

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**

**ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“**

**Катедра „КАРДИОЛОГИЯ, ПУЛМОЛОГИЯ И ЕНДОКРИНОЛОГИЯ“**

**Д-р Весела Димчева Томова**

**Проучване на клиничното  
и прогностично значение на липопротеин А  
и А>G полиморфизма в LPA-локуса  
при пациенти с аортна калцификация и стеноза  
и взаимодействието им с други рискови фактори**

## **А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационния труд за присъждане  
на образователната и научна степен „Доктор“  
Научна специалност 03.01.47 „Кардиология“**

**Научен ръководител:**

**Проф. д-р Мария Любомирова Цекова, д.м.н.**

**Рецензенти:**

**Проф. д-р Младен Григоров, д.м.н.**

**Доц. д-р Катерина Витлиянова, д.м.н.**

**Плевен, 2018 г.**

Дисертационният труд е написан на 227 страници. Съдържа 29 таблици и 37 фигури.

Библиографията включва 270 литературни източника, от които 11 са на кирилица и 259 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен катедрен съвет на катедра “Кардиология, пулмология и ендокринология”, МУ – Плевен.

Клиничният материал, свързан с дисертацията, е събран във Втора клиника по кардиология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен и в СБАЛ по кардиология – Плевен. Биохимичните изследвания са извършени в Централна клинична лаборатория на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен и Клинична лаборатория на СБАЛК – Плевен; измерване на плазменото ниво на липопротеин А е осъществено в лабораторията на сектор „Биология” към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, МУ – Плевен; изолирането на ДНК и генотипирането е направено в Университетска лаборатория за научни изследвания, МУ – Плевен.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.06.2018 г. от 12.00 часа в зала „Амброаз Парев“, МУ – Плевен, ул. „Св. Климент Охридски“ 1.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Библиотеката на МУ-Плевен и на сайта на МУ – Плевен [www.mu-pleven.bg](http://www.mu-pleven.bg)

## СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ .....	6
ЦЕЛ .....	8
ЗАДАЧИ .....	8
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....	9
Клиничен контингент – основни характеристики .....	9
Дефиниране на изследваните показатели .....	11
Методи .....	14
РЕЗУЛТАТИ .....	21
Характеристика на целия изследван контингент по демографски показатели .....	21
Базисни характеристики на трите групи .....	22
Вътрегрупов анализ на демографски и някои клинични показатели при пациентите с САVD (група II + III) .....	23
Плазмена концентрация на липопротеин (а) .....	26
Роля на носителството на rs10455872 полиморфизма в интрон 25 гена, кодиращ Lp(a) за възникване на калцифицираща аортна клапна болест .....	28
Оценка на връзката между тежестта на САVD, плазмените нива на Lp(a) и някои общоприети рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания .....	30
Междугрупов анализ на рисковите фактори при пациентите с нормална аортна клапа, аортна клапна калциноза без хемодинамично значима стеноза и с формирана аортна стеноза .....	31
Количествена оценка на факторите, влияещи върху риска за развитие на калцифицирана аортна клапа със стеноза .....	35
ДИСКУСИЯ .....	39
ИЗВОДИ .....	55
ПРИНОСИ .....	57
Научно-теоретични .....	57
Научно-методични .....	57
Научно-практически .....	57
НАУЧНИ ТРУДОВЕ по ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА .....	59
Публикации в медицински списания .....	59
Научни съобщения и презентации .....	59
ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ .....	60

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- ДИ** – доверителен интервал  
**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина  
**ЕКГ** - електрокардиограма  
**ЕхоКГ** – ехокардиография  
**ЗД** – захарен диабет  
**ИБС** – исхемична болест на сърцето  
**КБС** – коронарна болест на сърцето  
**ЛББ** – ляв бедрен блок  
**ЛК** – лява камера  
**ЛК-ФИ** – левокамерна фракция на изтласкване  
**ЛПНП** – липопротеини с ниска плътност  
**МК-пръстен** – митрален клапен пръстен  
**МУ** – Медицински университет  
**РНК** – рибонуклеинова киселина  
**СБАЛ** – Специализирана болница за активно лечение  
**ССЗ** – сърдечно-съдови заболявания  
**УМБАЛ** – Университетска многопрофилна болница за активно лечение  
**ХБН** – хронична бъбречна недостатъчност
- ACC** – American College of Cardiology  
**AHA** – American Heart Association – Американска кардиологична асоциация  
**apo(a)** – apolipoprotein (a) – аполипопротеин (a)  
**apo-B** – apolipoprotein B – аполипопротеин B  
**apo B100** – apolipