има сигнификантен придонес во превенција и развој на кардиоваскуларните заболувања. Главната улога во појавата на атеросклерозата се поврзува со нарушената функција на васкуларниот ендотел односно ендотелната дисфункција. Ендотелната функција е генетски одредена и детерминирањето на некои видови генски полиморфизми за кои ќе стане збор подолу во ова истражување може сигнификантно да влијае врз неа. Ендотелната дисфункција доведува до намалена продукција на азотен моноксид односно азот (II) оксид (потентен вазодилатор), зголемување на степенот на васкуларна пермеабилност, како и зголемена субинтимална депозиција на липопротеини [2].

Липопротеините се инволвирани во процесот на оксидација и оксидираните липопротеини потоа се фагоцитираат од страна на макрофагите (трансформирани моноцити од крвниот проток) кои се наоѓаат локализирани во субендотелното ткиво. Ова е долготраен процес кој постепено доведува до претворање на макрофагите во т.н. пенести клетки. Истовремено ендотелните клетки секретираат различни адхезивни молекули (adhesive molecules – како на пример ICAM-1, VCAM-1) кои имаат критична улога во медијација на цврста адхезија на леукоцитите за ендотелните клетки при акутни и хронични инфламаторни процеси. Инфламаторните процеси, пак, од друга страна, ги стимулираат моноцитите, макрофагите и Т-лимфоцитите да секретираат бројни цитокини и интерлеукини односно проинфламаторни молекули као $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$, како и антиинфламаторни молекули, како на пример $TGF-\beta$ и $IL-10$. Оваа комплексна мрежа од клетки и инфламаторни молекули, всушност, го

олеснува процесот на хронична инфламација, клеточна миграција и формирање на атеросклеротични плаки (в. слика 1. Патогенеза на атеросклерозата).



Слика 1. Патогенеза на атеросклерозата (преземено од Batty M, Bennett MR, Yu E. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells* 2022, 11(23), 3843; <https://doi.org/10.3390/cells11233843>)

Многу клетки во овој процес завршуваат со апоптоза која е стимулус за интимална миграција на мазни мускулни клетки од медијата. Апоптозата на мазните мускулни клетки води до истенчување на атеросклеротичната капа и дестабилизација на атеросклеротичната плака. Понатамошната инфламација доведува до ткивна хипоксија и зголемена продукција на одредени матрикс металопротеинази (MMP), процес кој исто така може да води до дестабилизација на атеросклеротичните плаки и зголемен ризик за ерозија или руптура – критичен момент за интраваскуларна тромбоза и акутен миокарден инфаркт [15, 16, 17].

Неатеросклеротичните причини за АКС кај помлада популација можат да вклучат повеќе состојби, како инфламација (системски лупус еритематозус, ревматоиден артритис), траума, метаболни или пролиферативни процеси, функционални нарушувања на коронарното стебло (коронарен вазоспазам), коронарна емболија, спонтанa коронарна артериска дисекција, понатаму конгенитални аномалии на коронарните артерии, хиперкоагулабилни состојби и тромбофилија (дисеминирана интраваскуларна коагулација, полицитемија, тромбоза, дефицит на протеин С, дефицит на протеин S, зголемени нивоа на фактор II, мутации и дисфункции на фактор V Leiden, хомозиготност за MTHFR мутации и хиперхомоцистинемија итн.) [2, 3, 5]. Секако дека не треба

да се заборават и состојби поврзани со зависност од алкохол, опојни дроги и психотропни супстанции (кокаин, метамфетамин, марихуана) како можни причини за АКС со оглед дека се работи за млада популација [2, 3, 6]. Улогата на психосоцијалниот стрес е слабо препознаена и потценета и се смета дека релативно високата преваленца на анксио-депресивниот синдром кај млада популација сигнификантно придонесува кон развојот на кардиоваскуларните заболувања [3].

Дијагноза на коронарната артериска болест

Дијагнозата на КАБ, особено ако се работи за акутен коронарен синдром, обично не е тешка, додека пак кај хроничниот коронарен синдром може да постојат одредени диференцијално-дијагностички потешкотии со оглед на релативно ретката ваква манифестација на КАБ кај помлада популација. Таа се поставува врз основа на детално земена анамнеза (типична градна болка или еквивалент) и клинички преглед, понатаму ЕКГ и лабораториски иследувања. Овие елементи се вообичаено доволни за поставување дијагноза на АКС. Во проценката на веројатноста, односно ризикот за постоење на АПС т.е. хроничниот коронарен синдром можат да се користат и коронарниот стрес-тест (КСТ) и ехокардиографијата (ЕХОК). Стрес-ехокардиографијата (стрес-ЕХОК) и миокардната перфузиона сцинтиграфија (МПС) можат да се користат дополнително доколку наодите од претходните испитувања се несигурни или инконклузивни. Дефинитивната дијагноза за КАБ се поставува со коронарна ангиографија која претставува златен стандард. Со коронарната ангиографија и дополнително со интракоронарните техники (интраваскуларен ултразвук – IVUS, оптичка кохерентна томографија – OCT, фракционална резерва на протокот - FFR) можат да се добијат драгоцен и детални податоци за анатомските, морфолошките и функционални својства на коронарните артерии, и тоа на пример, да се детектира постоењето на одредени конгенитални аномалии, да се детектира коронарен вазоспазам, да се направи функционална проценка на коронарниот проток, понатаму да се направи прецизна проценка на интензитетот и екстензитетот на КАБ, степенот на калцифицираност на артериите, како и да се оцени садовноста на болеста. Врз основа на ангиографскиот наод, на одредени т.н. скорови (како што се нпр. Syntax Score I

и II, STS, Euro Score и сл.), како и врз основа на комплетна клиничка проценка на пациентот (симптоматологија, коморбидитети, лабораториски анализи на крв и слично) потоа може да се направи план и стратегија за третман на КАБ, односно да се препорача и пристапи кон соодветен интервентен третман (перкутана коронарна интервенција, ПКИ со балон-дилатација или стентирање) или оперативен третман (аорто-коронарен бај-пас, CABG) согласно актуелните водичи и препораки на Европското кардиолошко здружение (ESC). Во ситуација кога коронарната ангиографија и ПКИ како процедури не се достапни, односно не се навремено достапни, третманот на СТЕМИ подразбира примена на тромболитична односно фибринолитична терапија. На долгорочен план заедно со фармаколошкиот третман, ригорозната контрола на ризик-факторите и коморбидитетите е екстремно важна во третманот на младите пациенти со АКС [2].

Ангиографски карактеристики на акутниот коронарен синдром

Според ангиографските карактеристики, за разлика од повозрасната популација, помладата популација со АКС има помалку екстензивна КАБ и многу често е присутна едносадовна болест (доминира засегнатост на левата предна десцендентна артерија, LAD) [2, 4, 6]. Според Zimmerman и сор., 16-21% од пациентите со АКС ангиографски покажале нормален наод [2]. Според Gulati и сор., механизмите базирани на атеросклеротична плака доминираат во етиологијата на акутниот миокарден инфаркт (АМИ) кај помлада популација. Притоа, руптурата на плака опфаќа 60-65% од случаите на АМИ кај помлада популација, а од останатите – интактна фиброзна капа или ерозија на плака. Само 10-11% од пациентите имаат етиологија која не е базирана на плака и тоа како спонтанa коронарна артериска дисекција (SCAD), коронарна емболија или микроваскуларна коронарна дисфункција. Механизмот на настанување на АМИ кај последниве состојби може да се расветли со користење на понапредни визуелизациони методи како што се IVUS и OCT [3].

Генетски основи на коронарната артериска болест

И покрај очигледното и докажано значење на факторите на средината, животниот стил и индивидуалните ризик-фактори и коморбидитети, доказите за генетскиот придонес кон развојот на КАБ, особено последниве 2 децении се силни и конзистентни [9]. Расветлувањето на генетските детерминанти на КАБ останува проблематично и тешко делумно заради инволвираноста на мултипли гени, но и заради фактот што секој поединечен ген има само минорен ефект врз фенотипот [15]. Со оглед на фактот што истражувањето претставува во основа една генетско-асоцијативна студија на млада популација, сметам дека е неопходно накратко да се објаснат некои основни термини поврзани со генетиката.

Генот се дефинира како основна биолошка и функционална единица на наследувањето која има придонес кон фенотипот или детерминира некоја функција [19]. Тој всушност претставува една ДНК секвенца која има функција, што значи дека класа на слични ДНК секвенци се инволвирани во одредена молекуларна функција [20]. Околу 25 000 гени се организирани и лоцирани на 23 пара хромозоми во јадрото и тие го сочинуваат хуманиот геном [19]. Локус е локацијата на генот во самиот геном, додека пак секој ген вообичаено се состои од 2 генски алели. Со терминот алелна фреквенција се означува релативната фреквенција, т.е. пропорција од сите такви алели на локусот помеѓу членовите на една популација. Генотип претставува вкупниот индивидуален наследен материјал, додека пак фенотип претставува индивидуалниот изглед односно појава. Сепак, во пракса, терминот генотип вообичаено се однесува на некој одреден локус или сет локуси, а фенотипот на одредена особина или карактеристика. Доколку настане било каква промена односно варијација во составот на ДНК секвенцата различна од нормалниот состав, тогаш се зборува за мутација. Тоа би значело дека постои нормален алел кој е превалентен во популацијата и мутацијата го менува во ретка и абнормална варијанта. Доколку, пак, настане варијација односно промена на ДНК секвенцата која е честа во популацијата, таа промена се означува како полиморфизам [20]. Во досегашната пракса арбитрарно е земено границата помеѓу мутација и полиморфизам да изнесува 1%, што значи дека за да може да се дефинира како полиморфизам најретко застапениот алел мора да има фреквенца од $\geq 1\%$ во популацијата. Ако

фреквенцата е под 1%, тогаш се зборува за мутација. Но, со воведувањето на новите технологии на секвенционирање и супсеквентно секвенционирање на индивидуи, почна да се добива нешто покомплицирана слика. Мутациите за кои се сметаше дека се ретки кај една популација ја надминаа границата од 1%. Исто така, се појавија и ситуации при кои мутација која предизвикува болест кај една популација воопшто да не биде штетна кај друга, географски и физички одвоена популација. Ваквите исклучоци стануваат сè почести и упатуваат на потребата во блиска иднина да се рedefинираат термините „мутација“ и „полиморфизам“ [21].

Најчестиот тип мутација која придонесува за геномската уникатност претставува супституција на една база (аденин, гванин, тимин или цитозин) со друга што се означува со терминот единечен нуклеотиден полиморфизам (SNP, single nucleotide polymorphism) [19, 22]. Бројот на SNP е релативно константен и нивниот ефект врз фенотипот може да биде неутрален, бениген или да има изразен ефект. Последниве десетина години комплетирали се поголем број мултицентрични и долгорочни клинички и генетско-асоцијативни студии, вклучувајќи и геном-асоцијативни студии (GWAS, Genome-Wide Association Study). GWAS претставува релативно нова техника на генетско истражување со која се компарира фреквенцата на секоја генетска варијанта кај субјектите со болест од интерес, нпр. КАБ (испитувана група) со фреквенцата кај здрави лица (контролна група). Со оваа техника, всушност, се врши комплетно скенирање на геномот, односно се овозможува прецизна генотипизација на огромен број SNP (и до над 1 милион SNP) [19, 22]. Така на пример, првиот локус асоциран со зголемен ризик за развој на КАБ кај европска популација е откриен со GWAS уште во 2007 година и се наоѓа локализиран на 9. хромозом (9p21.3) [22-25]. Од 2007 година до денес се детектирани преку 150-200 посебни генски локуси асоцирани со КАБ. Она што е од огромно значење за расветлување на сложената генетска архитектура на КАБ е дека овие локуси детерминираат различни процеси и механизми и тоа за липидниот метаболизам, процесите на коагулација и тромбоза, инфламација, клеточна адхезија, трансендотелна миграција, клеточна пролиферација и васкуларно/ткивно ремоделирање како и васкуларен тонус и сигнализација со азотен оксид [11].

Сепак, меѓу истражувањата постојат и контрадикторни резултати, па во некои студии не е идентификувана значајна поврзаност на одреден генски

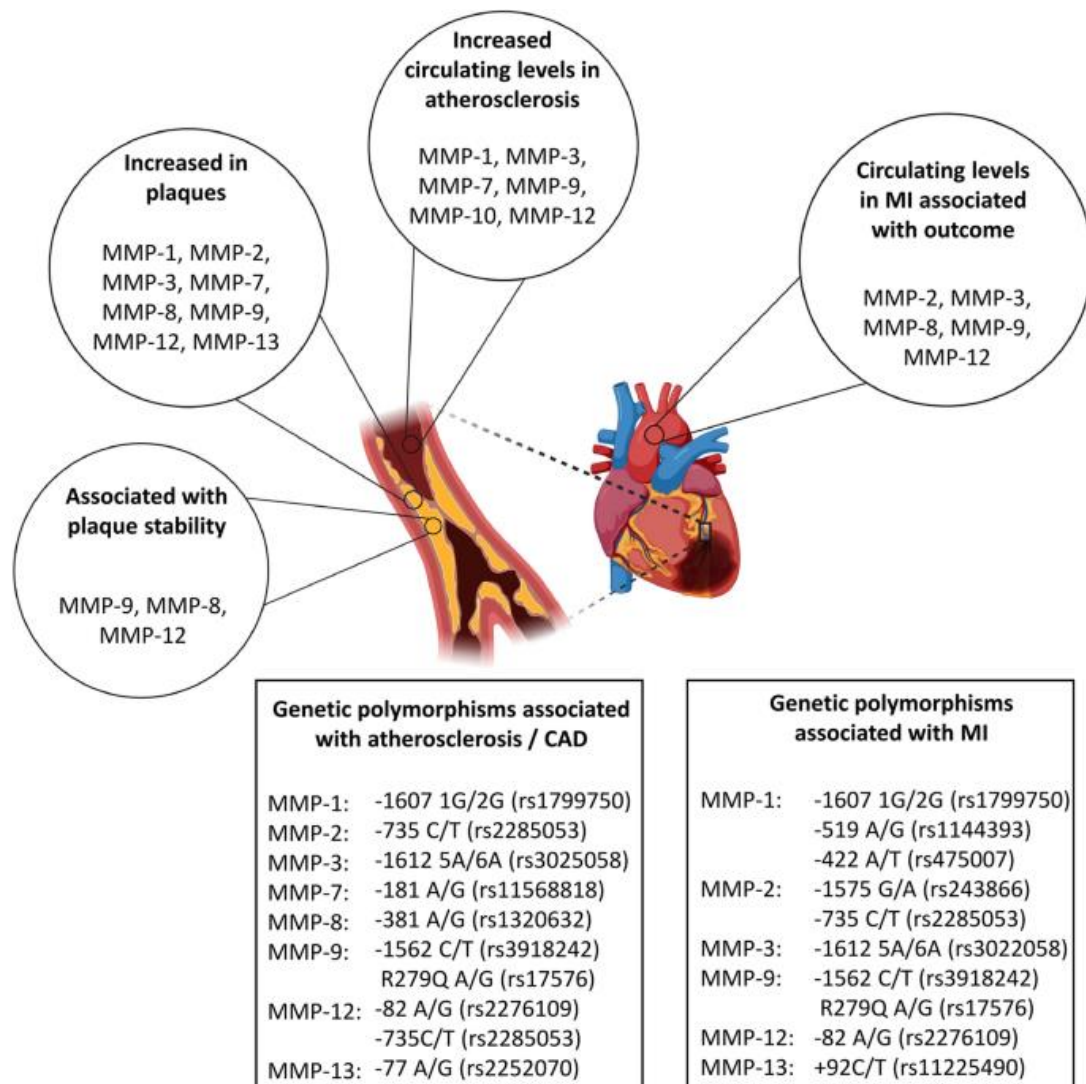
полиморфизам за кој постојат податоци за поврзаност кај определена група пациенти, најчесто од некоја етничка или географска популација.

Она што е особено индикативно е што голем број утврдени генски полиморфизми кај помлада популација со КАБ се наоѓаат во непосредна близина или се лоцирани во самите гени кои не се поврзани со липидниот метаболизам и коагулационите механизми, туку со инфламаторниот одговор и процесите на ткивно одржување и ремоделирање.

Од многуте генски полиморфизми инволвирани во етиопатогенезата на КАБ и ризикот за појава кај помлада популација, во ова истражување одлучивме да испитаме вкупно 3 полиморфизми и тоа полиморфизмите на матрикс металопротеиназите MMP-1 (MMP-1 -1607 1G/2G, rs1799750) и MMP-9 (MMP-9 -1562, C-1562T, rs3918242) коишто се инволвирани во процесите на ткивно одржување и ремоделирање и полиморфизмот на ендотелната азотен оксид синтетаза (eNOS -786, T-786C, E298D, rs2070744) којшто ја детерминира продукцијата на NO и ендотелната функција.

Матрикс металопротеиназите (MMP) претставуваат една голема и постојано растечка фамилија на цинк-зависни ендопептидази кои се одговорни за процесите на ткивно одржување, ремоделирање и деградација на екстрацелуларниот матрикс [26, 27]. Во физиолошки услови MMP се обично минимално експресирани. Можат да се класифицираат на неколку групи и тоа колагенази, желатинази, стромелизини, матрилизини и мембрански тип MMP. Активноста на MMP е комплексна и е регулирана на неколку нивоа – транскрипција, секреција, активација и инхибиција [26]. Нивната инхибиција е контролирана од фамилија на т.н. ткивни инхибитори на MMP кои се познати како TIMP (Tissue Inhibitors of MMP). Зголемена експресија на MMP резултира со дисбаланс помеѓу активноста на MMP и TIMP што може да доведе до бројни патолошки процеси како што се инфламацијата, канцерогенезата и метастазирањето, артритисот, васкуларната неointимална хиперплазија, руптурата на плака и слично [26, 28]. Тие се продуцираат од страна на различни клетки како епителните, фибробластите и инфламаторните клетки. MMP имаат влијание врз многу биолошки механизми за време на развојните и физиолошките процеси, а се особено важни за креирањето и одржувањето на микрооколината, олеснувајќи го растот и ширењето на неоплазмите, како и придонесувајќи кон развојот на кардиоваскуларните болести [26]. Така,

руптурата на плака често корелира со загубата на екстрацелуларниот матрикс. Имено, фокална деструкција на екстрацелуларниот матрикс ја прави плаката помалку резистентна на механички стрес на којшто е изложена за време на систола и на тој начин станува вулнерабилна и склона кон руптура. Постојат докази кои одат во прилог на зголемена експресија на MMP во вулнерабилните региони на плаките и ова придонесува за слабеење на нивната капа [24].



Слика 2. Матрикс металопротеинази (MMP) и нивната улога во атеросклерозата и миокардниот инфаркт (преземено и адаптирано од Bräuninger H. et al. MMPs in CAD and myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 2023;118:18)

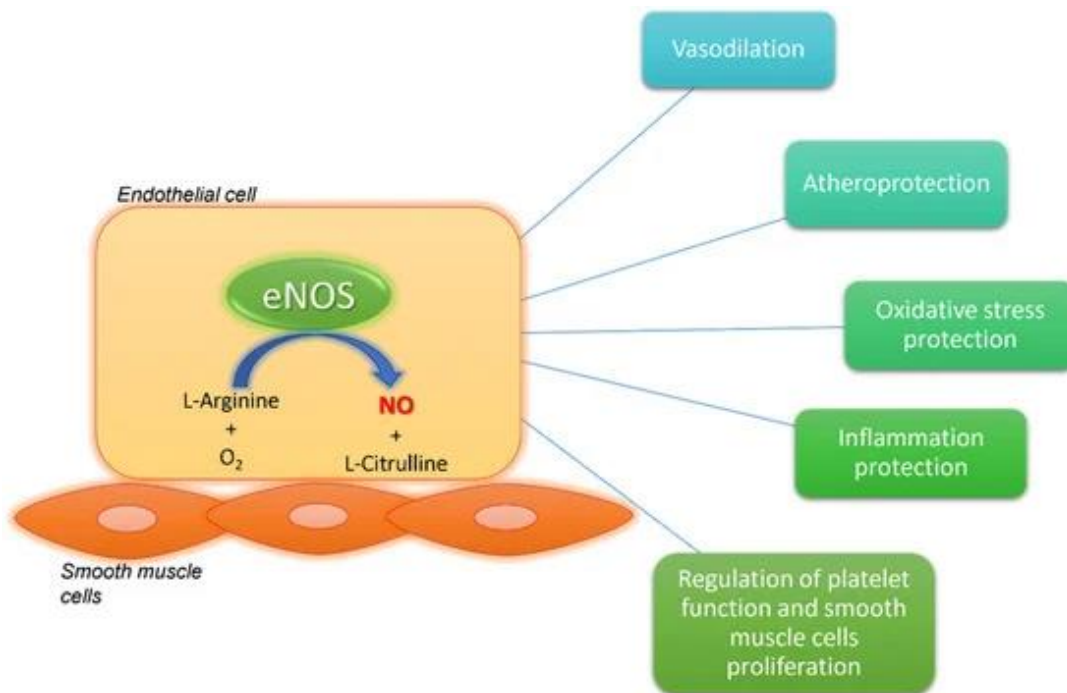
Генскиот полиморфизам MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) претставува единечна нуклеотидна варијанта (SNP) лоцирана на позицијата 1607 во промоторниот регион на генот за MMP-1 лоциран на хромозомот 11q22-q23.

Полиморфизмот се состои од инсерција на еден нуклеотид гванин (G) во наведената позиција со што се создаваат два соседни гванина и секвенцата се продолжува за еден нуклеотид. Во дивiot тип алел постои само еден гванин (1G), додека пак кај варијантниот алел се наоѓаат два гванина (2G) на позицијата 1607 во регионот на неговиот промотор. Крајниот протеински продукт на овој ген е цинк-зависна протеиназа (колагеназа – 1) која има важна улога во процесите на разложување и ремоделирање на екстрацелуларниот матрикс. Се смета дека оваа инсерција доведува до зголемена транскрипциска активност на генот што резултира со поинтензивно ензимско разложување на колагенот и други компоненти на екстрацелуларниот матрикс. Вака зголемената ензимска активност има улога кај широк опсег клинички заболувања, меѓу кои и КАБ и АМИ [26, 28].

Вториот генски полиморфизам од интерес е MMP-9 C-1562T (rs3918242). MMP-9 може да е особено важна во процесот на деградација на матриксот и супсеквентна руптура на атеросклеротичната плака бидејќи има висока специфичност за супстратот [29] и висока експресија во вулнерабилните региони на атеросклеротичната плака [28, 30, 31, 32]. Токму заради тоа, генетската анализа на овој генски полиморфизам е исклучително битна за истражување асоцираност со КАБ. Станува збор за генски полиморфизам кој се состои од мутација на цитозин (C) во тимин (T) на позиција 1562 од промоторниот ген за MMP-9 лоциран на хромозомот 16q13 што може да го афектира нивото на експресија на MMP-9 [26, 29]. Инаку, постојат бројни студии на случаи и контроли како и систематски прегледи кои се однесуваат на овој полиморфизам и КАБ, но заклучоците се инконзистентни. Во ова истражување ќе ги испитаме генотипските и алелните фреквенции на овој полиморфизам кај македонската популација и нивната можна асоцијација со КАБ.

Последниот генски полиморфизам кој е предмет на истражување во оваа докторска дисертација е eNOS T-786C (rs2070744), еден од обата најчесто истражувани полиморфизми асоциран со функцијата на ендотелната NO синтетаза (eNOS), а со тоа индиректно и со продукцијата на NO. Станува збор за SNP во промоторниот регион од генот за eNOS (NOS3) локализиран на 7q35-q36 хромозомот којшто се состои од замена на тиминот со цитозин во нуклеотидот - 786 (T-786C) за којшто е докажано дека ја редуцира активноста на промоторот

за 50% [33]. Атеросклерозата резултира од нарушена ендотелна функција што се припишува главно на нарушена продукција на NO, важен релаксирачки фактор со потекло од ендотелот. NO се синтетизира преку реакција која вклучува конверзија на L-аргинин во L-цитрулин катализирана со eNOS која претставува една од трите изоформи на ензимот [31]. Инаку, NO



Слика 3. Ендотелна азотен оксид синтетаза (eNOS) и физиолошки ефекти на азот (II) оксид (преземено од Severino P. et al. Potential Role of eNOS Genetic Variants in Ischemic Heart Disease Susceptibility and Clinical Presentation. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2021, 8(9), 116; <https://doi.org/10.3390/jcdd8090116>)

претставува вазоактивна супстанца и главен медијатор на ендотел-зависната вазодилатација. Тој по пат на дифузија навлегува од ендотелот кон мазните мускулни клетки и ја зголемува концентрацијата на цикличниот гванозин монофосфат (cGMP) преку стимулација на солубилната гванилат циклаза што доведува до васкуларна релаксација [33-36]. Освен тоа, NO доведува и до инхибиција на тромбоцитната агрегација, супресија на леукоцитна адхезија кон васкуларниот ендотел и редукција на пролиферацијата и миграцијата на васкуларните мазни мускулни клетки [36]. Оттука, нарушената продукција на NO би довела до компромитирање на сите овие позитивни ефекти и појава на ендотелна дисфункција. Досегашните студии покажуваат дека овој полиморфизам (eNOS T-786C) е асоциран со зголемен ризик за коронарен

артериски вазоспазам кај одредени популации (нпр. Јапонци), зголемен ризик за појава на КАБ и АМИ, а претставува и ризик-фактор за развој на хипертензија [37, 38].

2. МОТИВ

Во текот на долгогодишната клиничка пракса во областа на кардиологијата дојдовме до сознание дека кај млада популација со потврдена КАБ најчесто отсутствуваат т.н. традиционални (конвенционални) или класични ризик-фактори за развој на КАБ коишто вообичаено се присутни кај повозрасната популација.

Претпоставката беше дека би можело да се работи за одредени генетски фактори кои сигнификантно го зголемуваат ризикот за развој на КАБ. Оттука, мотивот за ова истражување произлезе од желбата да се истражат и расветлат одредени генетски основи во развојот на коронарната артериска болест кај млада популација, особено во услови без сигнификантно влијание на веќе познатите класични ризик-фактори за истата.

Дополнително, мотивот беше засилен и со фактот што ова генетско истражување ќе биде прво од ваков вид што ќе се спроведе на млада популација во Македонија.

3. ЦЕЛИ

Основната цел на докторската студија е да се определи постоење на генетска асоцијација на три полиморфизми со коронарната артериска болест кај помлада македонска популација пациенти.

Подетално, специфичните цели на нашето истражување се:

1. Да се утврдат генотипските и алелните фреквенции на генските полиморфизми на MMP, конкретно MMP-1 -1607 1G/2G и MMP-9 C-1562T, како и на ендотелната азотен оксид синтетаза eNOS T-786C кај испитаници до 45 годишна возраст со ангиографски докажана сигнификантна КАБ (испитувана група) наспроти испитаници на иста возраст со уреден ангиографски наод или ангиографски наод без сигнификантни коронарни лезии (контролна група),

2. Да се споредат генотипските и алелните фреквенции на наведените генски полиморфизми помеѓу испитуваната и контролната група учесници,

3. Да се утврди постоењето сигнификантна асоцијација на некој од наведените генски полиморфизми со КАБ, како и

4. Да се утврди корелација помеѓу комбинациите на било кои од испитуваните генски полиморфизми која сигнификантно ја зголемува веројатноста за појава на КАБ кај млади лица.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. Тип на студијата

Истражувањето претставува проспективна, моноцентрична, опсервациска, генетско-асоцијативна студија на случаи и контроли (case-control study).

4.2. Испитувана популација

Студијата се изведуваше во ЈЗУУ Клиника за кардиологија во соработка со Лабораторијата за молекуларна биологија и геномика при Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет – Скопје во период од 2 години. Во студијата се анализирани демографските, клиничките, лабораториските и генетските податоци на испитувана хиперселективна група од 40 учесници (пациенти) на возраст од 18 до 45 години со ангиографски детектирана сигнификантна КАБ (позитивен ангиографски наод) и на контролна група од 40 учесници (пациенти) на иста возраст со ангиографски уреден наод или наод без сигнификантни лезии на коронарните артерии (негативен ангиографски наод). И обете групи пациенти (испитувана и контролна група) беа со потекло од Македонија.

Селектирањето и регрутирањето на учесници во студијата се изврши проспективно со примена на критериуми за вклучување (инклузии

критериуми) и исклучување од студијата, односно невклучување во студијата (ексклузивни критериуми). Сите учесници непосредно пред самиот почеток на истражувањето потпишаа Информирана согласност за учество во истражувањето откако претходно истото им беше објаснето во целост и им беа одговорени сите прашања во врска со самото истражување. Потпишувањето на Информираната согласност беше своерачно и доброволно.

Критериуми за вклучување (инклузивни критериуми) во студијата се:

1. Потпишана Информирана согласност за учество во студијата,
2. Лица од машки и женски пол на возраст од 18 до 45 годишна возраст,
3. Направена коронарна ангиографија врз основа на претходно поставена медицинска индикација.

Спектарот на клинички ентитети кои подразбираат медицинска индикација за коронарна ангиографија вклучува:

а) стабилна ангина пекторис (АПС),

б) акутен коронарен синдром без СТ-сегмент елевација (НСТЕ-АКС) кој вклучува нестабилна ангина пекторис (АПНС) и миокарден инфаркт без СТ-сегмент елевација (НСТЕМИ) и

в) акутен миокарден инфаркт со СТ-сегмент елевација (СТЕМИ).

Критериуми за исклучување (ексклузивни критериуми) од студијата се:

1. Лица со ДМ тип 1 или ДМ тип 2,
2. Лица со артериска хипертензија,
3. Лица со дислипидемија,
4. Лица со валвуларни болести,
5. Лица со кардиомиопатии,
6. Лица со вродени срцеви мани,
7. Лица со активна малигна болест,
8. Лица со акутни или хронични инфламаторни или инфективни болести/ состојби,
9. Бремени жени,
10. Лица кај кои постои релативна или апсолутна контраиндикација за коронарна ангиографија и/или перкутана коронарна интервенција.

Во студијата можат да бидат вклучени учесници кои се пушачи и/или имаат покачен индекс на телесна маса ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$).

4.3. Клинички испитувања

За секој учесник во клиничката студија беа земени детални податоци за возраста, тежината, висината, индексот на телесна маса (BMI), крвниот притисок и пулсот, како и комплетна анамнеза и сегашен статус според принципите на клиничката пропедевтика. Кај сите учесници беше направена коронарна ангиографија (врз основа на претходно поставена клиничка индикација) со или без перкутана коронарна интервенција и стентирање (ПКИ/стентирање). Оваа процедура се изведе на апаратите за ангиографија во ЈЗУУ Клиника за кардиологија - Скопје.

4.4. Постапка на земање примероци крв

За реализација на молекуларно-генетските испитувања, кај секој учесник во студијата по претходна согласност беше земена вкупно 3 ml венска крв со антикоагулант (динатриумова сол на етилен диамин тетраацетат – Na-EDTA) по пат на венепункција како дополнување на рутинската постапка на земање венска крв за лабораториски анализи. За да се добие примерокот крв за планираните молекуларно-генетски испитувања не се изврши засебна венепункција, туку примерокот крв беше земен во истиот акт на земањето крв за рутински лабораториски испитувања. Од рутинските лабораториски испитувања беа одредени: крвна слика, гликемија, липиден статус, CRP, HbA1c, креатинин и тропонин (hs-Tn I). Земањето на примероците крв кај сите учесници (вклучително и на оние со АКС) се изврши без одложување непосредно по хоспитализацијата, а пред планираната коронарна ангиографија. Рутинските лабораториски анализи на крв беа изработени во ЈЗУ Универзитетски институт за клиничка биохемија – Скопје.

4.5. Молекуларно-генетски анализи

Молекуларно-генетските анализи на учесниците се направени во Лабораторијата за молекуларна биологија и геномика при Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет, УКИМ во Скопје.

Геномската ДНК е изолирана од секој примерок крв со методот на исолување со натриум хлорид, екстракција со хлороформ и последователна преципитација со етанол (Gemmell и Akiyama, 1996).

Кај сите учесници во студијата се определени генотиповите на следните генски полиморфизми: MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1, потоа MMP-9 -1562 C>T, познат и како C-1562T (rs3918242) во промоторниот регион на генот MMP-9, како и полиморфизмот eNOS -786 T>C, познат и како T786C, односно E298D (rs2070744) во промоторниот регион на генот за ендотелната азот-оксид синтетаза eNOS.

Генотиповите на полиморфизмите MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) и eNOS -786 T>C (rs2070744) се определени со полимеразно-верижна амплификација во реално време (RT-PCR) користејќи TaqMan-флуоресцентни сонди со нуклеотидна секвенца која е специфична за амплифициран регион од соодветниот ген, на 5'-крајот обележани со флуоресцентниот обележувач FAM или VIC, додека на 3'-крајот со избледувачот NFQ. Секвенците на олигонуклеотидните прајмери за амплификација и на TaqMan-флуоресцентните сонди за овие два полиморфизми, како и соодветните литературни референци се прикажани во табелата 4.5.1. Амплификабилноста на примероците е проверена со PCR амплификација на регион од генот за β -глобин. Олигонуклеотидните прајмери и на TaqMan-сондите се нарачани од фирмата Thermo-Fisher Scientific.

Генски поли-морфизам	Олигонуклеотидна секвенца	Секвенца на сондата или рестрикциски ензим	Реф.
MMP-1 rs1799750	5'-TGCCACTTAGATGAGGAAATTGTAGT-3' 5'-ACACTTTCCTCCCCTTATGGATTC-3'	1G, 5'-FAM-ATAATTAGAAAGATATGACTTATC-MGB-3' 2G 5'-VIC-ATAATTAGAAAGGATATGACTTAT-MGB-3'	39
eNOS rs2070744	5'-ACCAGGGCATCAAGCTCTTC-3' 5'-GCAGGTCAGCAGAGAGACTAG-3'	5'-VIC-CAGGGTCAGCCGGCCA-MGB-NFQ-3' 5'-FAM-CAGGGTCAGCCAGCCA-MGB-NFQ-3'	40
MMP9 rs3918242	5'-GCCTGGCACATAGTAGGCCC-3' 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'	SphI RFLP	41

Табела 4.5.1. Секвенци на олигонуклеотидните прајмери за амплификација и на TaqMan-флуоресцентните сонди

Амплификацијата и отчитувањето на флуоресценцијата во реално време е извршено со инструментот StepOne RT-PCR System (Applied Biosystems), а отчитаните криви и добиените податоци се обработени со истоимениот софтвер StepOne којшто е интегрален дел од системот. Определувањето на генотиповите на овие два генски полиморфизми е извршено со методот на алелна дискриминација, односно со генотипизација при завршна точка (end point) на амплификацијата.

Генотиповите на полиморфизмот MMP-9 -1562 C>T (rs3918242) се определени со рестрикциска дигестија на амплификатите од генот MMP-9. Накусо, по PCR-амплификацијата е извршена дигестија со рестрикциската ендонуклеаза SphI (New England Biolabs) во сув термален блок на 37°C во текот на 24 часа. Дигестиските фрагменти се раздвоени со хоризонтална електрофореза во 2% агароза. Должината на недигерираниот ампликон беше 662 базни парови (bp). Кај примероците со хомозиготниот генотип CC ампликонот остануваше недигериран и при електрофорезата постоеше само една флуоресцентна лента со должина од 662 bp. Кај хомозиготниот генотип TT ензимската дигестија резултираше со појава на две ленти со должина од 469 и 193 bp, додека кај хетерозиготниот генотип CT имаше три ленти со должина од 662, 469 и 193 bp. Секвенците на олигонуклеотидните прајмери за амплификација и референцата се прикажани во табелата 4.5.1.

Студијата е опсервациска и не ги изложи учесниците на било каков ризик или нуспојави. Притоа не беа променети постоечките постапки и техники за дијагностика, лекување, како и клиничко и лабораториско следење на пациентите во било каква форма, па оттука не постојат било какви етички дилеми.

Примерокот венска крв (како за анализа на крвна слика) е единствен биолошки материјал кој беше колектиран од учесниците.

Учесниците беа регрутирани на ЈЗУУ Клиника за кардиологија во Скопје по претходно обезбедена и потпишана согласност од секој пациент. За ова истражување претходно беше добиено одобрение од Етичката комисија при Медицинскиот факултет во Скопје.

4.6. Дефиниции

Коронарната ангиографија се дефинира како радиографска визуелизација на коронарните артерии преку инјектирање на радионепропустлив контрастен медиум со користење специјализирани радиографски апарати (ангиографи) и специјализирани интраваскуларни катетри. Целта на ова инвазивно испитување е дефинирање на коронарната анатомија и детерминирање на присуство и екстензивност на КАБ со цел проценка на можноста и соодветноста на различни видови реваскуларизациони процедури (перкутани или хируршки) [42].

Сигнификантна КАБ односно *позитивен ангиографски наод* на коронарните артерии подразбира постоење на лезија на епикардните коронарните артерии која доведува до $\geq 70\%$ (односно $\geq 50\%$ доколку се однесува на главното стебло - left main – LM) луминална стеноза преку визуелна проценка во „најлошата“ ангиографска проекција [43].

Негативен ангиографски наод подразбира уреден ангиографски наод на коронарните артерии или ангиографски наод без сигнификантни лезии што значи можно постоење на атеросклеротични плаки на коронарните артерии кои не прават значајна опструкција на коронарниот проток.

Тивка исхемија (ТИ) се дефинира типично со постоење на објективен доказ за миокардна исхемија кај пациенти без симптоми кои се асоцирани со таа исхемија. Тивката исхемија може да се детектира кај пациенти кои немаат симптоми за време на коронарен стрес тест или фармаколошки стрес тест кои имаат транзиторни СТ-сегмент промени, перфузиони дефекти или реверзибилни абнормалности на регионалната сидна кинетика. Дополнително, тивка исхемија може да се детектира и со амбулантско ЕКГ мониторирање односно Холтер ЕКГ и тоа како СТ-сегмент депресија од најмалку 0,5 mV којашто е со времетраење од најмалку 60 s и потоа се повлекува [44].

Типичната стабилна ангина пекторис (АПС) според традиционалната клиничка класификација подразбира дискомфорт во предниот дел на градниот кош или во вратот, вилицата, рамото или раката кој е предизвикан од физички напор и кој се смирува со одмор или со нитрати во период од 5 минути [45].

Акутен коронарен синдром без СТ-сегмент елевација (НСТЕ-АКС) подразбира акутен граден дискомфорт што се опишува како градна болка,

притисок, стегане, печење или жарење или нивни еквиваленти (диспнеа, епигастрична болка или болка во левото рамо) без перзистентна СТ-сегмент елевација што вклучува ЕКГ промени од типот на: краткотрајна и транзитрна СТ-сегмент елевација, перзистентна или транзитрна СТ-сегмент депресија, инверзија на Т-бран, зарамнет (аплатиран) Т-бран, псевдонормализација на Т-бран или нормален ЕКГ наод. НСТЕ-АКС ги опфаќа АПНС и НСТЕМИ [46].

Нестабилна ангина пекторис (АПНС) се дефинира како акутен граден дискомфорт или еквивалент заради миокардна исхемија во мирување или при минимален физички напор во отсуство на акутна кардиомиоцитна повреда или некроза (отсуство на покачени вредности на високосензитивен кардиоспецифичен тропонин - hs-Tn T или hs-Tn I) која може, но не мора да биде проследена со претходно наведените ЕКГ-промени [46].

Миокарден инфаркт без СТ-сегмент елевација (НСТЕМИ) се дефинира како акутен граден дискомфорт или еквивалент заради миокардна исхемија во мирување која вообичаено (но не секогаш) е проследена со горенаведените ЕКГ промени, но која за разлика од АПНС секогаш е придружена со кардиомиоцитна повреда или некроза (покачени вредности на hs-Tn T или hs-Tn I) [46].

Миокарден инфаркт со СТ-сегмент елевација (СТЕМИ) се дефинира како акутен граден дискомфорт или еквивалент со перзистентна СТ-сегмент елевација (со времетраење >20 min) која е проследена со различен степен на кардиомиоцитна повреда или некроза (покачени вредности на hs-Tn T или hs-Tn I) [46].

За лица со ДМ тип 1 или ДМ тип 2 се сметаат лица со претходно дијагностициран дијабет кои се на редовна антидијабетична терапија, како и сите лица со новодијагностициран дијабет кои задоволуваат барем еден од следниве критериуми: гликемија на гладно ≥ 7 mmol/L (на гладно се смета доколку не постои калориски внес во последните 8 часа) или гликемија после 2 часа кај oGTT $\geq 11,1$ mmol/L или HbA1c $\geq 6,5\%$ или инцидентална гликемија $\geq 11,1$ mmol/L кај пациент со класични симптоми на хипергликемија или хипергликемична состојба [47].

Лица со артериска хипертензија се сметаат сите оние лица односно пациенти кои веќе редовно примаат антихипертензивна терапија (лекови од било која класа на антихипертензиви – АКЕ-инхибитори, АРБ, Са-антагонисти, диуретици, бета-блокатори, антихипертензиви со централно дејство и останати

– и тоа во полна антихипертензивна доза на лекот), односно оние кај кои ќе се детектира вредност на крвниот притисок ≥ 140 mm Hg за систола и/или ≥ 90 mm Hg за дијастола во амбулантски услови или просечни вредности на крвниот притисок ≥ 130 mm Hg за систола и/или ≥ 80 mm Hg за дијастола на 24h Holter ABR [48].

Како лица со дислипидемија согласно актуелните водичи за дијагноза и третман на дислипидемија се сметаат лицата со хиперхолестеролемија, односно лицата чии вредности на вкупниот холестерол се над пресечната вредност од 5,0 mmol/l и/или над пресечната вредност на LDL-холестерол од 3,0 mmol/l, имајќи предвид дека се работи за лица со низок кардиоваскуларен ризик (SCORE 0-2) [49, 50]. За потребите на нашето истражување, рутинските лабораториски испитувања на крвта (крвна слика и биохемиски анализи на крв) се одредувани во ЈЗУ Универзитетски институт за клиничка биохемија како референтна лабораторија и во таа смисла се земени предвид актуелните референтни вредности на лабораториските параметри на истоимената лабораторија.

5. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА

Статистичките анализи се вршени со споредба на фреквенциите на генотиповите и алелите на секој од генските полиморфизми кај испитуваната и кај контролната група учесници. Применувани се и дескриптивни статистички методи за приказ на податоците од учесниците во испитуваната и контролната група. Нормалната дистрибуција на нумеричките вредности е определена со Shapiro-Wilk-тестот. Параметриските вредности со нормална дистрибуција се анализирани со двонасочниот Студентов t-тест, додека при отстапувања од нормалната дистрибуција на вредностите на соодветниот параметар е користен непараметрскиот Mann-Whitney U-тест. Континуираните лабораториски вредности се споредени меѓу испитуваната и контролната група со анализа на варијансата (ANOVA). Со оглед на тоа што е утврдено дека нема статистички значајни разлики во однос на полот и возраста меѓу двете групи, не е вршено прилагодување во однос на овие параметри кај ANOVA-тестот.

Генетската асоцијација на фреквенциите на генотиповите и алелите на испитуваните генски параметри со сигнификантната коронарна артериска

болест кај пациенти помлади од 45 години е евалуирана со користење на генотипскиот, доминантниот, рецесивниот, хетерозиготниот и супердоминантниот модел, додека споредбата на алелните фреквенции е спроведена со алелниот и адитивниот модел. За таа цел се користени непараметрискиот Pearson-ов Chi-квадрат тест и Fisher-овиот егзактен тест, како и Cochran-Armitage тренд-тестот. За статистички значајна вредност е земена вредноста на $p < 0,05$.

Од поврзаноста на сигнификантната КАБ со испитуваните генски полиморфизми пресметан е и веројатносниот индекс т.е. односот на шанси (odds ratio, OR) во интервалот на доверливост CI (confidence interval) од 95%. Дизајнот на оваа студија (случаи и контроли) не дозволува пресметување на односот на ризик (risk ratio или RR).

Понатаму, генотипските фреквенции на испитуваните генски полиморфизми се испитувани поединечно за поврзаност со коронарната артериска болест со користење на мултиваријантната логистичка регресиона анализа. Подобноста на податоците за спроведување на логистичка регресија е првично проценета со Hosmer-Lemeshow-тестот. Со логистичката анализа се конструирани и модели за предикција на секој од полиморфизмите на појавата на коронарната артериска болест. Успешноста на користениот модел според логистичката регресија во предикцијата на КАБ е проценуван според ROC-кривата (од англ. receiver operating characteristic, ROC Curve). Квантитативната мерка на успешноста на моделот за предикција на бинарните класи според генотипските или алелните фреквенции, односно нивните комбинации е вредноста на површината под ROC-кривата (AUC, од англ. area under curve).

Вредноста на AUC од 0,7 до 0,9 значи дека моделот е добар, а во биомедицинските науки, генерално, се прифатливи вредностите на AUC повисоки од 0,750.

Добиените податоци од генотипизацијата на предвидените генски параметри кај ДНК примероците од секој пациент се користени и за популациско-генетски анализи. За проценка на Харди-Вајнберговата рамнотежа, определени се испитуваните наспроти очекуваните фреквенции на алелите и генотиповите.

Статистичките пресметки се вршени со користење на софтверите XLSTAT 2016 и Statistica v. 13.5, додека за популациско-генетските анализи е користен софтверскиот додаток GenAlEx 6.51b2.

6. РЕЗУЛТАТИ

Во ова истражување е направена анализа на податоците и примероците од вкупно 80 пациенти поделени во две групи: 1. испитувана група (група со позитивен ангиографски наод) која е составена од 40 лица на возраст до 45 години со ангиографски докажана сигнификантна КАБ; и 2. контролна група (група со негативен ангиографски наод), исто така составена од 40 лица на возраст до 45 години, но со уреден ангиографски наод или со ангиографски наод без сигнификантни коронарни лезии. Селектирањето, регрутирањето и вклучувањето на испитаниците во двете групи е извршено согласно претходно дефинираните критериуми за вклучување (инклузиони критериуми) и исклучување (ексклузиони критериуми) во/од студијата.

Од вкупните социодемографски и клинички податоци се анализирани полот, возраста, местото на живеење, историјата на пушење, телесната висина, телесната тежина, индексот на телесна маса (BMI), понатаму, релевантните анамнестички податоци (фамилијарна анамнеза за КАБ, претходен ЦВИ, претходен МИ, претходна перкутана коронарна интервенција со или без стентирање), артерискиот крвен притисок и пулсот, ехокардиографски детерминираната левовентрикуларна истисна фракција (LVEF), клиничката индикација за коронарографија (АПС и АКС, односно НСТЕМИ, СТЕМИ), како и ангиографските податоци (садовност на КАБ, инфарктна (“culprit”) артерија и општиот ангиографскиот наод). Покрај дескриптивната статистичка обработка на овие податоци, исто така е направена и анализа на разликата во вредностите на секој параметар помеѓу испитуваната и контролната група, освен кај оние параметри кои не се применливи кај контролните пациенти без сигнификантна КАБ.

Од геномската ДНК изолирана од примероците на венска крв од сите пациенти се определени генотиповите на полиморфизмите: полиморфизмот -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1, полиморфизмот -1562 C>T (rs

3918242) во промоторниот регион на генот MMP-9, како и полиморфизмот -786 T>C (rs2070744) во промоторниот регион на генот за ендотелната азотен оксид синтетаза (eNOS). Со споредба на генотипските и алелните фреквенции на наведените генски полиморфизми помеѓу испитуваната и контролната група лица е испитувано постоењето на генетска асоцираност со КАБ.

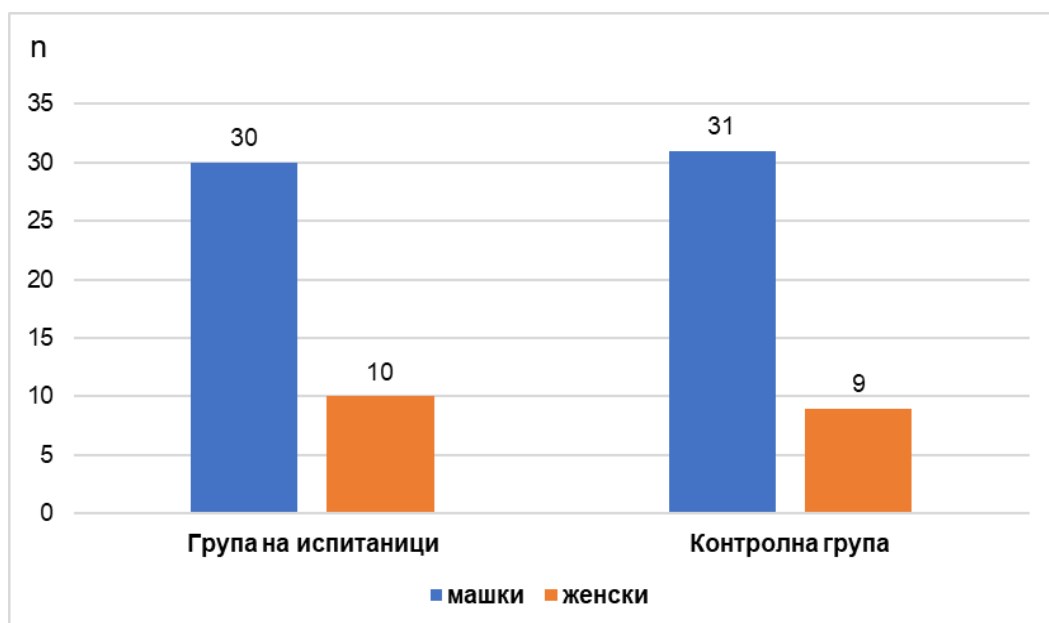
6.1. Селектирани социодемографски и клинички податоци

6.1.1. Полова структура

Дистрибуцијата по пол кај испитуваната и контролната група е прикажана во табелата 6.1. и графиконот 6.1.

Табела 6.1. Полова структура

Пол	Група на испитаници		Контролна група		Хи-квадрат тест
	n	%	n	%	P
машки	30	75,00	31	77,50	0,793
женски	10	25,00	9	22,50	
вкупно	40	100,00	40	100,00	



Графикон 6.1. Графички приказ на дистрибуцијата по пол

Испитуваната група е составена од вкупно 40 учесници од кои 30 (75,00%) беа машки, а 10 (25,00%) женски лица. Од прикажаните резултати е евидентно дека постои 3 пати повисока застапеност на машкиот пол.

Кај контролната група учесници има скоро идентична дистрибуција по пол како и кај испитуваната група и тоа 31 машки (77,50%) и 9 женски (22,50%) индивидуи што укажува на добро урамнотежена дистрибуција на обата пола која е важна за понатамошните споредби. Истото е потврдено со статистичката анализа спроведена со Хи-квадрат тестот кој покажа отсуство на статистички сигнификантни разлики во дистрибуцијата по пол помеѓу двете групи пациенти ($p>0,05$).

6.1.2. Возрасна структура

Позначајните статистички параметри во однос на возрасната структура на испитуваната и контролната група лица е прикажана во табелата 6.2., графички прикажаната споредба е прикажана на графиконот 6.2., додека, пак, хистограмите на дистрибуциите на возраста кај обете групи се прикажани во графиконите 6.3. и 6.4.

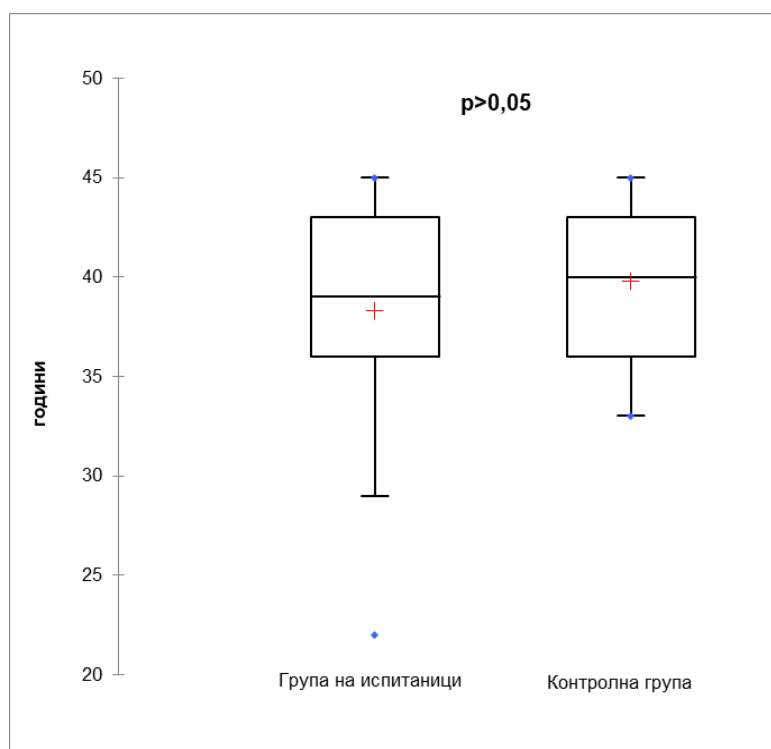
Табела 6.2. Возрасна структура

Параметар (години)	Група на испитаници	Контролна група	Mann-Whitney-тест *
N	40	40	0,386
Просек	38,30	39,78	
SD	5,57	4,02	
мин. возраст	22	33	
макс. возраст	45	45	

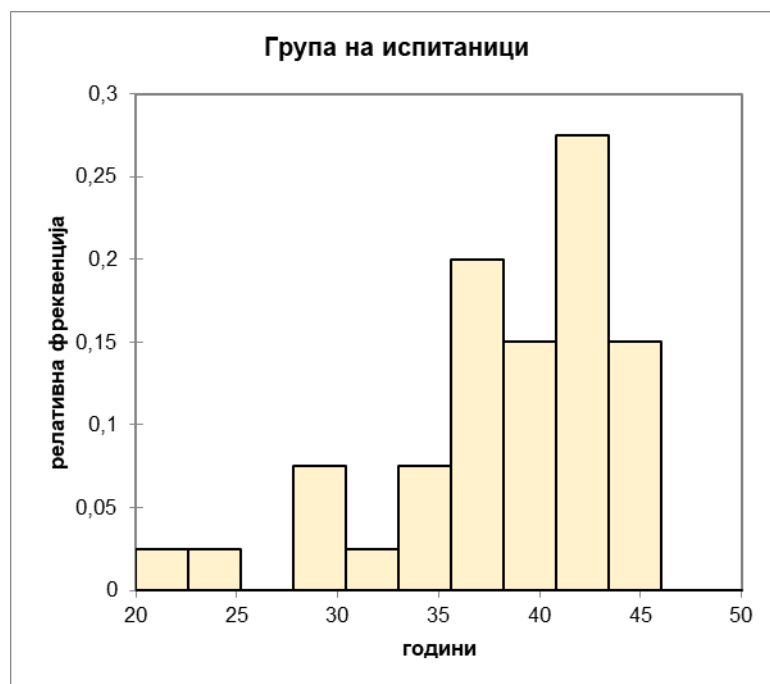
* двонасочен

Просечната возраст на испитуваната група лица со сигнификантна КАБ во оваа студија изнесуваше 38,30 години (стандардна девијација $\pm 5,57$), додека просекот на контролната група изнесуваше 39,78 години ($\pm 4,02$). Минималната и максималната возраст на пациентите изнесува 22 и 45 кај испитуваната група, односно 33 и 45 кај контролната група, соодветно. Од прикажаните хистограми може да се забележи дека постојат разлики во возрасната дистрибуција помеѓу обете групи.

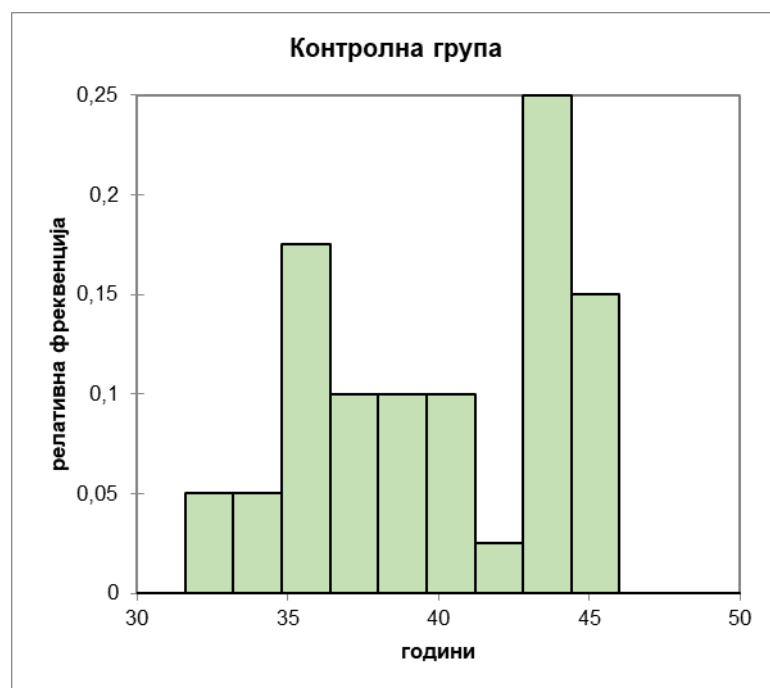
Според двонасочниот Mann-Whitney-тест, овие разлики се статистички несигнификантни ($p > 0,05$). Тоа е особено важно за понатамошните споредби помеѓу овие две групи.



Графикон 6.2. Споредба на возрасната дистрибуција кај испитуваната и контролната група пациенти



Графикон 6.3. Хистограм за приказ на возрасната структура на испитуваната група



Графикон 6.4. Хистограм за приказ на возрасната структура на контролната група

6.1.3. Место на живеење

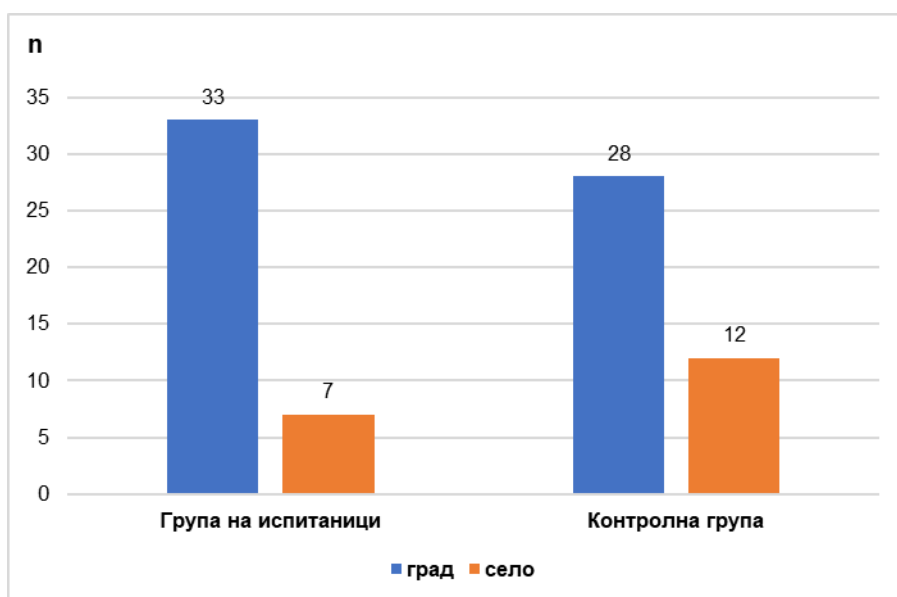
Споредбата на местото на живеење на пациентите од испитуваната и контролната група се прикажани во табелата 6.3. и графиконот 6.5.

Табела 6.3. Место на живеење на пациентите

Место на живеење	Група на испитаници		Контролна група		Хи-квадрат тест
	N	%	n	%	P
град	33	82,50	28	70,00	0,189
село	7	17,50	12	30,00	
вкупно	40	100,00	40	100,00	

Како што може да се види од прикажаните податоци, во испитуваната група доминираат лица кои живеат во урбана средина (82,50%) наспроти на село (17,50%). Овие проценти се разликуваат кај контролната група, но и понатаму доминираат лица кои живеат во град (70,00%), наспроти село (30,00%).

Овие разлики не се статистички сигнификантни според анализата со Хи-квадрат тестот ($p > 0,05$).



Графикон 6.5. Место на живеење на пациентите

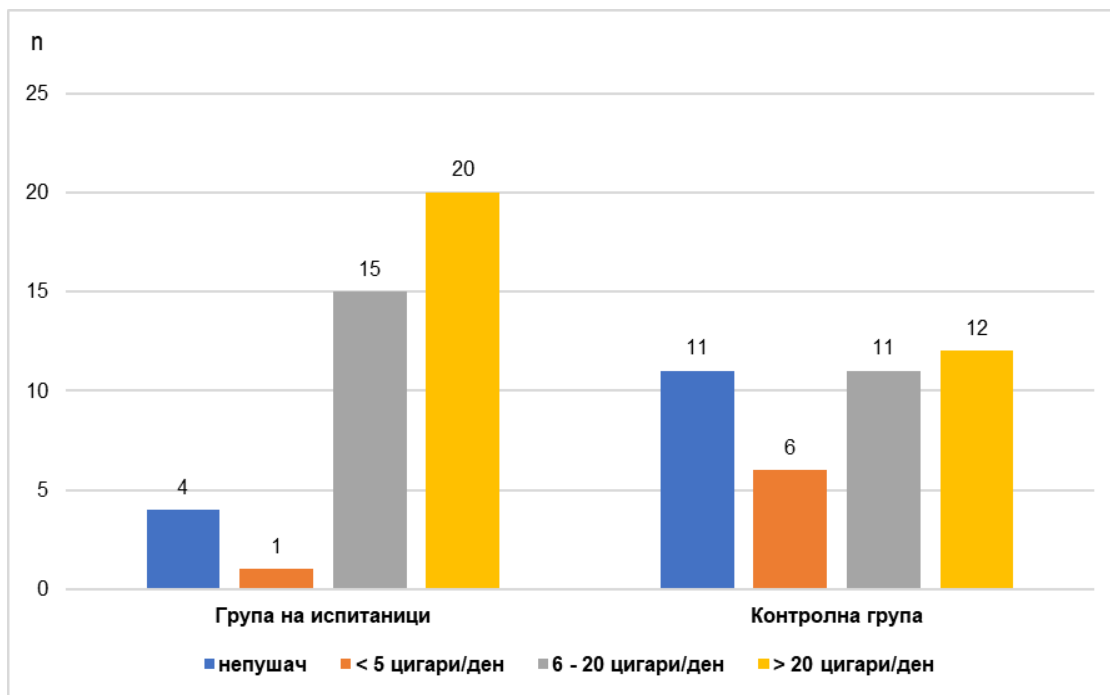
6.1.4. Историја на пушење

Компарацијата на податоците за навиките на пушење цигари кај пациентите од испитуваната и контролната група се прикажани во табелата 6.4. и графиконот 6.6.

Табела 6.4. Историја на пушење

Историја на пушење	Група на испитаници		Контролна група		Fisher-ов егзактен тест *
	n	%	n	%	P
Непушач	4	10,00	11	27,50	0,025
< 5 цигари/ден	1	2,50	6	15,00	
6 - 20 цигари/ден	15	37,50	11	27,50	
> 20 цигари/ден	20	50,00	12	30,00	
Вкупно	40	100,00	40	100,00	

* двонасочен



Графикон 6.6. Историја на пушење

Според податоците добиени од пациентите, консумацијата на тутун со пушење цигари е категоризирана во 4 подгрупи (непушачи, консументи на најмногу до 5 цигари/ден, на 6 до 20 цигари/ден и на повеќе од 20 цигари/ден). Од приложените податоци може да се забележи дека непушачите доминираат кај контролната група пациенти (27,50%), наспроти лицата од испитуваната група (10,00%). Пациентите кои се интензивни консументи на тутун со повеќе од 20 испушени цигари на ден се многу почесто застапени кај испитуваната група (50,00%) отколку кај контролната група (30,00%).

Споредбата на фреквенциите на наведените 4 подгрупи категории во однос на пушењето цигари помеѓу двете групи пациенти покажа дека овие разлики се статистички сигнификантни според пресметките со Fisher-овиот егзактен тест ($p < 0,05$).

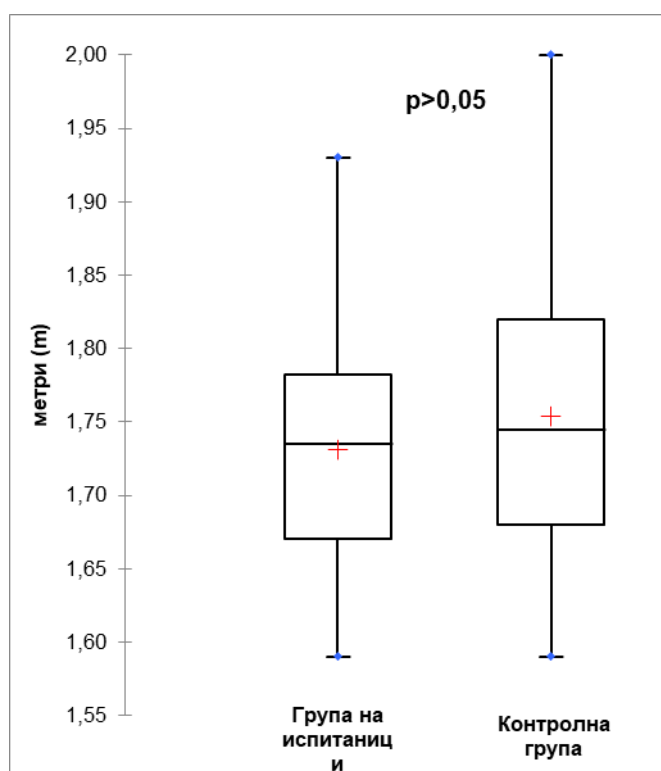
6.1.5. Телесна висина, телесна тежина и индекс на телесна маса (BMI)

Споредбата на телесната висина, телесната тежина, како и индексот на телесна маса (BMI) помеѓу испитуваната и контролната група пациенти се прикажани во табелите од 6.5. до 6.7. и графиконите од 6.7. до 6.9.

Табела 6.5. Телесна висина

Параметар (m)	Група на испитаници	Контролна група	Студентов t-тест *
N	40	40	0,240
просек	1,73	1,75	
SD	0,08	0,10	
мин. висина	1,59	1,59	
макс. висина	1,93	2,00	

* двонасочен



Графикон 6.7. Телесна висина

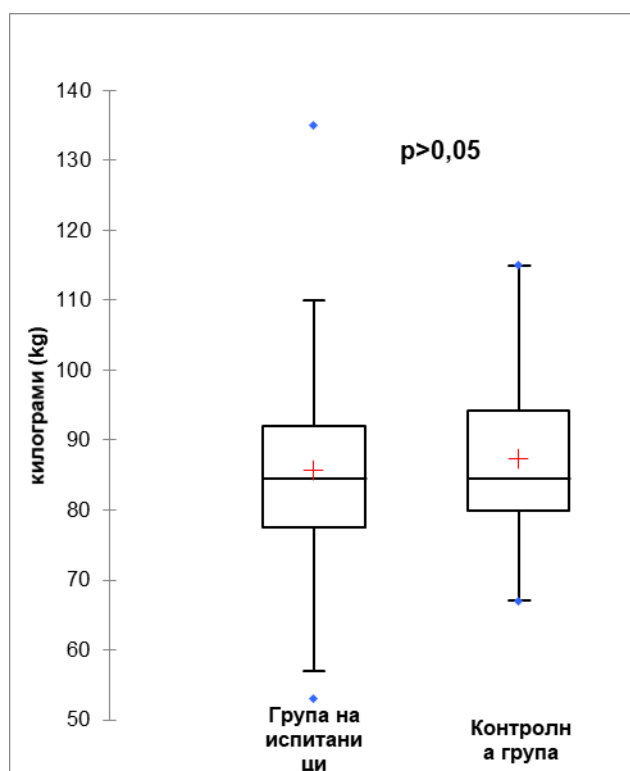
Како што може да се види од прикажаните податоци, просечните, минималните и максималните вредности на телесната висина се мошне слични кај испитуваната и контролната група пациенти.

Анализата со параметрискиот Студентов t-тест покажа дека разликите помеѓу двете групи се несигнификантни ($p > 0,05$).

Табела 6.6. Телесна тежина

Параметар (kg)	Група на испитаници	Контролна група	Mann-Whitney-тест *
N	40	40	0,516
Просек	85,60	87,30	
SD	15,42	11,30	
мин. тежина	53	67	
макс. тежина	135	115	

* двонасочен



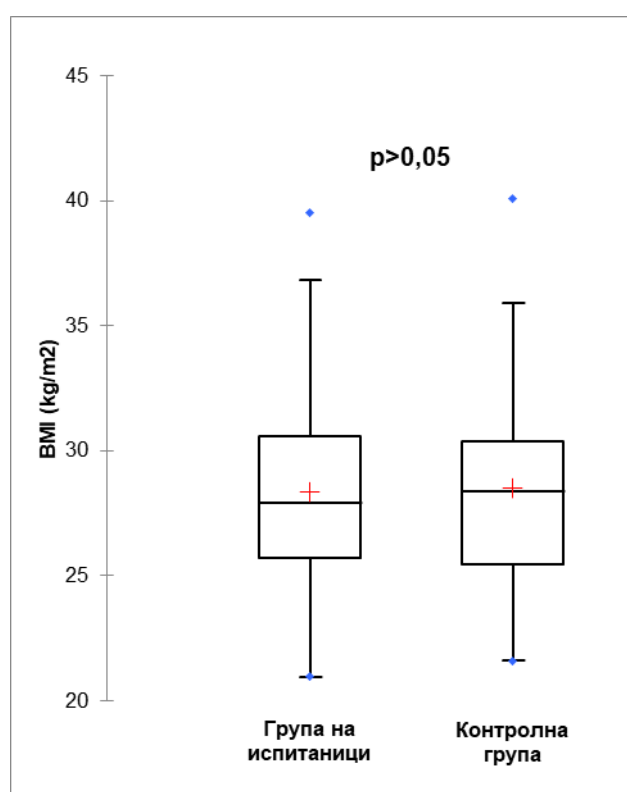
Графикон 6.8. Телесна тежина

Споредбата на телесната тежина помеѓу испитуваната и контролната група пациенти покажа несигнификантно повисоки просечни вредности ($87,30 \pm 11,30$ kg) кај контролната група наспроти $85,60 \pm 15,42$ kg кај испитуваната група. Минималните и максималните вредности се поекстремни кај испитуваната група (53 и 135 kg) отколку кај контролната група пациенти (67 и 115 kg), соодветно.

Со статистичка анализа користејќи го Студентовиот t-тест се утврди дека разликите помеѓу двете групи не се сигнификантни ($p > 0,05$).

Табела 6.7. Индекс на телесна маса (BMI)

Параметар (kg/m ²)	Група на испитаници	Контролна група	Студентов t-тест *
n	40	40	0,860
просек	28,33	28,49	
SD	4,01	4,06	
мин. вредност	20,96	21,61	
макс. вредност	39,50	40,10	



Графикон 6.9. Индекс на телесна маса (BMI)

Од прикажаните податоци е јасно дека просечните, минималните и максималните вредности на индексот на телесната маса (BMI) се речиси идентични во популациите на испитуваната и контролната група пациенти.

Анализата со Студентовиот t-тест покажа дека нема статистички сигификантна разлика во дистрибуцијата на вредностите на индексот на телесна маса (BMI) помеѓу двете групи пациенти ($p > 0,05$).

6.1.6. Анамнестички податоци

Анамнестичките податоци за фамилијарната анамнеза за КАБ, претходен ЦВИ, претходен МИ, претходна перкутана коронарна интервенција со или без стентирање добиени од двете групи на пациенти се прикажани во табелата 6.8. и на графиконот 6.10.

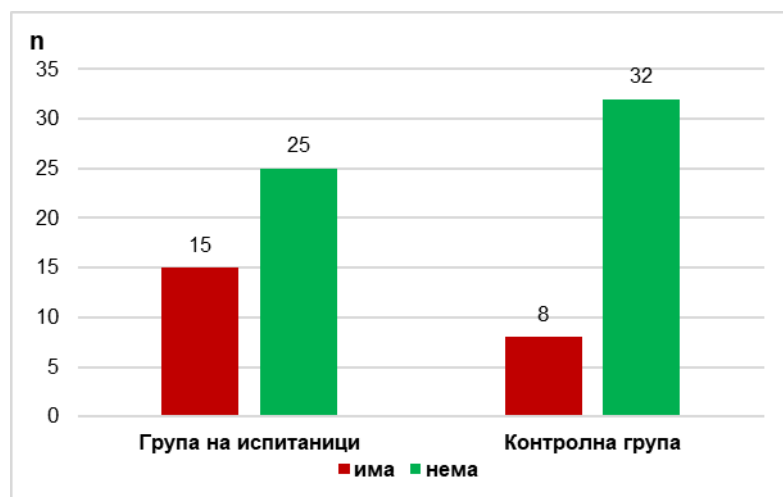
Табела 6.8. Анамнестички податоци

Коронарографски податоци	Група на испитаници		Контролна група		Fisher-ов егзактен тест *
	n	%	n	%	P
Фамилијарна анамнеза за КАБ					
има	15	37,50	8	20,00	0,137
нема	25	62,50	32	80,00	
вкупно	40	100,00	40	100,00	/
Претходен ЦВИ					
има	2	5,00	0	0,00	н.п.
нема	38	95,00	40	100,00	
вкупно	40	100,00	40	100,00	/
Претходен МИ					
има	0	0,00	0	0,00	н.п.
нема	40	100,00	40	100,00	
вкупно	40	100,00	40	100,00	/
Претходна ПКИ/стент					
има	0	0,00	0	0,00	н.п.
нема	40	100,00	40	100,00	
вкупно	40	100,00	40	100,00	/

* двонасочен

н.п. = непресметливо

Според добиените податоци, фамилијарната анамнеза за КАБ е застапена кај 37,50% од пациентите од испитуваната група, наспроти 20,00% од контролната група. Сепак, оваа разлика е статистички несигнификантна според Fisher-овиот егзактен тест ($p>0,05$).



Графикон 6.10. Фамилијарна анамнеза за КАБ

Останатите релевантни анамнестички податоци се застапени само кај пациентите од испитуваната група, па оттаму не се пресметливи споредбите со контролната група.

Од овие анамнестички податоци само 2 пациенти (5,00%) од испитуваната група пријавиле претходен цереброваскуларен инцидент. Ниту еден пациент немал историја на претходен миокарден инфаркт, ниту претходна перкутана коронарна интервенција со или без стентирање.

6.1.7. Основни клинички кардиолошки податоци

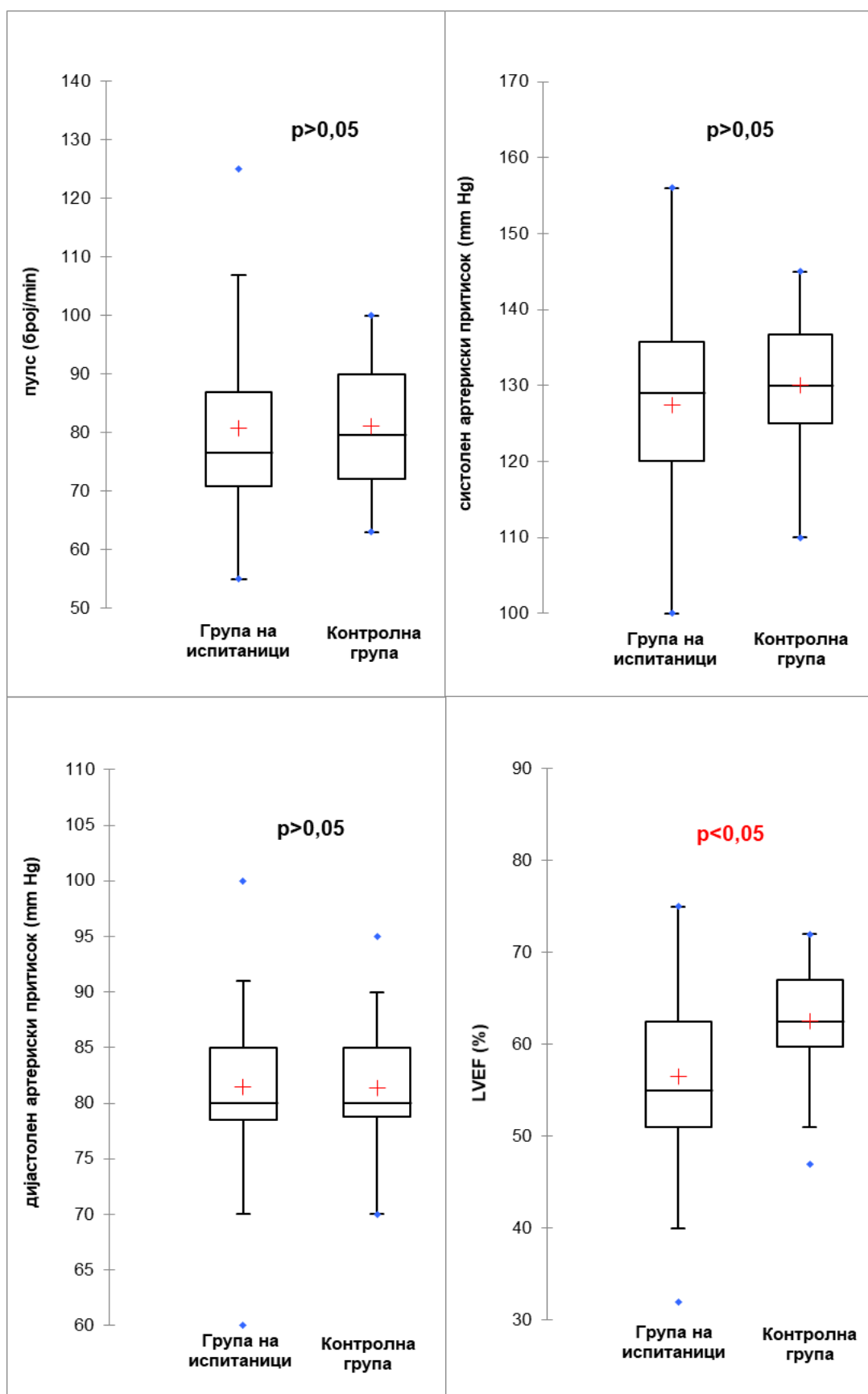
Податоците за вредностите на пулсот, систолниот и дијастолниот артериски крвен притисок, како и ехокардиографски определената левовентрикуларна истисна фракција (LVEF) кај пациентите од испитуваната и од контролната група се прикажани во табелата 6.9. и на графиконот 6.11.

Табела 6.9. Основни клинички кардиолошки податоци

Параметар	Група на испитаници	Контролна група	Mann-Whitney-тест *
N	40	40	/
пулс (број/min)	80,83 ± 17,59 (55-125)	81,07 ± 10,93 (63-100)	0,438
систолен крвен притисок (mm Hg)	127,45 ± 13,85 (100-156)	130,08 ± 9,23 (110-145)	0,322
дијастолен крвен притисок (mm Hg)	81,45 ± 10,86 (60-100)	81,40 ± 5,12 (70-95)	0,957
LVEF (%)	56,50 ± 9,16 (32-75)	62,48 ± 5,69 (47-72)	0,001

податоците се изразени како: просечна вредност ± SD (мин - макс)

* двонасочен



Графикон 6.11. Основни клинички кардиолошки податоци

Од погоре прикажаните податоци може да се забележи дека просечните, минималните и максималните вредности на пулсот, систолниот и дијастолниот артериски крвен притисок се многу слични при споредба кај испитуваната и контролната група пациенти.

Mann-Whitney-тестот покажа дека кај скоро сите параметри нема статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на вредностите на наведените параметри помеѓу двете групи пациенти ($p>0,05$).

Исклучок претставува просечната вредност на левовентрикуларната истисна фракција (LVEF) определена со ехокардиографија која е пониска кај испитуваната група (56,50%) отколку кај контролната група (62,48%), а оваа разлика е статистички сигнификантна при пресметките со истиот тест ($p<0,05$). Намалените вредности на LVEF се очекувана последица кај пациентите со сигнификантна КАБ.

6.1.8. Селектирани ангиографски податоци

Податоците за клиничката индикација за коронарна ангиографија (АПС и АКС, односно НСТЕМИ, СТЕМИ), како и ангиографските податоци (садовност на КАБ, инфарктна артерија и генералниот коронарен ангиографски наод) кај пациентите од двете групи се прикажани во табелата 6.10. и на графиконот 6.12.

Согласно критериумите за вклучување и исклучување на пациенти во студијата, коронарографските параметри се исклучиви кај испитуваната и кај контролната група. Оттаму, не се можни статистички споредби за овие податоци, туку е презентирана нивна дескриптивна обработка.

Клиничките индикации за коронарна ангиографија се различни кај двете групи. Кај контролната група индикацијата била исклучително стабилна ангина пекторис кај сите пациенти ($n=40$).

Наспроти тоа, индикациите кај пациентите од испитуваната група биле: нестабилна ангина пекторис (кај 5,00%), НСТЕМИ (17,50%), а најзастапен бил СТЕМИ (77,50%).

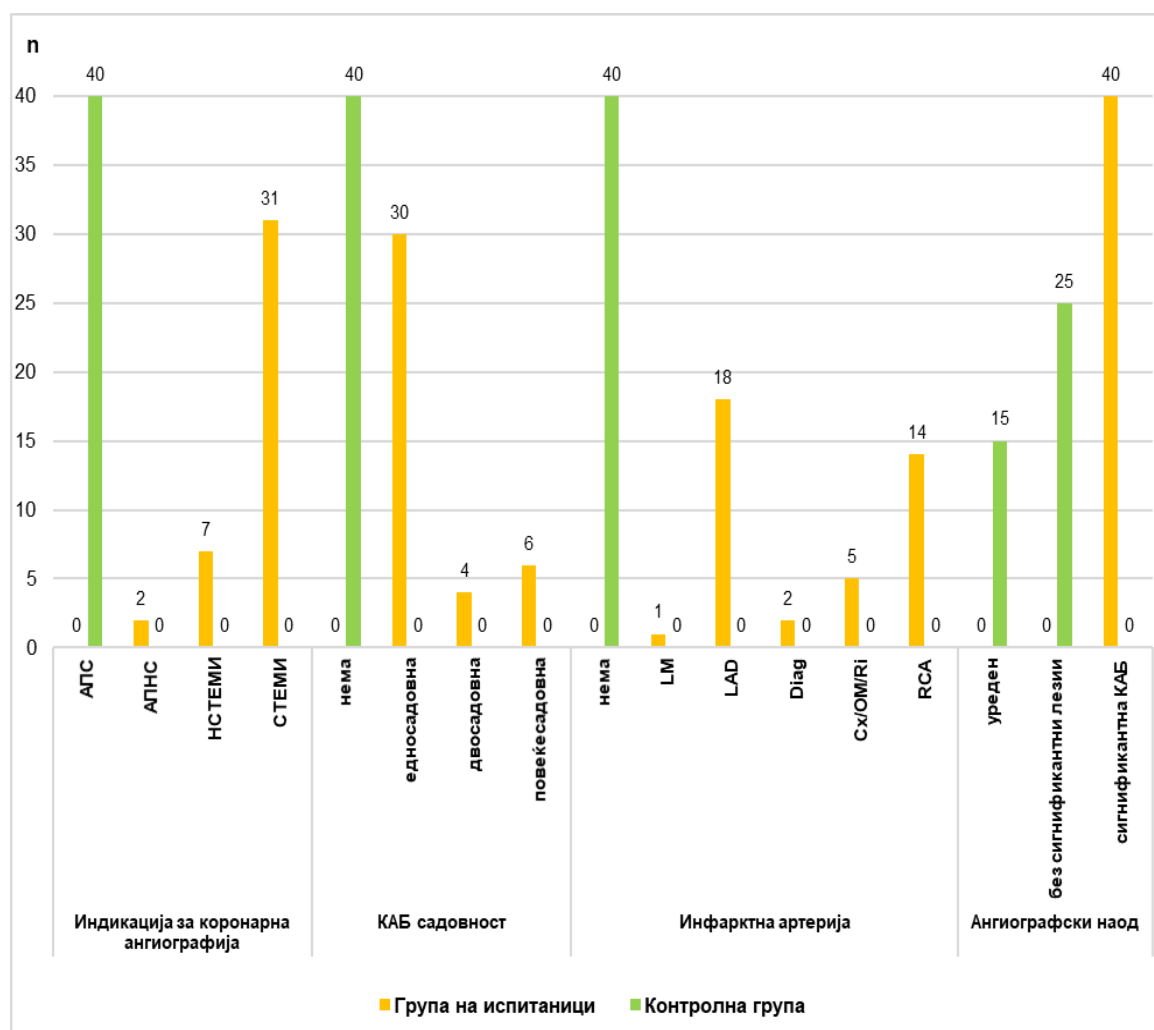
Табела 6.10. Коронарографски податоци

Коронарографски податоци	Група на испитаници		Контролна група	
	n	%	n	%
Индикација за коронарна ангиографија				
АПС	0	0,00	40	100,00
АПНС	2	5,00	0	0,00
НСТЕМИ	7	17,50	0	0,00
СТЕМИ	31	77,50	0	0,00
Вкупно	40	100,00	40	100,00
КАБ садовност				
Нема	0	0,00	40	100,00
Едносадовна	30	75,00	0	0,00
Двосадовна	4	10,00	0	0,00
Повеќесадовна	6	15,00	0	0,00
Вкупно	40	100,00	40	100,00
Инфарктна артерија				
Нема	0	0,00	40	100,00
LM	1	2,50	0	0,00
LAD	18	45,00	0	0,00
Diag	2	5,00	0	0,00
Cx/OM/Ri	5	12,50	0	0,00
RCA	14	35,00	0	0,00
Вкупно	40	100,00	40	100,00
Ангиографски наод				
Уреден	0	0,00	15	37,50
Без сигнификантни лезии	0	0,00	25	62,50
Сигнификантна КАБ	40	100,00	0	0,00
Вкупно	40	100,00	40	100,00

Коронарографскиот наод бил уреден кај 37,50% или без сигнификантни лезии кај 62,50% од пациентите од контролната група. Од тие причини нема прикажани податоци за бројот и називот на афектираните коронарни артерии кај овие пациенти.

Повторно поради поставените критериуми за регрутирање во студијата, кај пациентите од испитуваната група нема уредни коронарографски наоди,

ниту наоди без сигнификантни лезии. Сите пациенти од оваа група (n=40) имаат сигнификантна КАБ.



Графикон 6.12. Коронарографски податоци

Во однос на бројот на афектирани крвни садови, коронарографски е верифицирана едносадовна КАБ кај 75,00%, повеќесадовна КАБ кај 15,00% и двосадовна КАБ кај 10,00% од пациентите на испитуваната група.

Во однос на инфарктната артерија, левата предна десцендентна артерија (LAD) е застапена кај 45,00%, десната коронарна артерија (RCA) кај 35,00%, потоа Cx/OM/Ri (односно циркумфлексна артерија-Cx, оптузната маргинална гранка-OM и интермедиерната гранка-Ramus-Ri) кај 12,50%, дијагоналната гранка (Diag) кај 5,00% и левото главно стебло (LM) кај 2,50% од пациентите на испитуваната група.

6.1.9. Селектирани лабораториски параметри

Селектираните лабораториски податоци од пациентите од испитуваната и контролната група се прикажани во табелата 6.11. и на графиконите од 6.13. до 6.15.

Табела 6.11. Лабораториски податоци

	Група на испитаници	Контролна група	ANOVA *
N	40	40	<i>P</i>
Hct (%)	42,5 ± 4,4 (29,1 - 49,7)	44,0 ± 3,7 (35,5 - 49,6)	0,103
Hgb (g/l)	145,9 ± 16,3 (97,0 - 174,0)	142,8 ± 12,6 (121,0 - 173,0)	0,344
Plt (x10⁹)	288,5 ± 91,6 (138,0 - 625,0)	318,2 ± 87,1 (192,0 - 516,0)	0,142
eGFR (ml/min)	145,7 ± 41,4 (83,0 - 281,0)	136,7 ± 28,1 (79,0 - 183,0)	0,258
tot chol (mmol/l)	5,1 ± 0,9 (2,9 - 6,8)	4,9 ± 0,8 (2,7 - 6,5)	0,405
HDL-c (mmol/l)	1,2 ± 0,3 (0,5 - 2,1)	1,3 ± 0,4 (0,5 - 2,0)	0,018
non-HDL-c (mmol/l)	4,0 ± 0,9 (2,0 - 5,7)	3,6 ± 0,8 (1,9 - 5,3)	0,062
LDL-c (mmol/l)	3,1 ± 0,9 (0,9 - 5,3)	2,8 ± 0,9 (1,5 - 4,7)	0,101
TG (mmol/l)	1,6 ± 1,0 (0,4 - 4,7)	1,8 ± 1,0 (0,5 - 4,8)	0,265
hs-Troponin I (ng/ml)	4631,0 ± 9636,4 (0,0 - 50000,0)	2,8 ± 6,3 (0,0 - 37,9)	0,003
CRP (mg/L)	9,8 ± 20,5 (0,0 - 111,7)	5,0 ± 5,3 (0,7 - 24,0)	0,159
HbA1c (%)	5,6 ± 0,4 (4,8 - 7,0)	5,6 ± 0,3 (5,1 - 6,2)	0,522

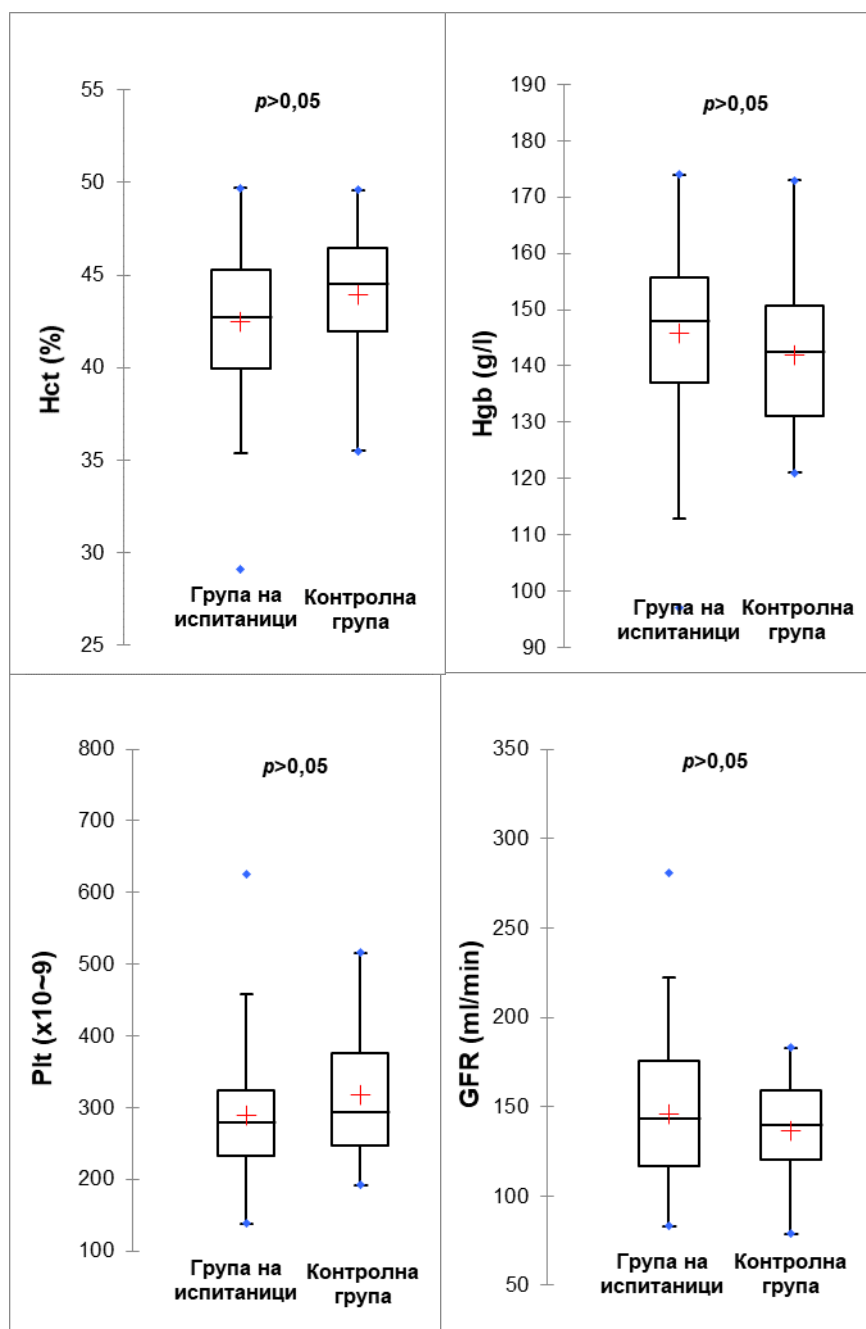
податоците се изразени како: просечна вредност ± SD (мин - макс)

* анализа на варијансата

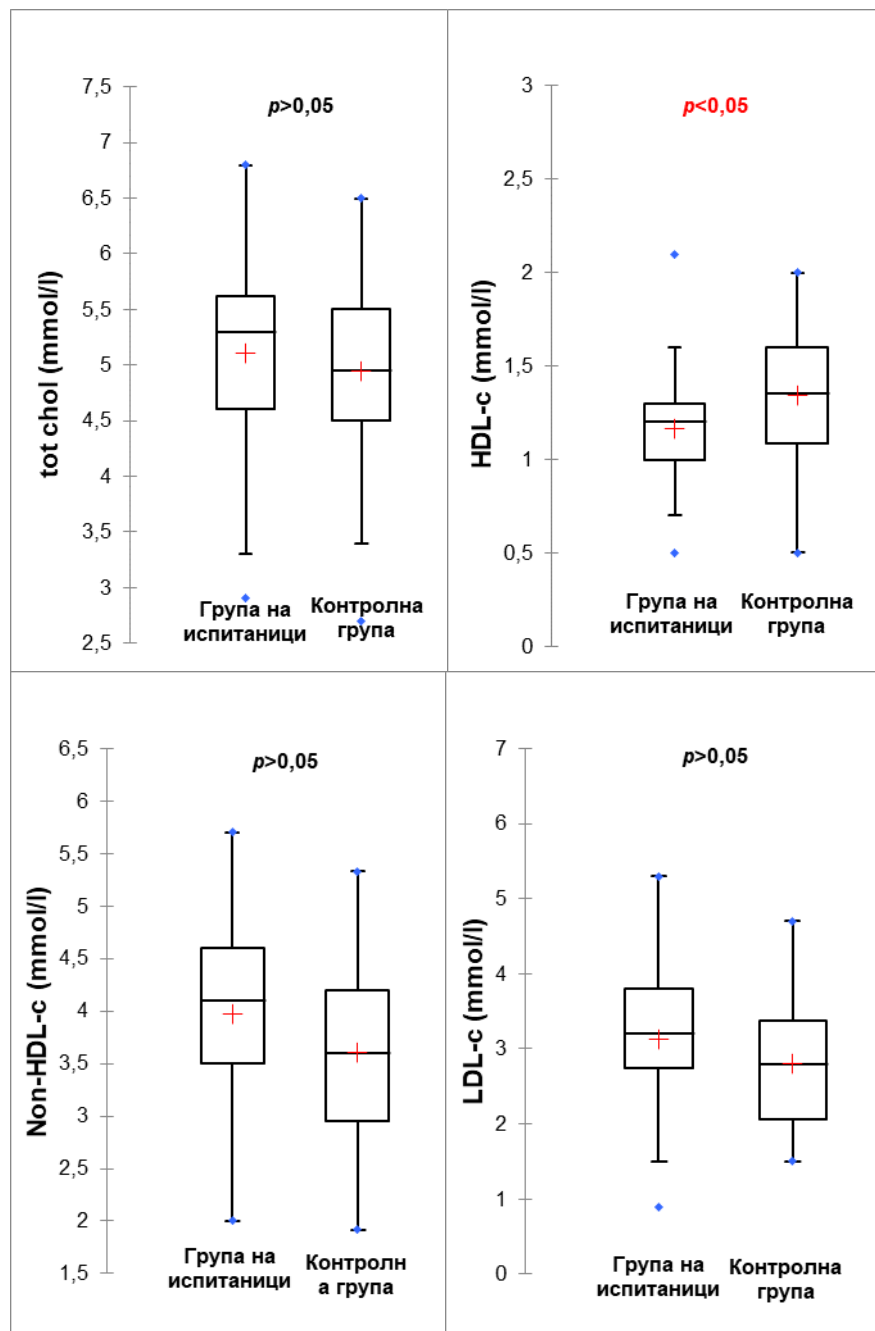
Анализите на податоците за хематокритот (Hct), хемоглобинот (Hgb), тромбоцитите (Plt) и проценетата гломеруларната филтрација (eGFR), вкупниот холестерол (tot chol), не-HDL-холестеролот (non-HDL-c), LDL-холестеролот (LDL-c), триглицеридите (TG), С-реактивниот протеин (CRP) и гликозилираниот хемоглобин (HbA1c) помеѓу двете групи пациенти не покажуваат статистички сигнификантни разлики во дистрибуцијата на вредностите според мултиваријантната анализа на варијансата ($p > 0,05$).

Спротивно, вредностите на HDL-холестеролот (HDL-c) се статистички сигнификантно повисоки кај контролната група наспроти испитуваната група пациенти ($p < 0,05$).

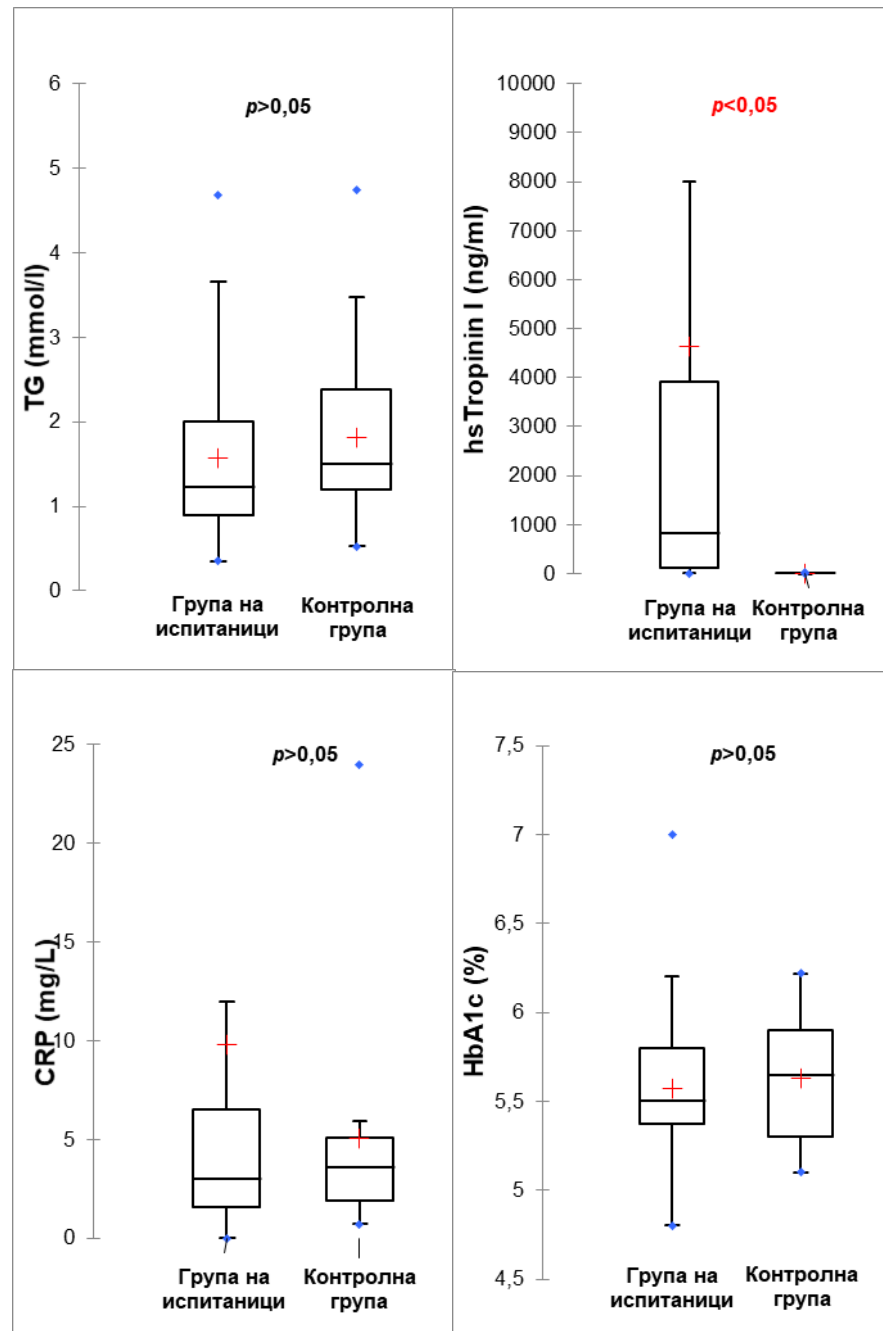
Вредностите на високосензитивниот тропонин (hs-Troponin I) се екстремно повисоки кај испитуваната група и разликата во однос на контролната група е статистички сигнификантна ($p<0,05$). Сепак, тоа е очекувана последица на обемното исхемично оштетување на кардиомиоцитите кај испитуваната група и е определено со критериумите за вклучување и исклучување во студијата.



Графикон 6.13. Лабораториски вредности на хематокритот (Hct), хемоглобинот (Hgb), тромбоцитите (Plt) и проценетата гломеруларната филтрација (eGFR)



Графикон 6.14. Лабораториски вредности на вкупниот холестерол (tot chol), HDL-холестеролот (HDL-c), не-HDL-холестеролот (non-HDL-c) и LDL-холестеролот (LDL-c)



Графикон 6.15. Лабораториски вредности на триглицеридите (TG), високосензитивниот тропонин (hs-Тропонин I), С-реактивниот протеин (CRP) и гликозилираниот хемоглобин (HbA1c)

6.2. Дескриптивни резултати од генотипизацијата

Генотипизацијата на испитуваните полиморфизми: MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1, MMP-9 C>T, -1562 (rs 3918242) во промоторниот

регион на генот MMP-9 и eNOS -786 T>C (rs2070744) во промоторниот регион на генот eNOS е успешно извршена врз ДНК-примероците од сите 80 пациенти.

6.2.1. Полиморфизам MMP-1 rs1799750

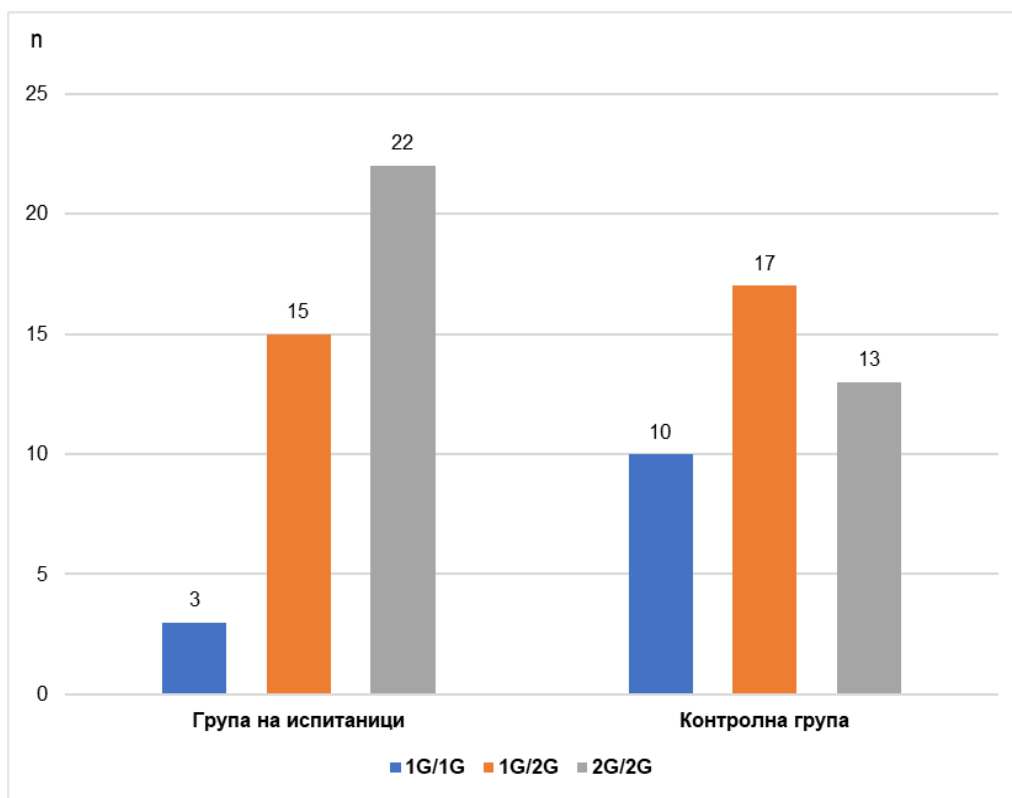
Со генотипизацијата е одреден по еден од трите генотипови на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 во секој примерок и тоа: хомозиготен генотип (1G/1G), хетерозиготен (1G/2G) и хомозиготен варијантен генотип (2G/2G). Алелните фреквенции се определени за алелот 1G, како и за варијантниот алел 2G.

Дистрибуцијата на генотиповите на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 дескриптивно е прикажана во табелата 6.12. и графиконот 6.16., додека алелната дистрибуција на графиконот 6.17.

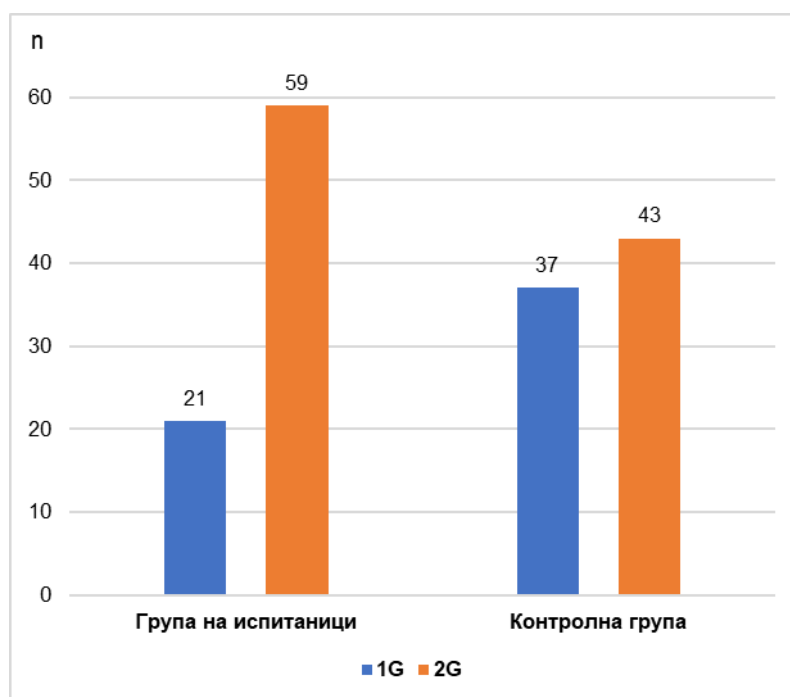
Табела 6.12. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1

Пациенти	Генотип на MMP-1 rs1799750	n	%
Група на испитаници	1G/1G	3	7,50
	1G/2G	15	37,50
	2G/2G	22	55,00
Вкупно		40	100,00
Контролна група	1G/1G	10	25,00
	1G/2G	17	42,50
	2G/2G	13	32,50
Вкупно		40	100,00

Од прикажаните податоци може јасно да се заклучи дека хомозиготниот генотип 1G/1G е почесто застапен кај контролната (25,00%) отколку кај испитуваната група (7,50%). Хетерозиготниот генотип 1G/2G има нешто повисока фреквенција кај контролните (42,50%) отколку кај испитуваните пациенти (37,50%). Хомозиготните индивидуи за варијантниот генотип 2G/2G, пак, се застапени многу почесто кај испитуваната (55,00%) отколку кај контролната група (32,50%) пациенти.



Графикон 6.16. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1



Графикон 6.17. Дистрибуција на алелите на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1

6.2.2. Полиморфизам MMP-9 rs3918242

Генотипизацијата на овој полиморфизам овозможи да се утврди еден од трите можни генотипови на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 во примероците и тоа: хомозиготен генотип (СС), хетерозиготен (СТ) и хомозиготен варијантен генотип (ТТ). Алелните фреквенции се определени за алелот С, како и за варијантниот алел Т.

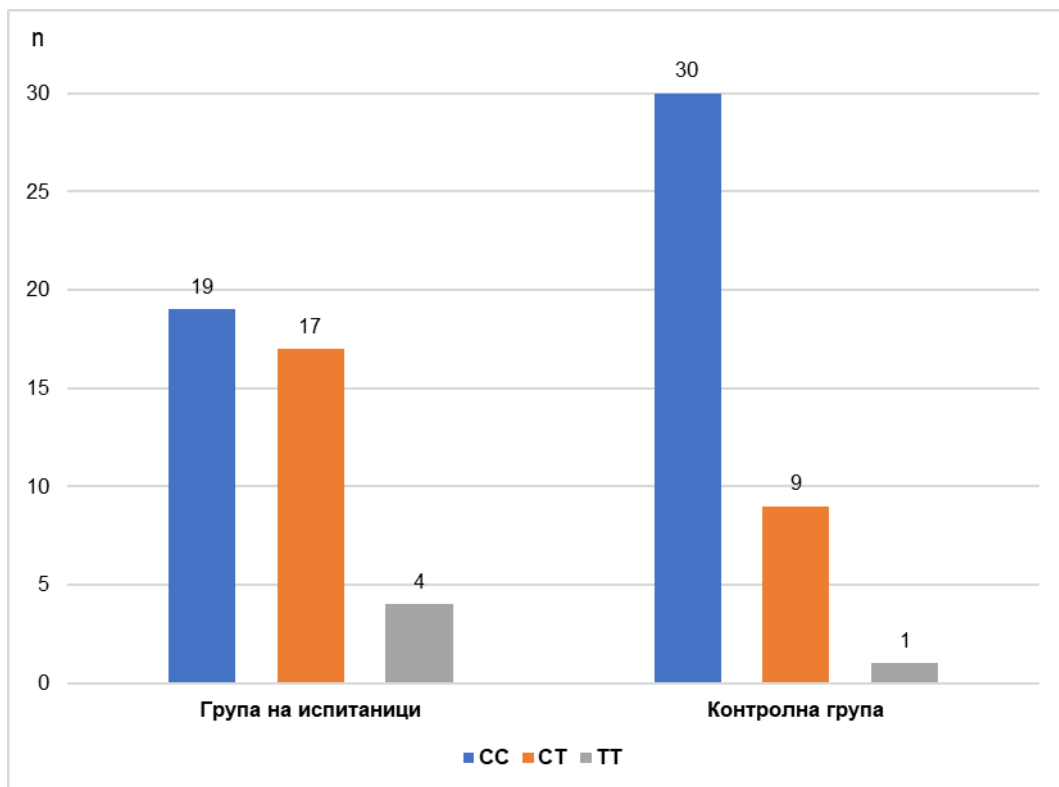
Дистрибуцијата на генотиповите на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 дескриптивно е прикажана во табелата 6.13. и на графиконот 6.18., додека алелната дистрибуција на графиконот 6.19.

Табела 6.13. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9

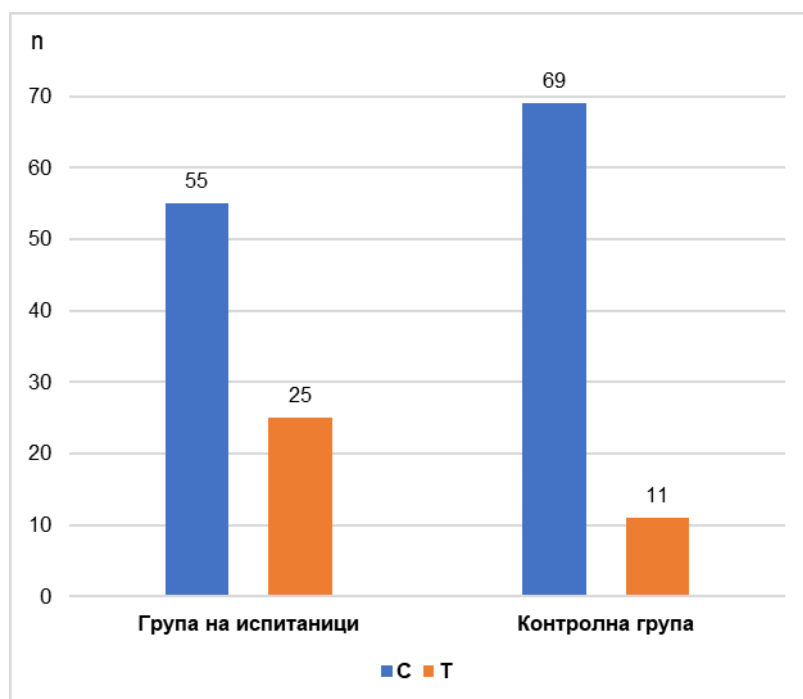
Пациенти	Генотип на rs3918242 во генот MMP-9	n	%
Група на испитаници	СС	19	47,50
	СТ	17	42,50
	ТТ	4	10,00
Вкупно		40	100,00
Контролна група	СС	30	75,00
	СТ	9	22,50
	ТТ	1	2,50
Вкупно		40	100,00

Фреквенцијата на генотипот СС според прикажаните резултати е многу повисока кај контролната група (75,00%) отколку кај испитуваната група со сигнификантна КАБ (47,50%), додека спротивно, хетерозиготниот генотип СТ е идентификуван речиси двојно повеќе кај испитуваната група (42,50%) отколку кај контролната група (22,50%).

Фреквенцијата на генотипот ТТ е значително повисока кај испитуваните (10,00%) во однос на контролните пациенти (2,50%).



Графикон 6.18. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9



Графикон 6.19. Дистрибуција на алелите на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9

6.2.3. Полиморфизам eNOS rs2070744

Генотипизацијата на овој полиморфизам овозможи да се утврди еден од трите можни генотипови на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS во примероците: хомозиготен генотип (ТТ), хетерозиготен (ТС) и хомозиготен варијантен генотип (СС). Алелните фреквенции се определени за алелот Т, како и за варијантниот алел С.

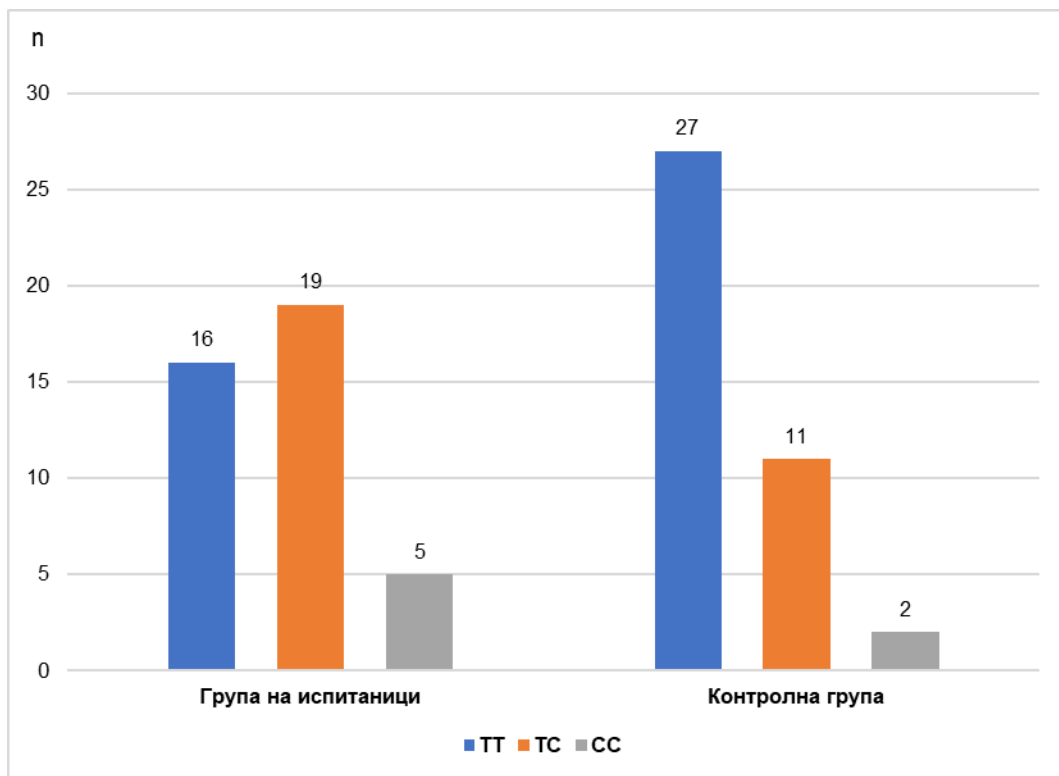
Дистрибуцијата на генотиповите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS дескриптивно е прикажана во табелата 6.14. и на графиконот 6.20., додека, пак, алелната дистрибуција на графиконот 6.21.

Табела 6.14. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS

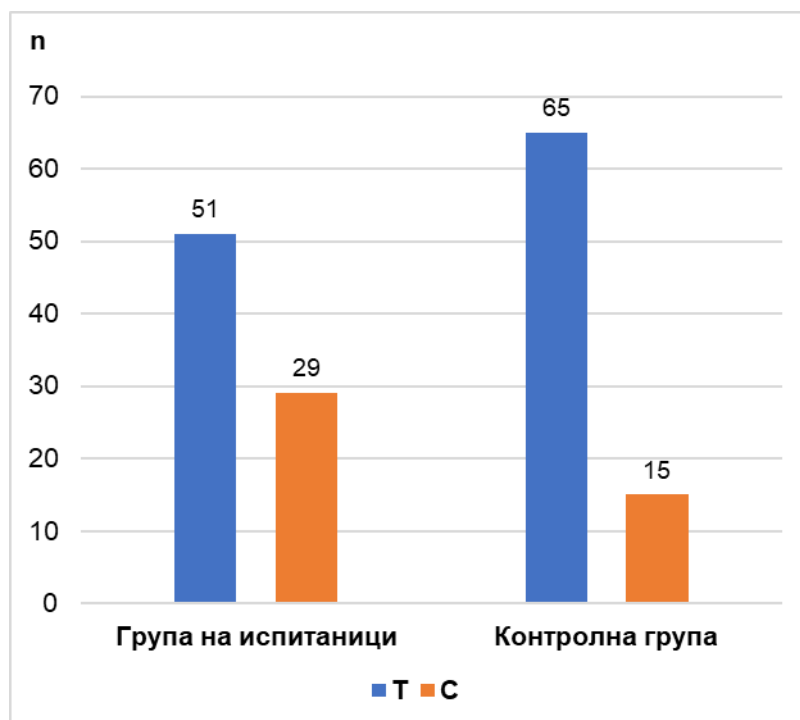
Пациенти	Генотип на rs2070744 во генот eNOS	n	%
Група на испитаници	ТТ	16	40,00
	ТС	19	47,50
	СС	5	12,50
Вкупно		40	100,00
Контролна група	ТТ	27	67,50
	ТС	11	27,50
	СС	2	5,00
Вкупно		40	100,00

Од прикажаните податоци е сосема видливо дека фреквенцијата на хомозиготниот генотип ТТ е многу повисока кај контролната група (67,50%) отколку кај испитуваната група пациенти (40,00%). Фреквенцијата на хетерозиготниот генотип ТС е речиси двојно повисока кај испитуваната група (47,50%) во споредба со контролната група (27,50%).

Фреквенцијата на хомозиготниот варијантен генотип СС е значително повисока кај испитуваната (12,50%) во однос на контролната група пациенти (5,00%).



Графикон 6.20. Дистрибуција на генотиповите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS



Графикон 6.21. Дистрибуција на алелите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS

5.3. Популациско-генетска анализа

Генетската избалансираност на пациентите од испитуваната и од контролната група се проверени со популациско-генетски анализи.

За да се детерминира дали популациите (групите) пациенти се во Харди-Вајнбергова рамнотежа, беа пресметани опсервираните наспроти очекуваните фреквенции на трите испитувани полиморфизми и тоа:

1. MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1;
2. MMP-9 C>T, -1562 (rs 3918242) во промоторниот регион на генот MMP-9; и
3. eNOS -786 T>C (rs2070744) во генот за ендотелната азотен оксид синтетаза (eNOS).

Пресметаните вредности на p поголеми од 0,05 според χ^2 -тестот укажуваат на тоа дека испитуваната популација, односно група на пациенти, е во согласност со Харди-Вајнберговиот принцип на рамнотежа за испитуваниот полиморфизам.

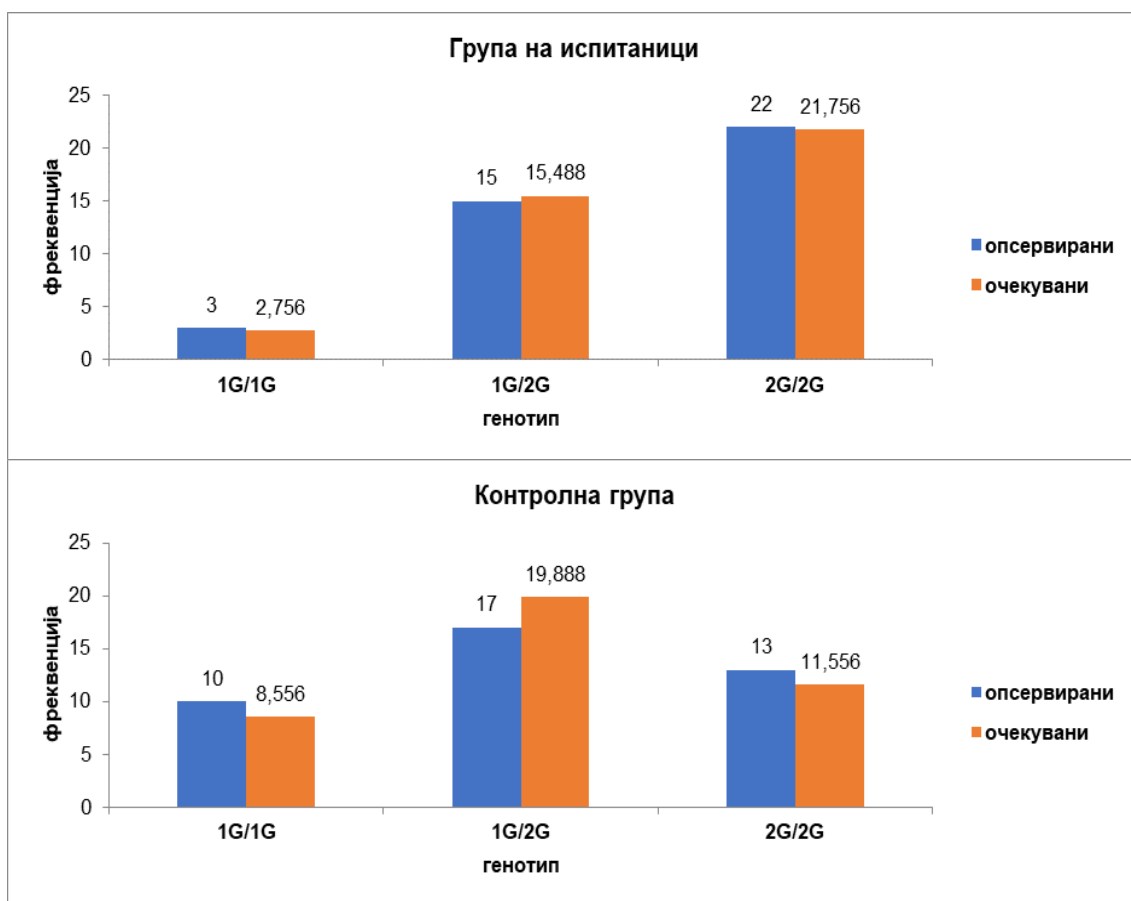
6.3.1. Полиморфизам MMP-1 rs1799750

Дистрибуцијата на опсервираните и очекуваните фреквенции на генотиповите на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 кај двете групи, како и пресметките во однос на Hardy-Weinberg-овата рамнотежа се прикажани во табелата 6.15. и на графиконот 6.22.

Табела 6.15. Пресметани вредности за Hardy-Weinberg-овата рамнотежа на генотипските фреквенции на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1

MMP-1 rs1799750	Група на испитаници		Контролна група	
	опсервирани	очекувани	опсервирани	очекувани
1G/1G	3	2,756	10	8,556
1G/2G	15	15,488	17	19,888
2G/2G	22	21,756	13	11,556
P	0,842		0,358	

Како што може да се види од прикажаните податоци, дистрибуцијата на генотиповите на овој полиморфизам не покажа отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа и според тоа нема статистички значајни разлики помеѓу опсервираните и теоретски очекуваните фреквенции ($p > 0,05$) ниту кај контролната, ниту кај испитуваната група.



Графикон 6.22. Дистрибуција на опсервираните наспроти очекуваните генотипски фреквенции на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1

6.3.2. Полиморфизам MMP-9 rs3918242

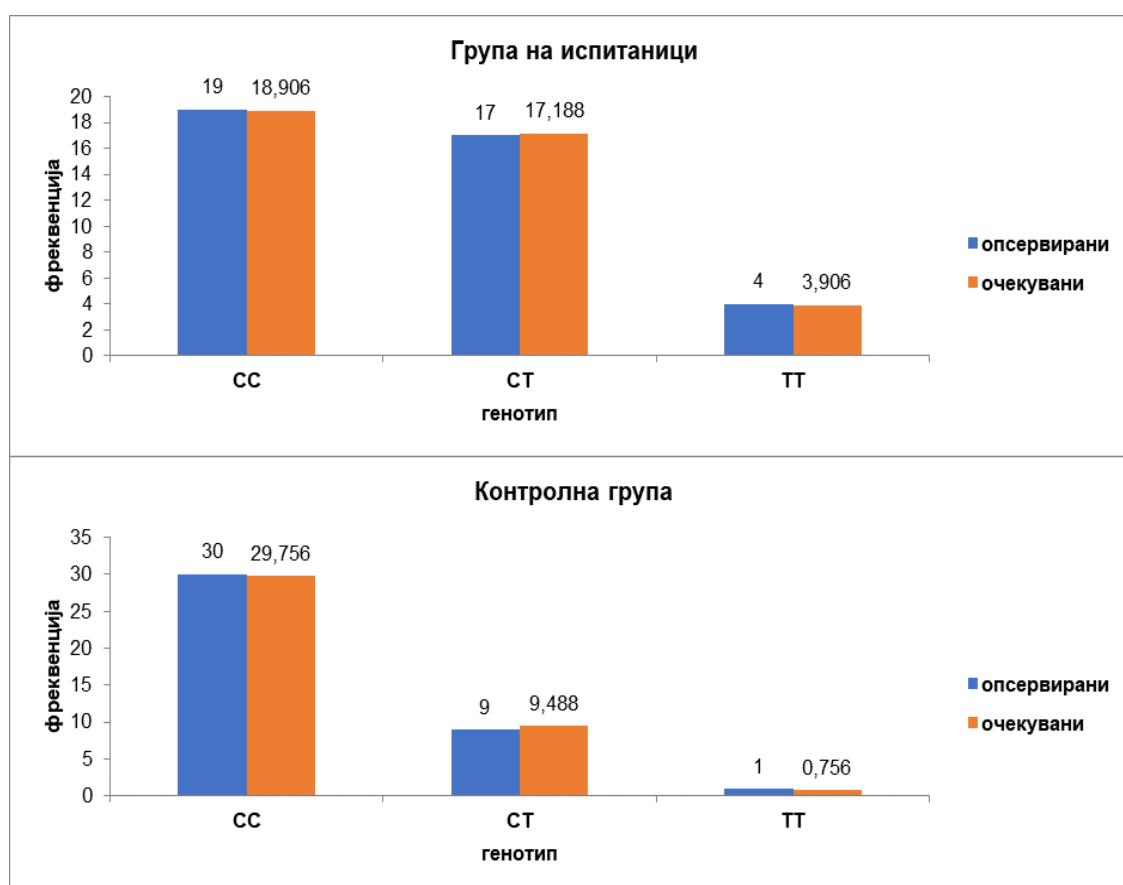
Податоците за дистрибуцијата на опсервираните и очекуваните фреквенции на генотиповите на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 кај двете групи и анализата за постоење на Hardy-Weinberg-овата рамнотежа се прикажани во табелата 6.16. и на графиконот 6.23.

Популациско-генетските пресметки во однос на овој полиморфизам не покажаа отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа и според тоа нема

статистички сигнификантни разлики помеѓу опсервираните и теоретски очекуваните фреквенции ($p>0,05$) ниту кај контролната, ниту кај испитуваната група.

Табела 6.16. Пресметани вредности за Hardy-Weinberg-овата рамнотежа на генотипските фреквенции на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9

MMP-9 rs3918242	Група на испитаници		Контролна група	
	опсервирани	очекувани	опсервирани	очекувани
CC	19	18,906	30	29,756
CT	17	17,188	9	9,488
TT	4	3,906	1	0,756
P	0,945		0,745	



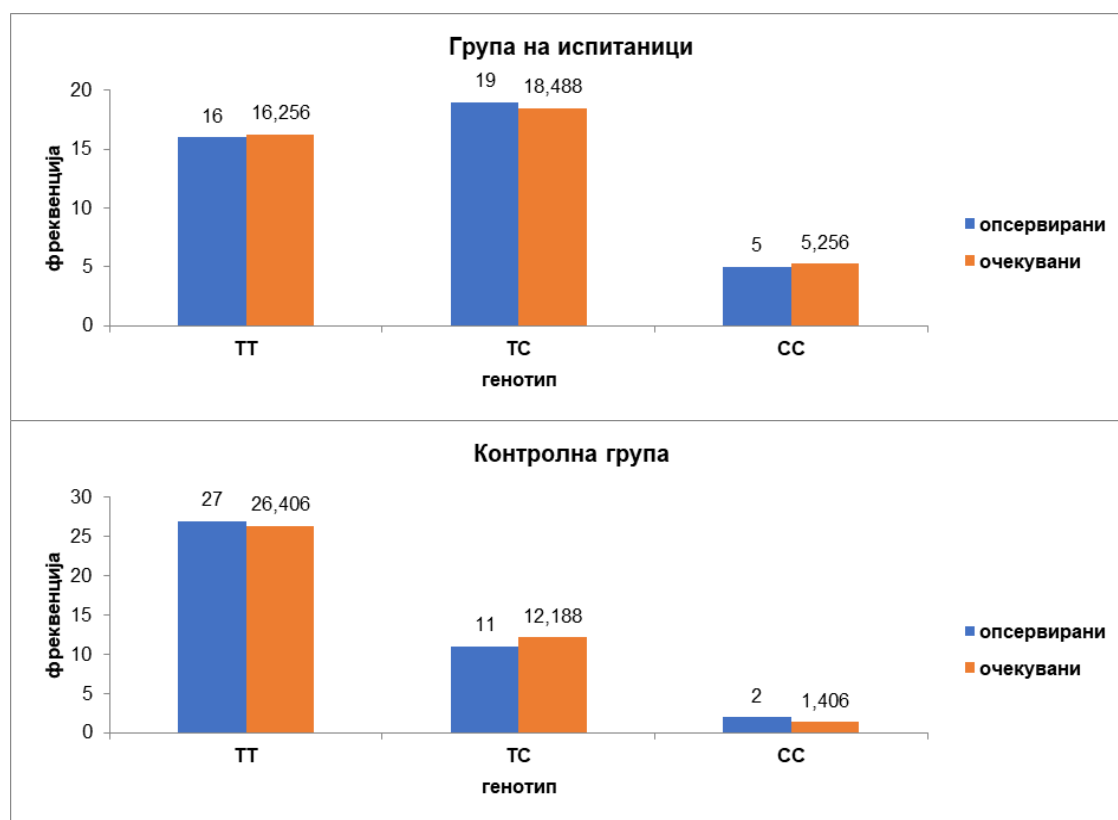
Графикон 6.23. Дистрибуција на опсервираните наспроти очекуваните генотипски фреквенции на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9

6.3.3. Полиморфизам eNOS rs2070744

Прикажаните податоци за дистрибуцијата на опсервираните и очекуваните фреквенции на генотиповите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS и Hardy-Weinberg-овата рамнотежа кај двете групи се прикажани во табелата 6.17. и на графиконот 6.24.

Табела 6.17. Пресметани вредности за Hardy-Weinberg-овата рамнотежа на генотипските фреквенции на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS

eNOS rs2070744	Група на испитаници		Контролна група	
генотип	опсервирани	очекувани	опсервирани	очекувани
ТТ	16	16,256	27	26,406
ТС	19	18,488	11	12,188
СС	5	5,256	2	1,406
Р	0,861		0,538	



Графикон 6.24. Дистрибуција на опсервираните наспроти очекуваните генотипски фреквенции на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS

Популациско-генетските пресметки во однос на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS не покажаа отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа и според тоа нема статистички сигнификантни разлики помеѓу опсервираните и теоретски очекуваните фреквенции ($p > 0,05$) ниту кај контролната, ниту кај испитуваната група.

6.4. Генетско-асоцијативни анализи

Со цел да се процени постоењето на генетска асоцијација на трите испитувани полиморфизми: 1. MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1; 2. MMP-9 C>T, -1562 (rs 3918242) во промоторниот регион на генот MMP-9; и 3. eNOS -786 T>C (rs2070744) во генот за ендотелната азотен оксид синтетаза eNOS со коронарната артериска болест, беа спроведени низа статистички анализи користејќи повеќе генетско-асоцијативни модели.

За секој од испитуваните генетски полиморфизми поединечно вршени се монолокусни анализи при што се споредувани генотипските фреквенции со користење на генотипскиот, доминантниот, рецесивниот, хетерозиготниот и супердоминантниот модел, додека споредбата на алелните фреквенции е изведена со алелниот и адитивниот модел.

Пресметките се направени со користење на Pearson-овиот χ^2 (Хи-квадрат) тест и со Fisher-овиот егзактен тест, како и со Cochran–Armitage тренд-тестот. Исто така, пресметан е и веројатносниот однос т.е. односот на шанси (odds ratio или OR) при интервал на доверливост од 95% (95% CI). Дизајнот на оваа студија (случаи и контроли) не дозволува прецизно пресметување на односот на ризик (risk ratio или RR).

Со цел да се потврдат резултатите добиени со генотипскиот модел, извршена е и униваријантна логистичка регресиона анализа за предикција на коронарната артериска болест. Добиените ROC-криви (од англ. receiver operating characteristic, ROC Curve) претставуваат графички приказ на успешноста на користениот модел според логистичката регресија. Квантитативната мерка на успешноста на моделот за предикција на бинарните класи според генотипските

фреквенции е вредноста на површината под ROC-кривата (AUC, од англ. area under curve).

Евалуирани се и ефектите на трите полиморфизми во однос на предикција на коронарната артериска болест со мултиваријантната логистичка регресиона анализа.

6.4.1. Полиморфизам MMP-1 rs1799750

Генетската асоцираност на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 со коронарната артериска болест е евалуирана преку статистичка анализа со користење на низа генетско-асоцијативни модели. Резултатите се прикажани во табелата 6.18.

Споредбата на фреквенциите во комбинации на генотипови според 5 различни генетски модели, како и на алелните фреквенции според два модела покажа дека постојат статистички сигнификантни разлики ($p < 0,05$) со користење на сите освен со хетерозиготниот и супердоминантниот модел.

Кај генотипскиот модел, хомозиготниот генотип 1G/1G е користен како референтен. Според овој модел, носителите на генотиповите 1G/2G имаат вредност на односот на шанси OR (odds ratio) од 2,941, односно имаат околу 3 пати поголема веројатност да развијат сигнификантна КАБ на возраст до 45 години во споредба со носителите на референтниот генотип 1G/1G при што оваа асоцираност е статистички сигнификантна ($p < 0,05$). Уште поизразено е кај носителите на генотипот 2G/2G кои, според овој модел, имаат дури 5,641 пати поголема шанса за појава на КАБ од тие со референтниот генотип 1G/1G при што оваа асоцираност е статистички сигнификантна ($p < 0,05$).

Статистички сигнификантно зголемување на веројатноста за појава на сигнификантна КАБ на возраст до 45 години е пресметано и со останатите модели на споредба на генотиповите помеѓу испитуваната и контролната група, освен со хетерозиготниот и супердоминантниот модел каде не е најдена статистичка сигнификантност ($p > 0,05$). Така, кај доминантниот модел, носителите кои имаат генотип со барем еден 2G алел имаат статистички сигнификантна 4,111 пати повисока веројатност за појава на КАБ отколку носителите на хомозиготниот генотип без овој алел, односно генотипот 1G/1G ($p < 0,05$).

Табела 6.18. Генетско-асоцијативна анализа на полиморфизмот MMP-1 rs1799750

Генетски модел	MMP-1 rs1799750 генотип/ алел	Група на испитаници		Контролна група		χ^2	P	OR (95% CI)
		n	%	n	%			
Генотипски*	1G/1G	3	7,50	10	25,00	5,991	0,045	реф.
	1G/2G	15	37,50	17	42,50			2,941 (0,680 - 12,730)
	2G/2G	22	55,00	13	32,50			5,641 (1,309 - 24,317)
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Доминантен	1G/2G + 2G/2G	37	92,50	30	75,00	4,501	0,034	4,111 (1,037 - 16,295)
	1G/1G	3	7,50	10	25,00			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Рецесивен	2G/2G	22	55,00	13	32,50	4,114	0,043	2,538 (1,023 - 6,298)
	1G/1G + 1G/2G	18	45,00	27	67,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Хетерозиготен	1G/2G	15	83,33	17	62,96	2,181	0,140	2,941 (0,680 - 12,730)
	1G/1G	3	16,67	10	37,04			
	Вкупно	18	100,00	27	100,00			
Супердоминантен	1G/2G	15	37,50	17	42,50	0,208	0,648	0,812 (0,331 - 1,989)
	1G/1G + 2G/2G	25	62,50	23	57,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Алелен	2G	59	73,75	43	53,75	6,924	0,009	2,417 (1,244 - 4,697)
	1G	21	26,25	37	46,25			
	Вкупно	80	100,00	80	100,00			
Адитивен #	0 2G	3	7,50	10	25,00	0,234	0,013	/
	1 2G	15	37,50	17	42,50			
	2 2G	22	55,00	13	32,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			

реф = референтен генотип за кој OR по дефиниција =1

* двонасочен Fisher-ов егзактен тест # двонасочен Cochran-Armitage ординален тест

Понатаму, според рецесивниот модел, пациентите со генотип 2G/2G имаат 2,538 пати поголеми шанси за КАБ отколку тие со генотиповите 1G/1G и 1G/2G и овие разлики се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Во однос на споредбата на алелите, индивидуите кои се носители на алелот 2G имаат 2,417 пати поголеми шанси за развој на КАБ во однос на носителите на алелот 1G ($p < 0,05$). Резултатите од алелниот модел се потврдени и со Cochran-Armitage тестот кај адитивниот модел, при што ризикот расте со бројот на присутни 2G алели, односно: $2 < 1 < 0$ 2G алели. Со овој модел не се пресметува односот на шанси OR.

Овие резултати недвосмислено укажуваат на постоењето на статистички сигнификантна генетска асоцијација на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 со сигнификантна коронарна артериска болест кај млади лица при што генотипот 2G/2G, односно алелот 2G значајно го зголемуваат ризикот од развој на болеста.

6.4.2. Полиморфизам MMP-9 rs3918242

Резултатите од анализата на асоцираноста на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 со коронарната артериска болест кај млади пациенти преку користење на повеќе генетско-асоцијативни модели е прикажана во табелата 6.19.

Анализата со генотипскиот модел во однос на овој полиморфизам покажа присуство на статистички значајни разлики во генотипските фреквенции помеѓу групата со коронарна артериска болест и контролната група ($p < 0,05$). Пресметаниот веројатносен индекс (OR - odds ratio) за хетерозиготниот генотип СТ изнесува 2,982 во однос на референтниот хомозиготен генотип СС. За хомозиготниот варијантен генотип ТТ вредноста на OR е 6,316. Тоа подразбира дека носителите на генотиповите СТ и ТТ имаат приближно 3 и 6,3 пати повисока веројатност, соодветно, за појава на значајна коронарна артериска болест кај помлади лица отколку носителите на неваријантниот генотип СС.

Табела 6.19. Генетско-асоцијативна анализа на полиморфизмот MMP-9 rs3918242

Генетски модел	MMP-9 rs3918242 генотип/ алел	Група на испитаници		Контролна група		χ^2	p	OR (95% CI)
		n	%	n	%			
Генотипски*	CC	19	47,50	30	75,00	6,731	0,035	реф.
	CT	17	42,50	9	22,50			2,982 (1,107 - 8,039)
	TT	4	10,00	1	2,50			6,316 (0,655 - 60,855)
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Доминантен	CT + TT	21	52,50	10	25,00	6,373	0,012	3,316 (1,286 - 8,550)
	CC	19	47,50	30	75,00			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Рецесивен	TT	4	10,00	1	2,50	1,920	0,166	4,333 (0,462 - 40,610)
	CC + CT	36	90,00	39	97,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Хетерозиготен	CT	17	47,22	9	23,08	4,819	0,028	2,982 (1,107 - 8,039)
	CC	19	52,78	30	76,92			
	Вкупно	36	100,00	39	100,00			
Супердоминантен	CT	17	42,50	9	22,50	3,647	0,056	2,546 (0,964 - 6,726)
	CC + TT	23	57,50	31	77,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Алелен	T	25	31,25	11	13,75	7,025	0,008	2,851 (1,290 - 6,300)
	C	55	68,75	69	86,25			
	Вкупно	80	100,00	80	100,00			
Адитивен #	0 T	19	47,50	30	75,00	2,565	0,010	/
	1 T	17	42,50	9	22,50			
	2 T	4	10,00	1	2,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			

реф = референтен генотип за кој OR по дефиниција =1

* двонасочен Fisher-ов егзактен тест, # двонасочен Cochran-Armitage ординален тест

Со користење на доминантниот модел е пресметано дека веројатноста за појава на коронарната артериска болест е повисока за 3,316 пати кај пациентите кои се носители на генотиповите кои содржат барем еден варијантен алел Т, односно на генотиповите СТ и ТТ, во споредба со оние кои се носители на неваријантниот генотип СС. Овие разлики се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Според хетерозиготниот модел, лицата кои се носители на генотипот СТ имаат статистички значајна 2,982 пати повисока веројатност за развој на сигнификантна КАБ отколку носителите на генотипот СС ($p < 0,05$).

Фреквенциите на комбинациите на генотипови и со останатите применети генетски модели (рецесивниот и супердоминантниот) покажаа поврзаност на генотиповите кои содржат барем еден варијантен алел С со коронарната артериска болест во однос на контролната група. Сепак, овие разлики не се статистички значајни ($p > 0,05$), па оттаму и пресметаниот веројатносен индекс OR нема доволна confidentност.

Алелните фреквенции анализирани со алелниот модел покажуваат дека носителите на варијантниот алел Т имаат 2,851 пати поголема веројатност за коронарна артериска болест во споредба со носителите на неваријантниот алел С при што разликите се статистички сигнификантни ($p < 0,05$). Дополнителна потврда на улогата на алелот Т во зголемувањето на ризикот од КАБ е добиена и со адитивниот генетски модел. Пресметките со Cochran-Armitage ординалниот тест покажуваат дека веројатноста за појава на коронарна артериска болест кај млади лица се зголемува со бројот на Т алели во генотипот на испитаниците, а разликите се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

6.4.3. Полиморфизам eNOS rs2070744

Резултатите од монолокусната анализа на поврзаноста на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS со значајна КАБ кај помлади лица преку користење на повеќе генетско-асоцијативни модели е прикажана во табелата 6.20.

Табела 6.20. Генетско-асоцијативна анализа на полиморфизмот eNOS rs2070744

Генетски модел	eNOS rs2070744 генотип/алел	Група на испитаници		Контролна група		χ^2	p	OR (95% CI)
		n	%	n	%			
Генотипски*	ТТ	16	40,00	27	67,50	5,991	0,042	реф.
	ТС	19	47,50	11	27,50			2,915 (1,109 - 7,661)
	СС	5	12,50	2	5,00			4,219 (0,731 - 24,340)
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Доминантен	ТС + СС	24	60,00	13	32,50	6,084	0,014	3,115 (1,247 - 7,782)
	ТТ	16	40,00	27	67,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Рецесивен	СС	5	12,50	2	5,00	1,409	0,235	2,714 (0,494 - 14,901)
	ТТ + ТС	35	87,50	38	95,00			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Хетерозиготен	ТС	19	54,29	11	28,95	4,832	0,028	2,915 (1,109 - 7,661)
	ТТ	16	45,71	27	71,05			
	Вкупно	35	100,00	38	100,00			
Супердоминантен	ТС	19	47,50	11	27,50	3,413	0,065	2,385 (0,940 - 6,052)
	ТТ + СС	21	52,50	29	72,50			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			
Алелен	С	29	36,25	15	18,75	6,144	0,013	2,464 (1,196 - 5,078)
	Т	51	63,75	65	81,25			
	Вкупно	80	100,00	80	100,00			
Адитивен #	0 С	16	40,00	27	67,50	2,408	0,016	/
	1 С	19	47,50	11	27,50			
	2 С	5	12,50	2	5,00			
	Вкупно	40	100,00	40	100,00			

реф = референтен генотип за кој OR по дефиниција =1

* двонасочен Fisher-ов егзактен тест # двонасочен Cochran-Armitage ординален тест

Анализата со генотипскиот модел во однос на овој полиморфизам покажа дека носителите на хетерозиготниот генотип ТС имаат 2,915 пати поголема веројатност за појава на коронарна артериска болест отколку носителите на неваријантниот хомозиготен генотип ТТ кој е користен како референтен, а овие разлики се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Носителите на хомозиготниот варијантен генотип СС имаат 4,219 пати повисоки шанси за развој на сигнифинатна КАБ отколку тие со референтниот генотип ТТ ($p < 0,05$).

Кај доминантниот модел веројатносниот индекс *OR* покажува дека носителите на генотиповите ТС и СС имаат 3,115 пати повисока веројатност за развој на КАБ на помлада возраст отколку лицата кои се носители на генотипот ТТ, а разликите се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Според хетерозиготниот модел, носителите на хетерозиготниот генотип ТС имаат 2,915 повисока веројатност за развој на КАБ отколку тие кои се носители на генотипот ТТ. Овие разлики се статистички значајни ($p < 0,05$).

Зголемување на веројатноста од развој на КАБ кај носителите на генотиповите од овој полиморфизам кои го содржат варијантниот алел С се регистрира и со користење на рецесивниот и супердоминантниот модел, но овие разлики не се статистички сигнификантни ($p > 0,05$).

При анализа на алелните фреквенции со алелниот модел, шансите за појава на коронарна артериска болест се зголемени за 2,464 пати кај носителите на варијантниот алел С во споредба со носителите на алелот Т при што разликите се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Улогата на алелот С во зголемувањето на веројатноста за развој на болеста е потврдена и со адитивниот модел со кој е утврдено дека шансите се намалуваат пропорционално со бројот на алели С ($0C < 1C < 2C$), односно помалиот број С алели значи помали шанси, а разликите се статистички значајни ($p < 0,05$). Кај овој модел не може да се пресмета односот на шанси *OR*.

6.4.4. Генетска асоцијација на трите испитувани полиморфизми

Предиктивната улога на трите испитувани генски полиморфизми во однос на појавата на сигнификантна коронарна артериска болест кај пациентите

до 45 години е евалуирана со мултиваријантна логистичка регресиона анализа на податоците од генотипизацијата кај испитуваната и контролната група.

Првичната проценка со прелиминарниот Hosmer-Lemeshow-тест ($\chi^2=0,567$; $p=0,967$) покажа дека податоците се подобни за спроведување на оваа регресиона анализа, односно дека $p>0,05$.

Резултатите од мултиваријантна логистичка регресиона анализа се прикажани во табелата 6.21. и графиконот 6.25.

Табела 6.21. Мултиваријантна логистичка регресиона анализа

Варијанта	Генотип	β -коэф. (CI 95%)	стандардна грешка (SE)	Wald-ов χ^2	p	OR (95% CI)
MMP-1 rs1799750	1G/1G	/	/	/	/	реф.
	1G/2G	1,499	0,841	3,179	0,075	4,479 (0,862 - 23,286)
	2G/2G	2,259	0,842	7,200	0,007	9,575 (1,839 - 49,861)
MMP-9 rs3918242	CC	/	/	/	/	реф.
	CT	0,884	0,700	1,594	0,207	2,420 (0,614 - 9,540)
	TT	2,434	1,297	3,521	0,061	11,410 (0,897 - 145,086)
eNOS rs2070744	TT	/	/	/	/	реф.
	TC	0,775	0,680	1,298	0,254	2,171 (0,572 - 8,237)
	CC	2,009	1,061	3,586	0,058	7,453 (0,932 - 59,598)

реф = референтен генотип за кој OR по дефиниција =1

Од добиените податоци особено статистичко значење имаат вредностите на моделот за предикција на појавата на сигнификантна коронарна артериска болест кај носителите на варијантниот генотип 2G/2G на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1. Веројатносниот индекс OR за овој генотип изнесува 9,575 во интервалот на доверливост при 95% од 1,839 до 49,861 при што постои статистичка значајност ($p<0,05$). Оттаму, носителите на генотипот 2G/2G имаат околу 9,5 пати повисока веројатност да развијат сигнификантна коронарна артериска болест во помлада возраст при споредба со носителите на неваријантниот хомозиготен генотип 1G/1G.

Пресметаниот веројатносен индекс OR за хетерозиготниот генотип 1G/2G на истиот полиморфизам изнесува 4,479 во интервалот на доверливост при 95% од 0,862 до 23,286, но отсуствува статистичка сигнификантност

($p > 0,05$). Од тоа произлегува дека носителите на хетерозиготниот генотип 1G/2G на овој полиморфизам имаат околу 4,5 пати повисока веројатност да развијат коронарна артериска болест во споредба со носителите на неваријантниот хомозиготен генотип 1G/1G. Релативно високата вредност на β -коефициентот, исто така, е во прилог на овој ефект.

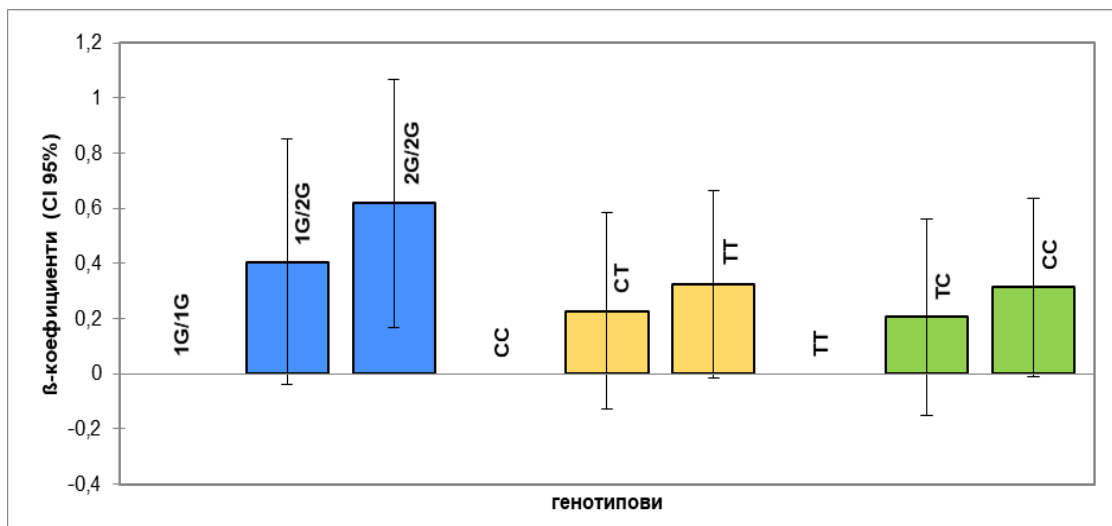
Иако пресметките со моделот за предикција конструиран со мултиваријантна логистичка регресиона анализа не покажа статистичка значајност во однос на останатите 2 испитувани варијанти, вредностите на веројатносниот индекс OR и вредностите на β -коефициентите покажуваат видлив статистички тренд.

Во однос на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 според овој предиктивен модел, носителите на хомозиготниот варијантен генотип TT имаат за 11,410 пати повисока веројатност (во интервал на доверливост при 95% од 0,897 до 145,086) за развој на сигнификантна КАБ на помлада возраст во споредба со носителите на референтниот генотип CC, но со маргинална несигнификатност ($p > 0,05$).

Според истиот модел, предиктивната вредност на хетерозиготниот генотип CT е уште помала и несигнификантна, но со јасен статистички тренд според веројатносниот индекс $OR = 2,420$, но не и според релативно ниската вредност на β -коефициентот (0,884).

Предиктивниот модел за полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS покажува дека носителите на варијантниот хомозиготен генотип CC имаат 7,453 пати (во интервал на доверливост при 95% од 0,932 - 59,598) повисока веројатност за развој на КАБ во споредба со носителите на референтниот генотип TT, но моделот е маргинално статистички несигнификантен ($p > 0,05$). Вредноста на β -коефициентот (2,009) укажува на јасен статистички тренд на зголемување на шансите за појава на КАБ.

Со истиот модел, хетерозиготниот генотип TC има за 2,171 пати (CI 95%: 0,572 - 8,237) повисока веројатност за појава на КАБ, но повторно со отсуство на статистичка значајност ($p > 0,05$).



Графикон 6.25. Графички приказ на моделните параметри добиени со мултиваријантна логистичка регресиона анализа

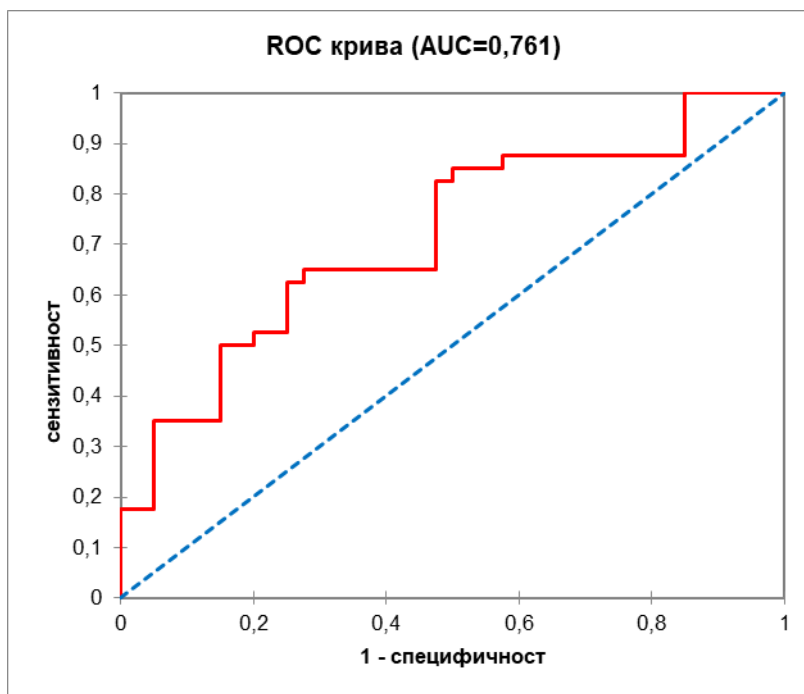
Прикажаниот графикон 6.25. се однесува на β -коэффициентите пресметани со мултиваријантната логистичка регресиона анализа и ја прикажуваат магнитудата на разликите (намалување или зголемување) на веројатноста од појава на сигнификантна коронарна артериска болест која е поврзана со определен генотип од моделот.

Според резултатите, хетерозиготните и варијантните хомозиготни генотипови на сите три испитувани полиморфизми видно ја зголемуваат вредноста на β -коэффициентите за веројатноста од појава на сигнификантна коронарна артериска болест во однос на референтниот хомозиготен неваријантен генотип за секој полиморфизам, соодветно.

Конструираниот модел на влијанието на трите анализирани генски полиморфизми, комбинирано, со мултиваријантната логистичка регресија резултира со равенка која ги користи моделните параметри прикажани во табелата 6.21 во однос на предикцијата на појава на сигнификантна коронарна артериска болест кај помлади лица. Поради прегледност, равенката не е прикажана.

Предиктивноста на сите три испитувани генски полиморфизми во однос на појавата на коронарната артериска болест графички е прикажана со ROC-кривата (графикон 6.26). Вредноста на површината под кривата ($AUC=0,761$) укажува на добра предиктивност на мултиваријантниот модел за

комбинираните ефекти на полиморфизмите во однос на појавата на сигнификантна КАБ.



Графикон 6.26. ROC-крива и пресметана површина под кривата (AUC) добиени со мултиваријантна логистичка регресија со генотипскиот модел за предикција

Според бројот на точно и погрешно класифицирани бинарни категории за присуство на коронарна артериска болест во однос на комбинираното присуство на испитуваните полиморфизми, со истиот модел се пресметани предиктивната сензитивност и специфичност, како и процентот на точна класификација (табела 6.22).

Табела 6.22. Класификациска табела на предиктивниот модел добиен со мултиваријантна логистичка регресија со истовремена примена на трите генски полиморфизми

Параметар	%
Специфичност	75,00
Сензитивност	57,50
Точно класифицирани	66,25

Според прикажаните резултати, истовремената анализа на трите генски полиморфизми точно го класифицирала присуството или отсуството на сигнификантна коронарна артериска болест во 66,25 % од случаите.

Специфичноста, односно стапката на вистински негативни случаи во однос на постоење сигнификантна КАБ, изнесува 75,00 %. Тоа подразбира дека панелот на испитување на трите полиморфизми е ефикасен кај 3/4 од пациентите во предикција на појавата на болеста кај млади лица.

Сензитивноста, односна стапката на вистински позитивни случаи во однос на коронарната артериска болест е 57,50%. Според тоа, анализата на трите генски полиморфизми е прецизна кај повеќе од половина од пациентите во идентификација на присуството или ризикот од значајна КАБ.

7. ДИСКУСИЈА

И покрај огромниот напредок во навременото поставување на дијагнозата, фармакотерапијата и интервентните процедури во текот на минатите декади, КАБ сè уште останува водечка причина за морбидитет и морталитет во светски рамки. До денес точната причина за КАБ останува недоволно разјаснета без оглед на екстензивните истражувања и подобреното сфаќање за нејзините патогени механизми што е клучно за понатамошно подобрување на клиничкиот исход кај пациентите со КАБ. Бројни клинички студии покажале дека негенетски фактори како што се факторите на средината, обезноста, дислипидемијата, хипертензијата, дијабетот, пушењето и физичката неактивност значајно го зголемуваат ризикот за КАБ. За среќа, оваа група ризик-фактори и морбидни состојби може да се контролира со промени во животниот стил и соодветен третман и на тој начин да се придонесе за минимизирање на улогата на овие ризик-фактори во развојот на КАБ. Но, одредени други ризик-фактори поврзани како на пример со полот, возраста, генетските фактори и слично, не можат да се минимизираат и контролираат, барем не во овој момент од развојот на науката и технологијата. Неспорен е исто така и фактот дека постојат многубројни други ризик-фактори и механизми за коишто недоволно се знае или воопшто не се знае дека играат улога во настанувањето на КАБ. Оттука, патогенетскиот механизам на настанување на

КАБ е исклучително комплексен и всушност не е униформен, туку обично станува збор за повеќе различни механизми условени од меѓусебната интеракција на различни ризик-фактори. Генетските фактори се, секако, во таа смисла од исклучително значење имајќи предвид дека КАБ е релативно често присутна во одредени фамилии и претставува сигнификантен ризик-фактор за акутен миокарден инфаркт или ненадејна срцева смрт во млада возраст.

Генетските фактори инволвирани во патогенетските механизми на настанувањето на КАБ и акутниот коронарен синдром се многубројни. Некои од нив се поврзани со нарушувања на липидниот метаболизам, со ендотелната дисфункција, со васкуларната инфламација, со интраваскуларната коагулација/тромбоза, како и со процесите на ткивно одржување и ремоделирање.

Во оваа докторска дисертација се одлучивме да истражиме дел од генските полиморфизми на матрикс металопротеиназите (MMP) како и на ендотелната азотен оксид синтетаза (eNOS) кои се инволвирани во процесите на ткивно одржување и ремоделирање и ендотелната дисфункција и тоа: MMP-1 - 1607 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C-1562T (rs3918242) и eNOS T-786C (rs2070744), како и да ја истражиме нивната поврзаност со КАБ кај помлада македонска популација.

За таа цел беа анализирани и компарирани демографските, клиничките, лабораториските, ангиографските и генетските податоци на хиперселектирана група од вкупно 40 пациенти на возраст од 18 до 45 години од обата пола со направена коронарна ангиографија и детектирана сигнификантна КАБ, како и на контролна група од 40 пациенти на иста возраст од обата пола со направена коронарна ангиографија со уреден наод или наод без сигнификантна КАБ.

Во поглед на демографските и клиничките податоци, беа анализирани полот, возраста, местото на живеење, историјата на пушење, телесната висина, телесната тежина, индексот на телесната маса (BMI), релевантните анамнестички податоци (фамилијарна анамнеза за КАБ, претходен ЦВИ, претходен АМИ, претходна перкутана коронарна интервенција со или без стентирање), понатаму, артерискиот крвен притисок, пулсот, левокоморната истисна фракција (LVEF), клиничката индикација за коронарографија (АПС, АКС, односно АПНС, НСТЕМИ и СТЕМИ), како и податоците од коронарната

ангиографија (КАБ – садовност, инфарктната т.е. “culprit“ артерија и општиот ангиографски наод).

Во однос на половата дистрибуција, во испитуваната група машкиот пол беше застапен со 75% наспроти женскиот пол со 25%, додека, пак, во контролната група застапеноста беше 77,50% наспроти 22,50% за машкиот, односно за женскиот пол соодветно. Разликите во полот помеѓу испитуваните групи не беа статистички сигнификантни ($p>0,05$).

Дистрибуцијата по возраст покажа дека просечната возраст кај испитуваната група изнесуваше $38,30 \pm 5,57$ години, додека, пак, кај контролната група беше $39,78 \pm 4,02$ години. Разликата во возраста помеѓу двете групи не беше статистички сигнификантна ($p>0,05$) што укажува на добра избалансираност на испитаниците помеѓу двете групи во однос на возраста.

Според местото на живеење, и во двете групи доминираа лица кои живеат во урбана средина (82,50% во испитувана група наспроти 70,00% во контролна група), а во селска средина живееле 17,50% во испитуваната наспроти 30,00%, во контролната група пациенти. И овие разлики не беа статистички значајни ($p>0,05$).

Во однос на историјата и интензитетот на пушење, пациентите од обете групи беа категоризирани во 4 подгрупи. Податоците говорат дека пациентите со над 20 испушени цигари на ден се многу позастапени кај испитуваната група (50,00%), отколку кај контролната група (30,00%). Од друга страна, непушачите беа почесто застапени кај контролната група (27,50%) во споредба со испитуваната група (10,00%). Разликите во пушачките навики меѓу подгрупите од двете групи пациенти беа статистички сигнификантни ($p<0,05$).

Просечната телесна висина во обете групи беше компарабилна, односно во испитуваната група изнесуваше $1,73 \pm 0,08$ m, а во контролната група $1,75 \pm 0,10$ m, при што разликите меѓу обете групи не беа статистички сигнификантни ($p>0,05$). Просечната телесна тежина, пак, кај испитуваната група изнесуваше $85,60 \pm 15,42$ kg, а кај контролната група $87,30 \pm 11,30$ kg при што исто така разликите меѓу обете групи не беа статистички сигнификантни ($p>0,05$). Индексот на телесна маса (BMI) беше речиси идентичен кај пациентите од обете групи, и тоа просечниот BMI $28,33 \pm 4,01$ kg/m² во испитуваната наспроти $28,49 \pm 4,06$ kg/m² во контролната група.

Анамнестичките податоци покажаа дека фамилијарна оптовареност за КАБ постои кај 37,50% од пациентите од испитуваната група, односно 20,00% кај пациентите од контролната група. Но, оваа разлика не беше статистички значајна ($p > 0,05$).

Во поглед на клиничките параметри (пулсот, систолниот крвен притисок, дијастолниот крвен притисок, LVEF), статистичката анализа потврди постоење на сигнификантна разлика ($p < 0,05$) само во поглед на LVEF при што левовентрикуларната истисна фракција беше значајно пониска кај испитуваната група (56,50%) во однос на контролната група (62,48%) што е и очекувано.

Клиничките податоци од коронарната ангиографија покажаа дека кај контролната група индикацијата за коронарна ангиографија беше исклучиво АПС, додека, пак, индикациите кај испитуваната група беа АПНС (5,00%), НСТЕМИ (17,50%) и СТЕМИ (77,50%). Понатаму, кај контролната група коронарографскиот наод беше уреден кај 37,50%, а без сигнификантни лезии кај 62,50% од пациентите. Кај пациентите од испитуваната група, коронарографскиот наод покажа постоење на сигнификантна КАБ кај сите испитаници ($n=40$). Едносадовна КАБ беше верифицирана кај 75,00%, двосадовна КАБ кај 10,00% и повеќесадовна КАБ кај 15,00% од пациентите од испитуваната група. Во поглед на инфарктната (“culprit”) артерија, левата предна десцендентна артерија (LAD) беше афектирана во 45,00%, десната коронарна артерија (RCA) кај 35,00%, потоа циркумфлексната артерија со нејзините гранки – оптуза маргиналис и интермедиерната гранка (Cx/OM/Ri) кај 12,50%, дијагоналната артерија (Diag) кај 5,00% и левото главно стебло (LM) кај 2,50% од пациентите од испитуваната група.

Од направената статистичка анализа и споредбата на селектираните лабораториски податоци помеѓу обете групи, резултатите покажаа дека статистички сигнификантна разлика ($p < 0,05$) помеѓу пациентите од обете групи постои за нивото на HDL-с, како и за нивото на hs-Tn I. Статистички сигнификантните разлики во делот за HDL-с помеѓу пациентите од обете групи одат во прилог на протективниот ефект на HDL-с за развојот на КАБ, додека, пак, статистички сигнификантно повисоките вредности на hs-Tn I кај испитуваната група се очекувани со оглед на високиот степен на некроза на миокардното ткиво кај оваа група пациенти. Разликите во останатите

истражувани лабораториски параметри помеѓу обете групи не беа статистички значајни ($p > 0,05$).

Генетските податоци во ова истражување ги опфаќаат дескриптивните резултати од генотипизацијата на трите испитувани полиморфизми, резултатите добиени од популациско-генетските анализи, како и резултатите добиени од генетско-асоцијативните анализи.

Генски полиморфизам -1607 1G/2G MMP-1 (rs1799750)

Дистрибуцијата на генотиповите на генскиот полиморфизам rs1799750 во генот на MMP-1 во нашата студија покажа дека хомозиготниот генотип 1G/1G е почесто застапен кај контролната (25,00%) отколку кај испитуваната група (7,50%), хетерозиготниот генотип 1G/2G има нешто повисока фреквенција кај контролната (42,50%) отколку кај испитуваната група (37,50%), додека, пак, хомозиготниот 2G/2G генотип е позастапен кај испитуваната (55,00%) наспроти контролната група (32,50%). Дистрибуцијата на генотиповите не покажа отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа и нема статистички сигнификантни разлики помеѓу опсервираните и очекуваните фреквенции ($p > 0,05$) ниту кај испитуваната, ниту кај контролната група. Генетско-асоцијативната анализа на генскиот полиморфизам rs1799750 MMP-1 покажа дека скоро кај сите применети генетски модели (со исклучок на хетерозиготниот и супердоминантниот) постојат статистички сигнификантни разлики во генотипските и алелните фреквенции помеѓу обете групи ($p < 0,05$). Притоа, резултатите од нашето истражување покажаа дека постои статистички сигнификантна асоцијација на полиморфизмот rs1799750 MMP-1 со сигнификантна КАБ кај млади лица од македонска популација и притоа носителите на генотипот 2G/2G, односно алелот 2G значајно го зголемуваат ризикот за развој на КАБ.

Достапните податоци од литературата покажуваат дека асоцираноста помеѓу MMP-1 генските полиморфизми и ризикот за КАБ е сè уште предмет на дебати, односно постојат дискордантни резултати од истражувањата во оваа област.

Така, во едно истражување спроведено врз над 200 ирански Турци со цел да се утврди асоцираноста помеѓу генските полиморфизми -1607 1G/2G MMP-1

(rs1799750) и -1612 5A/6A MMP-3 (rs3025058) и ризикот за КАБ е утврдено дека кај лицата постари од 50 години постои статистички сигнификантно повисока фреквенција на 2G алелите и 2G/2G генотипот на rs1799750 MMP-1 полиморфизмот во однос на здравите контроли ($p < 0,05$). Сепак, кај популацијата помлада од 50 години не била утврдена статистички сигнификантна разлика во фреквенцијата на овој генски полиморфизам помеѓу лицата со КАБ и здравите контроли [51].

Qintao C. и соработниците спровеле поголемо истражување на над 800 лица од кинеската Хан популација барајќи специфични маркери кои придонесуваат кон генетска суспендибилност кон КАБ. Имено, тие ја истражувале асоцираноста на вкупно 9 генски полиморфизми од MMP-1 генот (меѓу кои и rs1799750) со КАБ. Анализата на алелните и генотипските дистрибуции на овие полиморфизми помеѓу 438 здрави и 411 лица со КАБ открила слаба асоцираност помеѓу rs1799750 генотипската дистрибуција и КАБ ($p = 0,022$), но зголемениот ризик за КАБ бил сигнификантно асоциран со 2G алелите на rs1799750 ($p = 0,005$, OR=1,329, CI 1,090-1,620) [52].

Постои уште една слична студија врз кинеската Хан популација во која е испитувана асоцијацијата помеѓу MMP-1 генскиот полиморфизам и коегзистенцијата на ДМ тип 2 и КАБ. Во оваа студија учесниците се групирани во 2 групи, и тоа во првата – испитувана група се 378 пациенти со коегзистирачки ДМ тип 2 и КАБ, а во втората група се 416 здрави контроли. Кај обете групи се одредени и анализирани фреквенциите на 6 поединечни нуклеотидни полиморфизми (SNP) и тоа rs1799750, rs498186, rs996999, rs2071232, rs1938901 и rs2239008 на MMP-1 генот. Статистички сигнификантна разлика помеѓу обете групи е детектирана во поглед на rs1799750 MMP-1 генотиповите ($p = 0,041$) и тоа фреквенцијата на 2G/2G генотипот бил 44,2% кај испитуваната и 37% кај контролната група, соодветно. Исто така постоела и статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на алелните фреквенции (2G алелот) помеѓу испитуваната и контролната група (65,9% наспроти 59,6%, соодветно) при $p = 0,010$. Она што е уште поиндикативно во оваа студија е дека статистички сигнификантни разлики во дистрибуцијата на алелните и генотипските фреквенции помеѓу двете групи е констатирана само за полиморфизмот rs1799750, но не и за останатите 5 испитувани полиморфизми ($p > 0,05$). Следствено на досега кажаното, оваа студија заклучува дека rs1799750 MMP-1

генскиот полиморфизам може да биде асоцииран со коегзистирачки ДМ тип 2 и КАБ [53].

Во една студија на шпанска популација истражувана е асоцијацијата помеѓу MMP-1 генски полиморфизми и ран миокарден инфаркт. Притоа, биле испитувани алелните, генотипските и хаплотипските фреквенции на три MMP-1 генски полиморфизми (-1607 1G/2G, -519 A/G и -340 T/C) помеѓу 261 пациент со претходен миокарден инфаркт на возраст до 55 години како испитувана група и 194 здрави лица како контролна група, сите мажи и пушачи. Резултатите од оваа студија покажале дека фреквенциите на трите генски полиморфизми, земени поединечно, не се разликувале статистички сигнификантно помеѓу испитуваната и контролната група. Но, анализата на хаплотипските фреквенции утврдила статистички сигнификантна асоцираност на хаплотиповите 2G-1607-G-519-T-340 (OR = 2,40; 95% confidence interval = 1,27-4,55; $p < 0,006$) и 1G-1607-G-519-T-340 (OR = 0,68; 95% confidence interval = 0,50-0,94; $p < 0,05$) со ризикот за ран миокарден инфаркт. Она што може да се заклучи од оваа студија е дека одредени хаплотипови на MMP-1 генските полиморфизми се асоциирани со зголемен ризик за ран миокарден инфаркт кај млади пушачи од шпанско потекло [54].

Друга студија спроведена врз полска популација ја истражувала поврзаноста помеѓу генските полиморфизми за E-selectin, ICAM-1, OLR1, MMP-1 (1G/2G) и MMP-3 (-1612 5A/6A) и ризикот за миокарден инфаркт кај млади Полјаци на возраст до 45 години. Анализата на алелните фреквенции покажала дека само носителите на 2G MMP-1 алелот се разликуваат во фреквенција помеѓу испитуваните групи. Дополнително, резултатите од анализата за униваријантната и мултиваријантната логистичка регресија за 2G MMP-1 алелот потврдиле дека носителите на овој алел имаат за скоро 3,7 пати, односно за скоро 5,7 пати, соодветно, повисока веројатност за миокарден инфаркт во однос на останатите ризик-фактори (OR 3,6995, 95% CI 2,1026-6,5062, $p = 0,001$ и OR 5,6751, 95% CI 2,6035-12,3609, $p = 0,0001$, соодветно). Заклучокот од студијата е дека носителите на 2G алелот на MMP-1 имаат сигнификантно зголемен ризик за миокарден инфаркт кај полска популација [55].

Со слични резултати и заклучок е и студијата на Kondapalli MS и соработниците за евалуација на асоцијацијата помеѓу серумските циркулирачки новео на MMP-1 и -1607 1G/2G (rs1799750) полиморфизмот со ризикот за појава

на КАБ кај индиска популација. Овде е направена споредба помеѓу демографските карактеристики, серумските циркулирачки нивоа на MMP-1, како и алелните и генотипските фреквенции на -1607 1G/2G (rs1799750) MMP-1 полиморфизмот кај испитувана група од 300 лица со КАБ, група од 100 асимптоматски лица – роднини од прво колено на оние од групата со КАБ, како и контролна група со 300 здрави лица од иста географска локација. Резултатите од оваа студија покажале дека серумските циркулирачки нивоа на MMP-1 биле највисоки кај испитуваната група (групата со КАБ) и тоа во ранг $2,15 \pm 1,2$ ng/ml, потоа кај асимптоматските роднини од прво колено во ранг $1,46 \pm 1,04$ ng/ml, додека пак кај контролите во ранг $0,96 \pm 0,53$ ng/ml. Притоа, разликата во средните вредности на нивоата на MMP-1 кај трите групи била статистички сигнификантна при $p < 0,05$. Во поглед на дистрибуцијата на алелните и генотипските фреквенции на rs1799750 MMP-1 генскиот полиморфизам кај трите групи која била испитувана со различни генетски модели, се утврди дека фреквенцијата на 2G/2G генотипот е повисока кај сите три групи во споредба со 1G/1G и 1G/2G генотиповите. Додека, пак, фреквенцијата на 2G алелот била сигнификантно повисока кај групата со асимптоматски роднини од прво колено ($p < 0,05$). Оттука може да се заклучи дека во оваа студија -1607 1G/2G (rs1799750) MMP-1 генскиот полиморфизам го потенцира ризикот за КАБ кај индиска популација. Исто така, атеросклеротичните лезии кај лицата носители на 2G алелот имаат повисока MMP-1 експресија и е поверојатно да развијат вулнерабилна плака. Студијата понатаму сугерира користење на -1607 1G/2G (rs1799750) MMP-1 генскиот полиморфизам и серумските циркулаторни нивоа како независен прогностички маркер за идни кардиоваскуларни настани [56].

За разлика од претходно споменатата студија на Sakowicz A. и неговите соработници кај полска популација, постои уште една студија од Полска спроведена од страна на Pawlik A. која ја испитувала асоцијацијата помеѓу MMP-1-1607dupG (rs1799750) генскиот полиморфизам и MMP-3-1171dupA (rs3025058) генскиот полиморфизам со АКС, односно со АПНС чии резултати се спротивставени во однос на претходно споменатата. Имено, овде се истражувани и споредувани алелните и генотипските фреквенции на погореспомнатите генски полиморфизми кај испитувана група од 197 лица со АПНС и контролна група од 144 здрави контроли. Во поглед на MMP-1 генскиот полиморфизам не се регистрирани статистички сигнификантни

разлики во дистрибуцијата на алелните и генотипските фреквенции кај овој полиморфизам помеѓу испитуваната и контролната група ($p > 0,05$). Ова секако делува инконзистентно во споредба со серијата студии на позитивна асоцираност на -1607 1G/2G MMP-1 генскиот полиморфизам со КАБ [57].

Понатаму, Dalepiane VL и соработниците спровеле студија врз 183 бразилски лица од бела раса, испитувајќи ја поврзаноста на неколку различни генски полиморфизми на MMP (MMP-1, MMP-3 и MMP-12), меѓу кои и на -1607 1G/2G MMP-1 генскиот полиморфизам со КАБ преку споредба на алелните, генотипските и хаплотипските фреквенции на овие полиморфизми кај испитувана група (116 лица) и контролна група (67 лица). И оваа студија исто така покажала дека не постојат статистички сигнификантни разлики помеѓу двете групи во поглед на алелните и генотипските фреквенции на -1607 1G/2G MMP-1 генскиот полиморфизам со ризикот за КАБ ($p = 0,54$ и $p = 0,82$, соодветно) кај популација на бразилски белци. Ниту анализата на хаплотипските фреквенции не покажала статистички сигнификантна разлика помеѓу двете групи. Заклучокот од оваа студија бил дека испитуваните MMP генски полиморфизми немаат значајно влијание врз ризикот и тежината на КАБ [12].

Резултатите од нашето истражување се во иста линија со резултатите од претходно споменатите студии за постоење асоцираност на rs1799750 MMP-1 генскиот полиморфизам со КАБ, односно тие покажуваат јасно постоење на статистички значајна генетска асоцијација на овој полиморфизам со сигнификантна КАБ. Притоа, генотипскиот генетски модел од нашата студија потврди дека носителите на генотипот 2G/2G имаат за 5,641 пати поголема шанса за појава на КАБ, а носителите на генотипот 1G/2G за 2,941 пати поголема шанса за појава на КАБ во однос на оние со референтниот генотип 1G/1G ($p < 0,05$). Во поглед на алелната дистрибуција, според алелниот генетски модел, носителите на 2G-алелот имаат за 2,417 пати поголеми шанси за развој на КАБ во однос на носителите на алелот 1G ($p < 0,05$). Овие резултати се исто така потврдени и со Cochran-Armitage тестот кај адитивниот модел според кој ризикот за развој на КАБ расте правопрпорционално со присуството на 2G алели.

Генски полиморфизам C-1562T MMP-9 (rs3918242)

Споредбата на генотиповите на полиморфизмот C-1562T MMP-9 (rs3918242) помеѓу двете групи од нашето истражување покажа дека генотипот CC е значајно позастапен кај контролната (75,00%) наспроти испитуваната група (47,50%). Спротивно, хетерозиготниот CT генотип е скоро 2 пати позастапен кај испитуваната (47,50%) отколку кај контролната група (22,50%). Фреквенцијата на генотипот TT е сигнификантно повисока кај испитуваните (10,00%) наспроти контролните пациенти (2,50%). И кај овој полиморфизам популациско-генетските анализи не покажаа отстапување од Харди-Вajnберговата рамнотежа, односно нема статистички сигнификантни разлики помеѓу опсервираните и очекуваните фреквенции ($p > 0,05$) ниту кај испитуваната, ниту кај контролната група. Добиените резултати од генетско-асоцијативната анализа на rs3918242 MMP-9 генскиот полиморфизам идентификуваа постоење на статистички сигнификантна разлика ($p < 0,05$) во дистрибуцијата на генотиповите и алелите помеѓу двете групи со користење на повеќе генетски модели. Носителите на TT генотипот, како и носителите на T алелот кај нашата млада популација имаат статистички сигнификантно повисок ризик за развој на КАБ во споредба со носителите на CC генотипот, односно C алелот.

Слично како и за претходно споменатиот генски полиморфизам, и за полиморфизмот C-1562T MMP-9 (rs3918242) и неговата асоцираност со КАБ постојат бројни студии и систематски прегледи и мета-анализи, но, исто така, заклучоците од истражувањата се инконзистентни, а во некои случаи и спротивставени.

Така, Mahmoodi и сор. во својата студија ги испитувале асоцијацијата на C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам, генската експресија и циркулирачките нивоа на MMP-9 со ризикот за КАБ кај 100 лица со ангиографски потврдена КАБ (испитувана група) и 100 здрави лица (контролна група) од една иранска суппопулација. И покрај тоа што просечните плазма нивоа и нивоата на генска експресија на MMP-9 биле статистички сигнификантно повисоки кај носителите на T алели наспроти носителите на C алели, сепак, генотипските и алелните фреквенции на C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам биле слични помеѓу пациентите со КАБ и

здравите лица ($p > 0,05$). Дополнително, C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам не го зголемил ризикот за КАБ кај доминантниот и рецесивниот генетски модел ($p = 0,537$ и $p = 0,249$, соодветно) [58].

Во оваа смисла, особено заради сличната возрасна категорија на испитувана и контролна група со оние од нашето истражување, од интерес е да се спомене една проспективна, моноцентрична студија на случаи и контроли спроведена врз 100 млади лица на возраст од 18-50 години со СТЕМИ наспроти 100 здрави контроли од Индија. Кај овие 2 групи биле одредувани и споредувани серумските нивоа на MMP-3, MMP-9 и TIMP, како и евалуирани генетските полиморфизми на гените за MMP-3 (5A/6A-1612) и MMP-9 (C-1562T и R279Q). Сите пациенти биле следени во период од 1 година и биле одредувани мајорните несакани срцеви настани (major adverse cardiac events, MACE). Резултатите од истражувањето покажале дека серумските нивоа на MMP-3, MMP-9 и TIMP биле сигнификантно повисоки кај пациентите со СТЕМИ во споредба со здравите контроли ($p < 0,0001$) што укажува на нивното значење во патогенезата на СТЕМИ. Во однос на дистрибуцијата на генотипските фреквенци, не постоела статистички сигнификантна разлика во застапеноста на различните генотипови (CC, CT и TT) на C-1562T MMP-9 генскиот полиморфизам кај испитуваната и контролната група ($p = 0,509$). Униваријантната логистичка регресија открила дека меѓу останатите фактори, серумските нивоа на MMP-3 (OR=1,003), на MMP-9 (OR=1,017), како и AG генотипот на R279Q MMP-9 генскиот полиморфизам (OR=2,567) биле предиктори на СТЕМИ, но не и генотиповите на C-1562T MMP-9 генскиот полиморфизам. И моделот на мултиваријантната регресија исто така не ги детектирала генотиповите на C-1562T MMP-9 генскиот полиморфизам како независни предиктори за СТЕМИ. Пациентите со MACE имале сигнификантно повисоки серумски нивоа на MMP-9. Сепак, во поглед на генотипската дистрибуција, не постоела статистички сигнификантна разлика во застапеноста на генотиповите на C-1562T MMP-9 генскиот полиморфизам помеѓу групата со СТЕМИ и здравите контроли [59].

Друга клиничка студија која нуди слични резултати и заклучоци е студијата на Kucuk M.A. и соработници каде се испитувани и независните и синергистичните ефекти на C-1562T MMP-9 и метилентетрахидрофолат редуктаза C677T (MTHFR) генските полиморфизми врз појавата на КАБ.

Студијата е спроведена врз 109 пациенти со потврдена КАБ и 108 здрави контроли, инаку Турци со потекло од југоисточниот регион на Анадолија. Анализата на генотипските фреквенции на генските полиморфизми кај обете групи открила дека ТТ генотипот воопшто не е присутен кај двете групи (0%), додека пак застапеноста на останатите генотипови помеѓу двете групи била компарабилна (СС генотип 76,1% и СТ генотип 23,9% кај пациентите со КАБ наспроти СС генотип 76,8% и СТ генотип 23,2% кај здравите контроли, соодветно) при што не е детектирана статистички сигнификантна разлика помеѓу фреквенциите на испитуваните генотипови на С-1562Т ММР-9 генскиот полиморфизам кај обете групи ($p = 0,222$). Во поглед на анализата на алелните фреквенции, застапеноста кај обете групи била исто така компарабилна и тоа Т алелот бил застапен кај 11,9% од пациентите со КАБ и кај 11,6% од здравите контроли, додека пак С алелот бил застапен кај 88,1% од пациентите со КАБ, односно кај 88,6% од здравите контроли. Притоа, не постоела статистички сигнификантна разлика помеѓу застапеноста на генските алели Т и С помеѓу двете групи ($p = 0,581$). Во продолжение, ниту анализата на хаплотиповите на С-1562Т ММР-9 и С677Т МТНFR генските полиморфизми не покажала статистички сигнификантна разлика помеѓу обете групи ($p > 0,05$). Авторите на крај заклучиле дека не постои асоцираност помеѓу С-1562Т ММР-9 и С677Т МТНFR генските полиморфизми од една страна и КАБ од друга страна ниту независно, ниту синергистички, како и дека С алелот и СС генотипот се преобладаваат кај обата полиморфизми во турска популација од регионот на Југоисточна Анадолија [60].

Слични заклучоци произлегуваат и од една мета-анализа на Zhang и сор. од 2014 година која била спроведена на 26 студии со вкупно 12776 случаи и 6371 контрола. Во оваа мета-анализа била, исто така, истражувана асоцираноста помеѓу С-1562Т полиморфизмот и ризикот за КАБ. Овде и покрај тоа што во заклучокот е изнесено дека генскиот полиморфизам С-1562Т (rs3918242) ММР-9 може да има асоцираност со ризикот за КАБ кај азиска популација, сепак, резултатите од мета-анализата сугерираат дека овој полиморфизам не придонел за ризикот од КАБ во вкупните резултати [61].

Наспроти тоа, резултатите од друга мета-анализа објавена во 2016 година која исто така го испитувала С-1562Т (rs3918242) ММР-9 генскиот полиморфизам и КАБ кај 5468 лица од кинеската Хан популација се спротивни.

Тука комбинираната статистичка анализа покажала сигнификантна асоцираност помеѓу C-1562T (rs3918242) MMP-9 генскиот полиморфизам и КАБ според алелниот (OR=1,60; 95% CI: 1,25–2,04; p=0,0002), рецесивниот (OR=3,05; 95% CI: 1,67–5,56; p=0,0003), доминантниот (OR=2,23; 95% CI: 1,49–3,35; p=0,0001), хомозиготниот (OR=3,41; 95% CI: 1,87–6,23; p<0,0001), хетерозиготниот (OR=2,03; 95% CI: 1,40–2,93; p=0,0002) и адитивниот генетски модел (OR=1,78; 95% CI: 1,33–2,39; p<0,0001). Заклучокот од мета-анализата потврдува дека C-1562T (rs3918242) MMP-9 генскиот полиморфизам може да биде асоциран со зголемена суспенцибилност кон КАБ кај кинеската Хан популација [62].

Rodriguez-Peres и соработниците ја истражувале асоцираноста на 3 генски полиморфизми меѓу кои и C-1562T (rs3918242) MMP-9 со ризикот за развој на миокарден инфаркт кај мексиканска популација. Истражувањето било спроведено на испитувана група од 236 лица со претходен миокарден инфаркт и 285 здрави контроли. Анализата на дистрибуцијата на алелните и генотипските фреквенции покажала дека T алелот и CT генотипот биле асоцирани со зголемен ризик за миокарден инфаркт (OR 2,32; pC=0,02 и OR=2,40; pC=0,02, соодветно). Помеѓу обете групи била направена мултиваријантна логистичка регресиона анализа за проценка на ризикот и после прилагодување за идентификуваните ризик-фактори било докажано дека CT+TT генотиповите се сигнификантно асоцирани со зголемен ризик за појава на миокарден инфаркт за разлика од CC генотипот (OR=2,88; p<0,01). Заклучокот од студијата бил дека генскиот полиморфизам C-1562T (rs3918242) MMP-9 игра главна улога во ризикот за развој на миокарден инфаркт кај мексиканска популација [63].

Во овој контекст особено вреди да се проанализира еден систематски преглед и мета-анализа на вкупно 51 студија вклучени во квантитативна синтеза на асоцираноста на четири MMP-9 генски полиморфизми и тоа MMP-9 (C-1562T), MMP-9 (R279Q), MMP-9 (P574R) и MMP-9 (R668Q) со суспенцибилноста за КАБ објавена во 2020 година. Доминантниот број студии (40) кои биле опфатени со оваа мета-анализа се однесувале на C-1562T генскиот полиморфизам на MMP-9 и тоа на 11792 случаи и 8280 контроли. Од овие 40 студии, 26 биле изведени во азиски земји, 10 во европски земји, 2 во афрички земји, 1 во Америка и 1 во Океанија. Оваа мета-анализа наспроти претходно споменатата мета-анализа на Zhang и сор. [59] открила силно позитивна

асоцијација помеѓу C-1562T (rs3918242) MMP-9 генскиот полиморфизам и ризикот за КАБ и го детерминирала овој SNP како ризик фактор за КАБ. Притоа, сите генетски модели покажале постоење на статистички сигнификантна разлика во генотипските фреквенции помеѓу случаите и контролите и тоа кај доминантниот модел (OR = 1,41, 95% CI = 1,23–1,61, $p < 0,001$), рецесивниот модел (OR = 1,59, 95% CI = 1,29–1,96, $p < 0,001$), алелниот модел (OR = 1,38, 95% CI = 1,23–1,55, $p < 0,001$), TT наспроти CC модел (OR = 1,70, 95% CI = 1,35–2,13, $p < 0,001$), и CT наспроти CC модел (OR = 1,35, 95% CI = 1,18–1,54, $p < 0,001$). Анализата на подгрупи според етничка припадност, пак, покажала дека C-1562T MMP-9 генскиот полиморфизам (rs3918242) статистички сигнификантно ја зголемува суспенцибилноста за КАБ во Азија и тоа кај сите генотипски модели (доминантен модел: OR = 1,47, 95% CI = 1,25–1,74, $p < 0,001$; рецесивен модел: OR = 2,06, 95% CI = 1,57–2,71, $p < 0,001$; алелен модел: OR = 1,45, 95% CI = 1,26–1,67, $p < 0,001$; TT наспроти CC модел: OR = 2,42, 95% CI = 1,77–3,32, $p < 0,001$; и CT наспроти CC модел: OR = 1,39, 95% CI = 1,19–1,64, $p < 0,001$). За разлика од Азијците, кај Европејците не била забележана статистички сигнификантна разлика. Анализа била направена и во однос на типот на КАБ (АКС и АПС). Добиените резултати покажале статистички сигнификантна асоцираност помеѓу C-1562T MMP-9 полиморфизмот и суспенцибилноста за АПС кај сите генотипски модели, додека, пак, суспенцибилноста за АКС била детектирана кај доминантниот модел (OR = 1,66, 95% CI = 1,32–2,10, $p < 0,001$, random effects model), алелниот модел (OR = 1,57, 95% CI = 1,29–1,92, $p < 0,001$, random effects model) и CT наспроти CC моделот (OR = 1,62, 95% CI = 1,28–2,04, $p < 0,001$, random effects model), но не и кај рецесивниот модел ($p = 0,12$) и TT наспроти CC моделот ($p = 0,06$). На крај, авторите на овој систематски преглед и мета-анализа заклучиле дека од вкупно 4 испитувани генски полиморфизми на MMP-9, само C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам статистички сигнификантно ја зголемил суспенцибилноста за КАБ и тоа кај азиска популација, додека пак останатите три полиморфизми не биле асоцирани со ризик за болест веројатно поради малата величина на примерокот [14].

C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам бил истражуван исто така и во една студија на 498 Ирци, инаку припадници на белата раса, со дијабет и кардиоваскуларни ризик фактори, но без симптоматска срцева слабост

од програмата за следење STOP-HF. Примарната цел на студијата била да се утврди асоцираност помеѓу rs3918242 генскиот полиморфизам и хипертензија и/или миокарден инфаркт. Резултатите покажале дека минорниот T алел бил асоциран со сигнификантно повисока почетна преваленца на миокарден инфаркт, но не и со хипертензија кај популацијата со дијабет. Логистичката регресија, пак, покажала дека носителите на CT/TT генотипот имале за нешто повеќе од 2 пати повисока веројатност (17,9% наспроти 8,4%) за миокарден инфаркт во споредба со носителите на CC генотипот (OR=2,37; $p=0,002$). Овој однос бил исто така сигнификантен и во прилагодените анализи (OR=2,02; $p=0,018$), додека, пак, не била утврдена било каква асоцираност помеѓу генотипот и ризикот за хипертензија (OR=0,94; $p=0,77$). Истражувачите на крајот го изнесуваат заклучокот дека пациентите со дијабет од програмата за следење STOP-HF кои се носители на минорниот T алел од rs3918242 имаат поголема преваленца на миокарден инфаркт, додека, пак, редуцираната истисна фракција е пониска после прележан миокарден инфаркт кај пациентите носители на CT/TT генотипот [64].

Во една скорешна студија спроведена од страна на Iqbal и соработници било испитувано дали постои некаков однос помеѓу 2 генски полиморфизми (rs17576 и rs3918242) и развојот на миокарден инфаркт како и асоцираноста на ризик-фактори вклучувајќи пушење, хипертензија и дијабет со појавата на миокарден инфаркт и нивна поврзаност со одредени фамилии од Пакистан. Биле одредени и анализирани генотипските и алелните фреквенции на вкупно 38 лица (заболени и здрави) од 5 фамилии на возраст од 5 до 75 години. Статистичката анализа на генотипските фреквенции идентификувала CT и TT генотипови на rs3918242 генскиот полиморфизам кај заболените лица, додека пак кај сите здрави лица бил идентификуван дивниот хомозиготен CC генотип. Во поглед на дистрибуцијата на алелните фреквенции било пронајдено дека T алелот покажува сигнификантна асоцираност ($p<0,05$) на rs3918242 генскиот полиморфизам со миокарден инфаркт бидејќи неговата фреквенција е значително повисока кај заболените во споредба со здравите лица [65].

Постои уште една помала мета-анализа која вклучила 10 студии со вкупно 3087 пациенти со прележан миокарден инфаркт и 5019 здрави контроли која ја анализирала асоцираноста помеѓу rs3918242 (MMP-9) генскиот полиморфизам и суспенцибилност кон миокарден инфаркт користејќи различни

генетски модели. Суспенцибилноста кон миокарден инфаркт била сигнификантно пониска кај носителите на СС генотипот во споредба со носителите на СТ и ТТ генотипот на rs3918242 (MMP-9) генскиот полиморфизам (OR = 1,49; 95%CI = 1,19–1,86; p = 0,0004). Исто така, носителите на ТТ генотипот имале повисока суспенцибилност кон миокарден инфаркт отколку носителите на СТ и СС генотипот (OR = 1,54; 95%CI = 1,08–2,20; p = 0,02). Во рамките на субгрупната анализа според етничка припадност, сигнификантна асоцираност помеѓу rs3918242 (MMP-9) генскиот полиморфизам и суспенцибилност кон миокарден инфаркт кај азиска популација била детектирана кај доминантниот (OR = 1,61; 95%CI = 1,26–2,06; p = 0,0001), рецесивниот (OR = 3,34; 95%CI = 1,29–8,67, p = 0,01), супердоминантниот (OR = 1,50; 95%CI = 1,16–1,92; p = 0,002) и алелниот генетски модел (OR = 1,58; 95%CI = 1,26–1,99; p < 0,0001). Што се однесува до популацијата од белата раса, таква асоцираност била идентификувана кај доминантниот (OR = 1,20; 95%CI = 1,06–1,36, p = 0,003), супердоминантниот (OR = 1,17; 95%CI = 1,03–1,33; p = 0,01) и алелниот генетски модел (OR = 1,55; 95%CI = 1,07–2,24; p = 0,02). Авторите на оваа мета-анализа на крај заклучуваат дека rs3918242 (MMP-9) генскиот полиморфизам е потенцијално релевантен за суспенцибилност кон миокарден инфаркт [66].

Од досега изнесеното може да се заклучи дека постојат некои студии и мета-анализи каде резултатите од истражувањата покажуваат дека нема статистички сигнификантна разлика во застапеноста на генотипските и алелните фреквенции на C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам помеѓу испитуваната и контролната група, односно дека истражуваниот генски полиморфизам не е асоциран со КАБ (т.н. „негативни“ студии). Од друга страна, пак, повеќето студии и мета-анализи го тврдат спротивното, дека токму овој генски полиморфизам е асоциран со КАБ кај одредена популација, често пати со припадност кон специфична етничка заедница (т.н. „позитивни“ студии), односно дека постојат статистички сигнификантни разлики во дистрибуцијата на генотипските и алелните фреквенции на овој полиморфизам помеѓу испитуваната и контролната група и тоа придонесува за постоење асоцираност на C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам со КАБ. Евидентно е дека, генерално земено, сигнификантна асоцираност на овој генски полиморфизам со КАБ постои кај азиската популација, додека, пак, кај

популациите од бела раса или Европејци доста почесто асоцираноста или не постои или не е статистички сигнификантна.

Компаративно гледано, резултатите од нашето истражување се совпаѓаат со резултатите од т.н. „позитивни“ студии и мета-анализи каде е утврдена асоцираност на C-1562T MMP-9 (rs3918242) генскиот полиморфизам со КАБ кај популации со одредена етничка припадност при што кај нашата испитувана млада популација од Македонија носителите на генотиповите СТ и ТТ имаат повисока веројатност за појава на КАБ (2,982 пати и 6,316 пати, соодветно) во однос на хомозиготниот референтен генотип СС. Во поглед на резултатите од анализата на дистрибуцијата на алелните фреквенци во обете групи пациенти од нашето истражување, јасно се гледа дека носителите на Т алелот имаат 2,851 пати поголема веројатност за КАБ во споредба со носителите на неваријантниот С алел, а тоа е потврдено и со адитивниот генетски модел. Уште посилна поврзаност на Т алелот со веројатноста за развој на КАБ во нашето истражување е утврдена со Cochran-Armitage ординалниот тест каде веројатноста за појава на КАБ расте правопрпорционално со бројот на застапени Т алели во генотипот на испитаниците ($p < 0,05$).

Генски полиморфизам T-786C eNOS (rs2070744)

Азотниот моноксид или поточно азот (II) оксидот (NO) претставува важен молекул којшто е инволвиран во многу физиолошки процеси во човечкото тело. Тој потекнува од L-аргинин со медијација на неколку изоформи на азотен оксид синтетаза (NOS) вклучувајќи го ендотелниот NOS (eNOS). Главните ефекти на NO се вазопротективни и вклучуваат вазодилатација (релаксација на васкуларниот тонус), инхибиција на тромбоцитната и леукоцитната адхезија за ендотелните клетки, како и инхибиција на пролиферацијата на мазните мускулни клетки. NO има исто така заштитна улога од атеросклероза и супероксидни радикали. Продукцијата на NO е регулирана од неколку NOS генски полиморфизми. Низ литературата постојат неколку анализирани NOS генски полиморфизми меѓу кои и T-786C (rs2070744). Тој се однесува на замена на тиминот со цитозин во нуклеотидот 786, генетска варијанта која ја редуцира активноста на промоторот за околу 50% и притоа сигнификантно го зголемува ризикот за појава на КАБ [37, 67, 68].

Нашето истражување за асоцираноста на генскиот полиморфизам T-786C eNOS (rs2070744) кај помлада македонска популација детектираше повисока фреквенца на генотипот TT кај контролната (67,50%) отколку кај испитуваната група пациенти (40,00%). Генотипот TC беше речиси двојно позастапен кај испитуваната (47,50%) во споредба со контролната група (27,50%). Фреквенцата на варијантниот генотип CC, пак, беше значително повисока кај испитуваната (12,50%) отколку кај контролната група пациенти (5,00%). И овде популациско-генетските анализи не покажаа отстапување од Харди-Вајнберговата рамнотежа и, според тоа, нема статистички сигнификантни разлики ($p > 0,05$) помеѓу опсервираните и очекуваните фреквенци ниту кај испитуваната, ниту кај контролната група. Генетско-асоцијативната анализа, пак, со користење на повеќе генетски модели потврди дека во нашата популација постои статистички сигнификантна генетска асоцираност на полиморфизмот T-786C eNOS (rs2070744) со развојот на сигнификантна КАБ кај помлада македонска популација при што носителите на генотипот CC, како и носителите на C алелот значајно го зголемуваат ризикот за развој на болеста.

Достапните податоци од литературата говорат дека доказите за улогата на T-786C eNOS (rs2070744) генскиот полиморфизам и суспенцибилноста кон КАБ, особено во поглед на етничката припадност на испитуваните популации, се во одредена мера контрадикторни.

Една студија на случаи и контроли спроведена врз популација од Алжир ја испитувала врската помеѓу eNOS генските полиморфизми и ризикот за миокарден инфаркт вклучувајќи ги T-786C eNOS и G894T eNOS генските полиморфизми. Испитуваната група се состоела од 68 лица со претходно прележан миокарден инфаркт, додека, пак, контролната група се состоела од 68 здрави контроли. Биле одредени дистрибуциите на генотипските и хаплотипските фреквенци кај обете групи и била спроведена статистичка анализа на добиените резултати. Анализата на дистрибуциите на генотипските фреквенции открила дека генотипските дистрибуции на T-786C eNOS генскиот полиморфизам не се разликуваат сигнификантно помеѓу случаите и контролите. Ризикот за миокарден инфаркт асоциран со овој полиморфизам не постигнал статистичка сигнификантност ($p = 0,359$). Но, анализата на хаплотипската дистрибуција на обата генски полиморфизми кај испитуваната и контролната група покажале дека само еден хаплотип и тоа -786C/894G бил значајно

позастапен кај испитуваната група пришто веројатноста за појава на миокарден инфаркт била за 2,2 пати повисока кај носителите на овој хаплотип ($OR = 2,2$; $p = 0,038$) [69].

Во иста насока се и резултатите од една друга студија на случаи и контроли направена врз 80 пациенти со докажана КАБ и 40 здрави контроли од Египет. Во оваа студија била испитувана асоцијацијата на два eNOS генски полиморфизми (T-786C и G894T) со суспенцибилност за КАБ пришто биле одредени и компарирани генотипските и алелните фреквенции на овие полиморфизми кај обете групи (испитувана и контролна). Резултатите од компарацијата на дистрибуциите на генотипските и алелните фреквенции за T-786C eNOS генскиот полиморфизам покажале дека не постои статистички сигнификантна разлика помеѓу испитуваната и контролната група ($p = 0,23$ и $p = 0,21$, соодветно). Следствено, заклучокот од студијата бил дека испитуваните генски полиморфизми на eNOS не се статистички значајно асоцирани со појавата на КАБ кај испитувана популација од Египет, односно дека овие полиморфизми не се независен предиспонирачки ризик-фактор за КАБ кај египетска популација [70].

Компаративни резултати се добиени и од студијата на Nassar и соработници кои испитувале неколку генетски фактори за развој на КАБ кај 300 пациенти со КАБ и 150 здрави контроли од Канада меѓу кои и T-786C eNOS генскиот полиморфизам. И во оваа студија исто така не била детектирана статистички сигнификантна разлика во преваленцата на генотиповите од eNOS генскиот полиморфизам помеѓу групите ($p = 0,72$) [71].

Слични заклучоци може да се добијат и од една поголема студија на случаи и контроли (573 лица со потврдена КАБ наспроти 624 здрави контроли) од Западна Австралија каде биле истражувани и споредувани генотипските и алелните фреквенции на три генски полиморфизми на eNOS (4a, G894T и T-786C). Не е идентификувана било каква поврзаност помеѓу генотипските и алелните фреквенции од една страна и ризикот за КАБ од друга страна при компарација на случаите и контролите. Исто така, не постоеле статистички сигнификантни разлики во генотипските и алелните фреквенции за било кој полиморфизам во рамките на подгрупите на КАБ; помеѓу мажите и жените, непушачите, поранешните пушачи и актуелните пушачи, како и помеѓу оние со или без дијабет или хипертензија. Исто така, не биле детектирани статистички

значајни разлики помеѓу било која од овие подгрупи во рамките на контролната група. Со други зборови, оваа студија не пронашла доказ дека испитуваните eNOS генски полиморфизми се асоцирани со прематурна КАБ или миокарден инфаркт кај австралиска популација од белата раса [72].

Спротивно, пак, на сознанијата од претходно споменатите студии се заклучоците од серија други студии кои откриле асоцираност на овој eNOS генски полиморфизам со развојот на КАБ.

Така, една група истражувачи предводени од Bhutani го истражувала T-786C eNOS полиморфизмот и неговата асоцираност со КАБ, како и нивото на NO и инсулинска резистенција кај индиска популација. Она што е особено интересно во оваа студија е дека во поглед на дистрибуцијата на генотипските фреквенции, ниту кај испитаниците со КАБ, ниту кај здравите контроли не е детектиран CC генотипот. Сепак, постоела разлика во дистрибуцијата на генотиповите TT и TC во обете групи при што детектираната разлика била статистички значајна ($p = 0,0123$) [73].

Понатаму, Jaishankar и соработниците го истражувале влијанието на T-786C и G894T eNOS полиморфизмите врз развојот на КАБ кај млада популација на возраст од 30-45 години од Индија. Биле вклучени вкупно 182 учесника од кои 91 со потврдена КАБ и 91 здрави контроли. Резултатите од анализата на eNOS генските полиморфизми покажала сигнификантна разлика помеѓу групата со КАБ и контролните субјекти што се должело на присуството на TC генотипот ($p = 0,017$), CC генотипот ($p = 0,011$) и C алелот ($p = 0,001$). Притоа, T-786C eNOS генскиот полиморфизам сигнификантно ја зголемил веројатноста за појава на КАБ за 2,47 (носители на TC генотип), односно за 2,92 пати (носители на CC генотип) во споредба со носителите на TT генотипот. Ризикот за појава на КАБ бил повисок кај носителите на C алелите во споредба со носителите на T алелите. Притоа, дистрибуцијата на генотипските фреквенции на T-786C eNOS генскиот полиморфизам статистички сигнификантно се разликувала помеѓу групата со КАБ и контролната група ($p = 0,001$) [68].

Истите генски полиморфизми, T-786C и G894T на генот за eNOS, се испитувани и од страна на група истражувачи кај популација од Турција. Имено, кај 89 пациенти со потврдена КАБ и 86 здрави контроли се испитувани и меѓусебно споредувани генотипските и алелните фреквенции на T-786C и G894T eNOS генските полиморфизми. Шансата за појава на КАБ која е

детерминирана од генотипот и алелот кај групата со КАБ и здравите контроли била анализирана со бинарна логистичка регресиона анализа. Земајќи го ТТ генотипот како референтен, било утврдено дека носителите на ТС генотипот имаат 2,1 пати, носителите на СС генотипот 2,842 пати, а носителите на ТС+СС генотипот 2,265 пати поголема шанса за појава на КАБ. Оваа разлика помеѓу групата со КАБ и здравите контроли била статистички сигнификантна ($p = 0,026$, $p = 0,04$ и $p = 0,008$, соодветно за секој генотип). Понатаму, анализата и компарацијата на дистрибуцијата на алелите помеѓу обете групи, исто така, потврдила дека носителите на С алелот имаат за скоро 2 пати повисока шанса за развој на КАБ во споредба со носителите на Т алелот при постоење статистичка сигнификантност $p = 0,005$. Од друга страна, не е идентификувана статистички сигнификантна разлика помеѓу ТТ, ТС и СС генотиповите на T-786C eNOS генскиот полиморфизам и бројот на засегнати коронарни артерии со опструктивна КАБ ($p = 0,110$). Истражувачите во оваа студија дури сугерираат евалуација на T-786S eNOS полиморфизмот како можен ризик-фактор за КАБ. Заклучоците од оваа студија се конзистентни со оние од претходната, а исто така и со резултатите од нашата студија, а тоа е дека носителите на генотипот СС и носителите на С алелот на T-786C eNOS генскиот полиморфизам имаат значајно повисока веројатност за појава на КАБ и таа веројатност е статистички значајна за испитуваната популација ($p < 0,05$) [74].

Постои уште една студија изведена врз популација од Турција којашто конкретно го истражува T-786C eNOS генскиот полиморфизам од интерес и неговата асоцираност со КАБ кај турска популација. Станува збор, исто така, за студија на случаи и контроли каде што за да се утврдат независните ризик-фактори за КАБ е применета мултиваријантна логистичка регресија. Споредбата на резултатите од дистрибуцијата на генотиповите покажала дека носителите на генотипови со барем еден С алел (ТС+СС) се попревалентни кај пациентите со КАБ во споредба со носителите на хомозиготниот ТТ генотип. Понатаму, во поглед на алелната дистрибуција (Т наспроти С, адитивен модел) помеѓу пациентите со КАБ и здравите контроли, исто така, е детектирана статистички сигнификантна асоцираност помеѓу КАБ и С алелот ($p < 0,05$). С-доминантните индивидуи (генотип СС+ТС) имале 2,9 пати повисока веројатност да страдаат од КАБ ($OR=2,902$; $CI: 1,272 - 6,622$; $p < 0,05$). Оттука произлегува и заклучокот

дека T-786C eNOS генскиот полиморфизам може да биде ризик-фактор за КАБ кај турска популација [75].

Генскиот полиморфизам T-786C eNOS и неговата асоцираност со КАБ е истражувана и врз популација од Саудиска Арабија од страна на Alkharfy и соработниците. Станува збор за студија на 142 пациенти со утврдена КАБ наспроти 145 здрави лица кај кои се истражувани и споредувани T-786C и G894T eNOS генските полиморфизми. Компарирајќи ги дистрибуциите на генотипските фреквенции помеѓу испитуваната и контролната група, авторите констатираат дека носителите на TC и CC генотиповите од T-786C eNOS генскиот полиморфизам се статистички сигнификантно ($p < 0,001$) позастапени кај пациентите со КАБ (50% и 32%, соодветно) наспроти здравите лица (34,5% и 22,5%, соодветно). Со ова, студијата ја потврдила независната асоцијација на обата генски полиморфизми (вклучително и на T-786C) на генот за eNOS со КАБ кај популација од Саудиска Арабија [76].

Од интерес за нашето истражување претставува и студијата GENICA (Genetic and Environmental factors In Coronary Atherosclerosis), студија на над 1000 субјекти која исто така го испитувала T-786C генскиот полиморфизам на генот eNOS, меѓутоа кај популација од Италија. Групата со КАБ опфатила 749 пациенти наспроти контролната група со 449 здрави лица при што генотиповите на eNOS генскиот полиморфизам биле детерминирани кај вкупно 1106 лица. Биле одредени, споредени и анализирани клиничките, демографските, и ангиографските податоци, како и дистрибуцијата на генотипските фреквенции на испитуваниот T-786C eNOS генски полиморфизам кај испитуваната и контролната група. Во споредба со хомозиготниот TT генотип, носителите на C алелот имале за 1,672 пати повисока веројатност за постоење на дво- или тросадовна КАБ со статистичка сигнификантност $p = 0,002$. Мултиваријантната логистичка регресиона анализа покажала дека T-786C генскиот полиморфизам има сигнификантна предиктивна вредност за КАБ независно од останатите ризик-фактори. Авторите на крај заклучуваат дека C алелот на T-786C eNOS генскиот полиморфизам е асоциран со повисок ризик за повеќесадовна КАБ кај припадници на белата раса [77].

Посебно значење во поглед на потврда на асоцираноста на T-786C eNOS генскиот полиморфизам и ризикот за КАБ имаат три систематски прегледи и мета-анализи. Првиот систематски преглед и мета-анализа е направен од страна

на Liu Dan и соработниците опфаќајќи 24 студии на над 6000 пациенти со КАБ и над 9000 здрави контроли. Комбинираните резултати од статистичката анализа покажале сигнификантна позитивна асоцираност помеѓу T-786C eNOS полиморфизмот и ризикот за КАБ и тоа во повеќето генетски модели: во доминантниот (OR = 1,45, 95% CI = 1,27–1,65), рецесивниот (OR = 1,37, 95% CI = 1,20–1,56), хомозиготниот (OR = 1,64, 95% CI = 1,31–2,04), хетерозиготниот (TC vs. TT, OR = 1,39, 95% CI = 1,23–1,57; CC vs. TC, OR = 1,20, 95% CI = 1,04–1,37) и алелниот модел (OR = 1,35, 95% CI = 1,21–1,50). Субгрупната анализа, пак, базирана на етничката припадност на популациите (припадници на белата раса, Азијци и останати), покажала инконзистентни резултати кај различните етнички групи. Имено, статистички сигнификантни разлики во сите генетски модели постоеле кај припадниците на белата раса, додека, пак, слична асоцираност имало и кај Азијците со исклучок на хетерозиготниот модел (CC наспроти TC). Кај останатите популации асоцираност постоела само во некои генетски модели (доминантен, хетерозиготен и алелен). Според резултатите од мета-анализата, C алелот на T-786C eNOS генскиот полиморфизам би можел да го зголеми ризикот за за КАБ во споредба со T алелот, што е во согласност со резултатите и заклучоците од претходно споменатите студии, но исто така и со нашето истражување врз македонска популација. И овде авторите ја реафирмираат можноста T-786C eNOS полиморфизмот да биде ран маркер за евалуација на ризикот за КАБ [78].

Другиот систематски преглед, односно обновена мета-анализа е поголема и опфаќа 132 поединечни студии со вкупен број на 69235 учесници групирани во вкупно 5 различни групи според предоминантната припадност на нивните предци: европска, средно-источна, азиска, азиско-индиска и афричка. Вклучени се учесници со потврдена КАБ, миокарден инфаркт или АКС, како и здрави контроли без било какви директни докази за постоење болест, додека, пак, генетско-асоцијативните студии вклучиле 3 eNOS полиморфизми: Glu298Asp, T-786C и 4b/a. Мета-анализата за T-786C eNOS генскиот полиморфизам опфатила вкупно 29 студии на случаи и контроли со 7043 пациенти со КАБ и 10409 контроли, истражувајќи ја асоцираноста помеѓу T-786C полиморфизмот и КАБ. Во рамките на здружената анализа, низ сите испитувани генетски модели (доминантен, рецесивен и алелен) била видена умерена хетерогеност (I^2 ранг=35–69%, P_Q ранг=0,03 до <0,00001). Сите

применети генетски модели исто така покажале сигнификантна асоцираност со КАБ со веројатносен однос (OR) во рангот од 1,34 до 1,42, Z-вредност во рангот 4,97-5,32 и $p < 0,00001$. Субгрупната анализа според потеклото односно припадноста на предците покажала дека сите подгрупи на предци имале сигнификантна асоцираност во доминантниот модел, како и во алелниот модел (со исклучок на азиско-индиската). Од друга страна, само европската и азиската група покажале сигнификантна асоцираност во рецесивниот модел. Ако се занемари афричката група (која била застапена само со 1 студија), Азијците покажале највисок степен на асоцираност и тоа во сите три генетски модели (OR во рангот 1,61–1,90, Z-вредност во рангот 2,50–3,56 и p -вредност во рангот 0,01–0,0004), следени од Европејците (OR во рангот 1,21–1,32, Z-вредност во рангот 2,19–3,96 и p -вредност во рангот од 0,03 до $< 0,0001$). Причината зошто постои различен степен на асоцираност помеѓу споменатите групи според потеклото и КАБ останува нејасна [37].

Третиот систематски преглед и мета-анализа опфаќа 132 студии на случаи и контроли во кои била истражувана асоцираноста на повеќе генетски полиморфизми на eNOS со ризикот за КАБ. Од сите испитувани полиморфизми, сигнификантна асоцираност со ризикот за КАБ била детектирана за пет полиморфизми и тоа rs891512, rs1799983, rs2070744, rs11771443 и rs869109213. Здружената анализа за утврдување асоцираност помеѓу rs2070744 (T-786C) генскиот полиморфизам и ризикот за КАБ идентификувала сигнификантна асоцираност во сите генетски модели и тоа во доминантниот ($p < 0,0001$, OR = 0,71, 95% CI 0,62–0,81), во рецесивниот модел ($p = 0,0007$, OR = 1,37, 95% CI 1,14–1,64), во адитивниот модел ($p < 0,0001$, OR = 1,23, 95% CI 1,11–1,37) и во алелниот модел ($p < 0,0001$, OR = 0,77, 95% CI 0,70–0,85). Анализата на подгрупите според етничка припадност открила дека полиморфизмите rs1799983 и rs2070744 имаат сигнификантна корелација со ризикот за КАБ кај припадниците на белата раса и Азијците. Исти така, со стратификација на податоците базирана на типот на болест, авторите откриле дека rs2070744 (како и уште 2 други полиморфизми) биле сигнификантно асоцирани со ризикот за миокарден инфаркт или АКС во одредени генетски модели [79].

Врз основа на изложената литература, може да се заклучи дека и покрај тоа што постојат делумно инконзистентни резултати, сепак, доминантниот број студии и мета-анализи говорат дека T-786C eNOS (rs2070744) генскиот

полиморфизам покажува статистички сигнификантна асоцираност со појавата на КАБ. Субгрупните анализи според етничка припадност, односно според потеклото на популацијата по континенти покажале дека афричките популации немаат статистички значајна асоцираност на овој полиморфизам со појавата на КАБ. Најсилен степен на асоцираност на T-786C (rs2070744) eNOS генскиот полиморфизам со ризикот за КАБ покажале Азијците, а следни се Европејците. Во поглед на дистрибуцијата на генотипските и алелните фреквенции, резултатите се доста конзистентни дека носителите на CC генотипот и носителите на C алелот имаат значајно повисока веројатност за појава на КАБ и таа веројатност е статистички значајна.

Овие резултати се конкордантни и со резултатите од нашето истражување спроведено врз помлада македонска популација каде што со повеќе генетски модели се покажа дека носителите на CC генотипот имаат повисока веројатност за развој на КАБ и таа веројатност е статистички значајна ($p < 0,05$). Понатаму, и носителите на C алелот исто така ја зголемуваат веројатноста за КАБ при што шансите за појава на КАБ зависат правопрпорционално од бројот на присутни C алели.

8. ЗАКЛУЧОК

Во спроведената проспективна, опсервациска, генетско-асоцијативна студија на случаи и контроли анализирани се генетските податоци од испитувана група составена од 40 случаи на возраст до 45 години со ангиографски докажана сигнификантна КАБ и контролна група составена од 40 пациенти на возраст исто така до 45 години, но со уреден ангиографски наод или со ангиографски наод без сигнификантни коронарни лезии. Основната цел беше да се определи постоењето на генетска асоцијација на полиморфизмите -1607 1G/2G (rs1799750) во генот MMP-1, -1562 C>T (rs 3918242) во генот MMP-9 и -786 T>C (rs2070744) во генот eNOS од една страна, со појавата на коронарографски верифицирана сигнификантна коронарна артериска болест кај помлада македонска популација пациенти од друга страна.

Врз основа на направената статистичка евалуација и генетско-асоцијативните анализи со користење на повеќе генетски модели, како и врз

основа на споредбата и толкувањето на податоците со достапната научна литература, донесени се следниве заклучоци:

1. Во однос на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1, носителите на хомозиготниот генотип 2G/2G според генотипскиот модел имаат 5,641 пати поголема веројатност (OR - odds ratio) за појава на коронарна артериска болест од тие со референтниот генотип 1G/1G при што оваа поврзаност е статистички значајна ($p=0,045$).

Дополнително, анализите и со доминантниот, рецесивниот, алелниот и адитивниот модел јасно укажуваат на постоење генетска асоцијација на полиморфизмот rs1799750 во генот MMP-1 со сигнификантна коронарна артериска болест кај македонска популација на возраст до 45 години.

2. Евалуацијата на резултатите за полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 покажаа дека хомозиготниот варијантен генотип ТТ е поврзан со 6,316 пати повисока веројатност за појава на значајна коронарна артериска болест кај лица до 45 години, отколку носителите на неваријантниот генотип СС ($p=0,034$). Зголемени и статистички значајни вредности на веројатносниот индекс се добиени и при користење на доминантниот, хетерозиготниот, алелниот и адитивниот генетски асоцијативен модел.

Оттаму, постои генетска асоцијација на полиморфизмот rs3918242 во генот MMP-9 со коронарната артериска болест кај македонска популација на возраст до 45 години.

3. Резултатите од анализите на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS покажаа дека носителите на хомозиготниот варијантен генотип СС имаат 4,219 пати повисоки шанси за развој на сигнификантна КАБ отколку тие со генотипот ТТ кој е користен како референтен, а овие разлики се статистички сигнификантни ($p=0,042$). Значајно повисоки веројатносни индекси се добиени и при користењето на доминантниот, хетерозиготниот, алелниот и адитивниот генетски модел.

Според добиените резултати, утврдена е генетска асоцијација на полиморфизмот rs2070744 во генот eNOS со појавата на ангиографски докажана сигнификантна КАБ кај македонска популација до 45 годишна возраст.

4. Со мултиваријантната логистичка регресија се потврди дека хомозиготните варијантни и хетерозиготните генотипови на трите полиморфизми ја зголемуваат вредноста на β -коэффициентите за веројатноста од појава на сигнификантна коронарна артериска болест во однос на референтниот хомозиготен неваријантен генотип за секој полиморфизам.

Вредноста на површината под ROC-кривата ($AUC=0,761$) укажува на добра предиктивност на мултиваријантниот модел на комбинираните ефекти на трите полиморфизми во однос на појавата на сигнификантна коронарна артериска болест. Моделот успешно го класифицирал присуството или отсуството на сигнификантна коронарна артериска болест кај 66,25% од случаите. Специфичноста, односно стапката на вистински негативни случаи во однос на постоење на сигнификантна КАБ изнесува 75%, додека сензитивноста, односна стапката на вистински позитивни случаи во однос на коронарната артериска болест е 57,50%.

5. Утврдената генетска асоцијација на полиморфизмите MMP-1 1G/2G (rs1799750), MMP-9 C>T (rs 3918242) и eNOS T>C (rs2070744) со појавата на коронарографски верифицирана сигнификантна коронарна артериска болест кај помлада македонска популација пациенти укажува на потребата од натамошни истражувања околу употребливоста на овие потенцијални генетски маркери во персонализираниот пристап при клиничката евалуација, предикцијата на ризикот и планирањето на терапијата.

9. РЕФЕРЕНЦИ

1. Yilmaz S. et al. A study of coronary artery disease in young patients. *Folia Cardiologica* 2017; 12, 6: 543–550. DOI: 10.5603/FC.2017.0104
2. Anghel L. et al. Particularities of Acute Myocardial Infarction in Young Adults. *Journal of Cardiovascular Emergencies* 2019; 5(1): 25-31. DOI: 10.2478/jce-2019-0005
3. Gulati R. et al. Acute Myocardial Infarction in Young Individuals. *Mayo Clin Proc.* 2020; 95(1): 136-156. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.001>
4. Shah N, Kelly AM, Cox N, Wong C, Soon K. Myocardial Infarction in the "Young": Risk Factors, Presentation, Management and Prognosis. *Heart Lung Circ.* 2016 Oct; 25(10): 955-60. DOI: 10.1016/j.hlc.2016.04.015. Epub 2016 May 16. PMID: 27265644.
5. Aggarwal A, Srivastava S, Velmurugan M. Newer perspectives of coronary artery disease in young. *World J Cardiol* 2016 December 26; 8(12): 728-734. DOI: [10.4330/wjc.v8.i12.728](https://doi.org/10.4330/wjc.v8.i12.728)
6. Lei L, Bin Z. Risk Factor Differences in Acute Myocardial Infarction between Young and Older People: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Cardiovasc Sci.* 2019; 32 (2): 163-176
7. Yamac, Aylin Hatice, et al. Premature Myocardial Infarction: Genetic Variations in SIRT1 Affect Disease Susceptibility. *Cardiology Research and Practice*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8921806>
8. Maroszynska-Dmoch EM, Wozakowska-Kaplon B. Clinical and angiographic characteristics of coronary artery disease in young adults: a single centre study. *Kardiologia Polska* 2016; 74, 4: 314–321. DOI: 10.5603/KP.a2015.0178.
9. Connelly JJ et al. GATA2 Is Associated with Familial Early-Onset Coronary Artery Disease. *PLoS Genet* 2006; 2 (8): e139. DOI 10.1371/journal.pgen.0020139.
10. McPherson R., Tybjaerg-Hansen A. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ Res.* 2016; 118: 564-578. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306566.
11. Musunuru K, Kathiresan S. Genetics of Common, Complex Coronary Artery Disease. *Cell.* 2019 Mar 21; 177 (1): 132-145. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.015. PMID: 30901535.
12. Dalepiane VLN, Silvello DN, Paludo CA, Roisenberg I, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Genetics and Molecular Biology*, 2007. 30 (3), 505-510. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000400001>
13. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet.* 2017 June; 18 (6): 331-344. DOI: 10.1038/nrg.2016.160.
14. Hassanzadeh-Makoui R, Razi B, Aslani S, Imani D, Tabaei S. The association between Matrix Metallo-proteinases-9 (MMP-9) gene family polymorphisms and risk of Coronary Artery Disease (CAD): a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders* 2020. 20:232. DOI: 10.1186/s12872-020-01510-4.
15. Malinowsky D. et al. Genetic Risk Factors Related to Coronary Artery Disease and Role of Transforming Factor Beta 1 Polymorphisms. *Genes* 2023, 14, 1425. <https://doi.org/10.3390/genes14071425>
16. Kessler T., Schunkert H. Coronary Artery Disease Genetics Enlightened by Genome-Wide Association Studies. *JACC: Basic to Translational Science* Vol. 6, No 7, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.04.001>

17. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Dec;26(6):673-85. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003. Epub 2015 May 12. PMID: 26005197; PMCID: PMC4671520.
18. Roberts R. et al. Identifying genes for coronary artery disease: An idea whose time has come. *Can J Cardiol* 2007; 23 (Suppl A): 7A-15A.
19. Al-Koofee DAF, Mubarak SMH. Genetic Polymorphisms. *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms* 2019. IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.88063
20. Elston R, Satagopan J, Sun S. Genetic terminology. *Methods Mol Biol.* 2012; 850: 1-9. DOI: 10.1007/978-1-61779-555-8_1
21. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 2015; 8: 37. DOI 10.1186/s12920-015-0115-z
22. Assimes TL, Roberts R. Genetics: Implications for Prevention and Management of Coronary Artery Disease. *JACC* 2016; vol. 68, No 25: 2797-818. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.10.039
23. Wang Y, Wang JG. Genome-Wide Association Studies of Hypertension and Several Other Cardiovascular Diseases. *Pulse* 2018; 6: 169-186. DOI: 10.1159/000496150
24. Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *European Heart Journal* 2010; 31: 918-925. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq038
25. Girelli D. et al. A decade of progress on the genetic basis of coronary artery disease. Practical insights for the internist. *European Journal of Internal Medicine* 41 (2017); 10-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2017.03.019>
26. Kapoor C. et al. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Can Res Ther* 2016; 12: 28-35. DOI: 10.4103/0973-1482.157337
27. Ikeda U, Shimada K. Matrix Metalloproteinase and Coronary Artery Diseases. *Clin Cardiol* 2003; 26: 55-59
28. Kondapalli MS et al. Matrix Metalloproteinases in Coronary Artery Disease: A Review. *J Life Sci* 2012; 4 (1): 55-58
29. Zhang MM et al. Association between matrix metalloproteinase 9 C-1562T polymorphism and the risk of coronary artery disease: an update systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2018; 9 (10): 9468-9479
30. Wang L. et al. Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. *World J Emerg Med* 2011; 2 (2): 104-110. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2011.02.005
31. Beton O. et al. Association between MMP-3 and MMP-9 polymorphisms and coronary artery disease. *Biomedical reports* 2016; 5: 709-714. DOI: 10.3892/br.2016.782
32. Juan Z, Wei-Guo Z, Heng-Lang S, Da-Guo W. Association of Matrix Metalloproteinase 9 C-1562 Polymorphism With Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Current Therapeutic Research* 2015; 77: 40-45. DOI: 10.1016/j.curtheres.2014.05.001
33. Mahmoodi K, Soltanpour MS, Kamali K. Assessment of the role of plasma nitric oxide levels, T-786C genetic polymorphism, and gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase in the development of coronary artery disease. *J Res Med Sci* 2017; 22-34. DOI: 10.4103/1735-1995.202144
34. Khaki-Khatibi F. et al. Association between nucleotide mutation of eNOS gene and serum level of vessel expansion factor (VEF) in non-smoker patients with vascular heart disease. *Afr J Biotechnol* 2013; 12 (20): 3023-3028 DOI: 10.5897/AJB12.2711

35. Khaki-Khatibi F. et al. Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease. *Mol Biol Res Commun* 2012; 1: 1-7.
36. Zhu B. et al. An association between the endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and premature coronary artery disease: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8 (44): 77990-77998
37. Rai H. et al. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS ONE* 2014; 9 (11): e113363. DOI: 10.1371/journal.pone.0113363
38. Terzi S. et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3-786T>C) Genetic Polymorphism in Chronic Heart Failure: Effects of Mutant -786C allele on Long-term Mortality. *Acta Cardiol Sin* 2017; 33: 420-428. DOI: 10.6515/AKC20161215B
39. Nishizawa R. et al. The 2G allele of promoter region of matrix metalloproteinase-1 as an essential pre-condition for the early onset of oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2007 Oct 5;7:187. doi: 10.1186/1471-2407-7-187.
40. Silva PS et al. eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013 Feb;69(2):167-77. doi: 10.1007/s00228-012-1326-2.
41. Wu HD, Bai X, Chen DM, Cao HY, Qin L. Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Sep;17(9):707-12. doi: 10.1089/gtmb.2013.0109. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23819814; PMCID: PMC3761435.
42. Scanlon PJ. et al. ACC/AHA guidelines for coronary angiography: executive summary and recommendations: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Coronary Angiography). *Circulation* 1999; 99: 2345-2357.
43. Patel MR. et al. ACC/AATS/AHA/ASE/ASNC/SCAI/SCCT/STS 2017 appropriate use criteria for coronary revascularization in patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Appropriate Use Criteria Task Force, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 2212–41. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.02.001
44. Conti CR, Bavry AA, Petersen JW. Silent ischemia. *Am Coll Cardiol* 2012; 59: 435–41. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.07.050
45. Knuuti J. et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal* 2020; 41: 407-477. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz425
46. Collet JP. et al. 2020 ESC Guidelines for the management of the acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2020; 00: 1-79. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa575
47. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. *Diabetes Care* 2020; 43 (Suppl. 1): S14–S31. DOI: 10.2337/dc20-S002
48. Williams B. et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* 2018; 39: 3021–3104. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy339

49. Mach F. et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal* 2020; 41: 111-188. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455
50. Fuggle S. *Clinical Biochemistry Reference Ranges Handbook*. East Sussex Healthcare NHS 2018; 1-18
51. Ghaffarzadeh, Ayda MSc*; Bagheri, Morteza PhD†; Khadem-Vatani, Kamal MD‡; Abdi Rad, Isa MD, PhD†. Association of MMP-1 (rs1799750)-1607 2G/2G and MMP-3 (rs3025058)-1612 6A/6A Genotypes With Coronary Artery Disease Risk Among Iranian Turks. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 74(5):p 420-425, November 2019. | DOI: 10.1097/FJC.0000000000000727
52. Qintao, Cui & Yan, Li & Changhong, Duan & Xiaoliang, Guo & Xiaochen, Liu. (2014). Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-1 and Coronary Artery Disease Susceptibility: A Case–Control Study in a Han Chinese Population. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 18. DOI: 10.1089/gtmb.2014.0222.
53. Ma YZ, Jiang QY, and Kong DQ. Association between matrix metalloproteinase 1 and type 2 diabetes mellitus coexisting with coronary heart disease in a Han Chinese population. *Genet. Mol. Res.* (2016) 15 (2): gmr.15027938. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027938>
54. Román-García, Pablo et al. (2009). Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: A case-control study in a Spanish population. *Coronary Artery Disease*. 20. 383-386. DOI: 10.1097/MCA.0b013e32832fa9cf.
55. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Pietrucha T. Genetic variability and the risk of myocardial infarction in Poles under 45 years of age. *Arch Med Sci* 2010; 6, 2: 160-167. DOI: 10.5114/aoms.2010.13887.
56. Kondapalli MS et al. MMP-1 circulating levels and promoter polymorphism in risk prediction of coronary artery disease in asymptomatic first-degree relatives. *Gene* 595 (2016) 115–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.041>
57. Pawlik A. et al. MMP-1 and MMP-3 Gene Polymorphisms in Patients with Acute Coronary Syndromes. *IUBMB Life*. 2017 Nov;69(11):850-855. doi: 10.1002/iub.1684.
58. Mahmoodi K, Kamali K, Karami E, Soltanpour MS. Plasma concentration, genetic variation, and gene expression levels of matrix metalloproteinase 9 in Iranian patients with coronary artery disease. *J Res Med Sci*. 2017 Jan 27;22:8. doi: 10.4103/1735-1995.199088. PMID: 28400830; PMCID: PMC5361445.
59. Basia D. et al. Matrix metalloproteinases and their gene polymorphism in young ST-segment elevation myocardial infarction. *Indian Heart Journal*, Volume 74, Issue 6, 2022, Pages 519-523, ISSN 0019-4832. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2022.11.001>
60. Kucuk M. et al. MTHFR and MMP-9 Genetic Variants in Coronary Artery Disease. *Dicle Tıp Dergisi*. 2016 43(1), 50-56. <https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2016.01.0637>
61. Zhang FX, Sun DP, Guan N, Chen JJ, Huo XC, Luo JS. Association between -1562C>T polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Feb;18(2):98-105. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2013.0369>. PMID: 24506511.
62. Li YY et al. Matrix metalloproteinase-9 Gene-1562C>T Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population: A Meta-Analysis of 5468 Subjects. *Front Physiol*. 2016 Jun 9;7:212. doi: 10.3389/fphys.2016.00212. PMID: 27375491; PMCID: PMC4899440.

63. Rodriguez-Perez J. et al. rs3918242 MMP-9 gene polymorphism is associated with myocardial infarction in Mexican patients. *Genet Mol Res.* 2016;15(1): 15017776. DOI: [10.4238/gmr.15017776](https://doi.org/10.4238/gmr.15017776).
64. Watson C. et al. Investigation of association of genetic variant rs3918242 of matrix metalloproteinase-9 with hypertension, myocardial infarction and progression of ventricular dysfunction in Irish Caucasian patients with diabetes: a report from the STOP-HF follow-up programme. *BMC Cardiovasc Disord* (2021) 21:87. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-01860-7>
65. Iqbal R. et al. Association of MMP9 Polymorphism With Myocardial Infarction. *Interv. Cardiol.* (2022) 14,S10: 229-237. DOI: 10.37532/1755-5310.2022.14(S10).229
66. Feng B., Li H. Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 and Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Disease Markers*, Volume 2022. Article ID 5507153. <https://doi.org/10.1155/2022/5507153>
67. Colombo M. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry* (2003);49:3;389-395
68. Jaishankar T., Shivasekar M., Mohanakrishnan VV. eNOS Gene Variants and Their Genetic Susceptibility Associated with Coronary Heart Disease. *J Health Sci Med Res* 2023;41(1):e2022885. <http://doi.org/10.31584/jhsmr.2022885>
69. Meroufel D. et al. Relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in the Algerian population. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* Vol. 10, No. 1, May, 2009.
70. M. El Saied A., M. El Wakf A, Elmougy R, El Hafez A, M. Hussien S. Lack of Association Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease Among Egyptian Population. *Int. J. Biochem. Res. Rev.* 2016, 11, 1-12.
71. Nassar BA et al. Improved prediction of early-onset coronary artery disease using APOE ε4, BChE-K, PPARγ2 Pro12 and ENOS T-786C in a polygenic model. *Clinical Biochemistry*, Volume 39, Issue 2, 2006, p 109-114, ISSN 0009-9120. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.10.002>
72. Granath B, Taylor RR, Van Bockxmeer FM, Mamotte Cyril DS. Lack of Evidence for Association between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease in the Australian Caucasian Population, *Journal of Cardiovascular Risk*, Volume 8, Issue 4, 1 August 2001, Pages 235–241, <https://doi.org/10.1177/174182670100800408>
73. Bhutani N, Tangadi D, Bhavsar P. Role of endothelial nitric oxide synthase (T-786C) gene polymorphism in the development of coronary artery disease. *Gal Int J Health Sci Res.* 2020; 5(1): 6-12
74. Balci S, Yildiz PO, Sucu N, Yilmaz DC, Tamer L (2017). T786C and G894T eNOS Polymorphisms as a Risk Assessment of Coronary Artery Disease. *J Cardiol Curr Res* 8(4): 00290. DOI: 10.15406/jccr.2017.08.00290.
75. Tangurek B, Ozer N, Sayar N, Terzi S, Yilmaz H, Dayi SU, Ciloglu F, Aksu H, Asilturk R, Cagil A. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. *Heart Vessels.* 2006 Sep;21(5):285-90. doi: 10.1007/s00380-005-0902-0. Epub 2006 Sep 29. PMID: 17151815.
76. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Draz HM, Hussain T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (894G > T and -786T > C) and risk of coronary artery disease in a Saudi population. *Arch Med Res.* 2010 Feb;41(2):134-41. doi: 10.1016/j.arcmed.2010.02.004. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20470943.

77. Rossi GP et al. The T-786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease in Caucasian Patients of the GENICA Study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:930 –7. doi:10.1016/S0735-1097(02)03012-7.
78. Liu D. et al. Association between the – 786T>C polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Gene* Vol 545, Issue 1, 15 July 2014, Pages 175-183, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.099>.
79. Xiaoqing Li, Yong Lin, Ruizhi Zhang, Associations between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis of 132 case-control studies, *European Journal of Preventive Cardiology*, Volume 26, Issue 2, 1 January 2019, Pages 160–170, <https://doi.org/10.1177/2047487318780748>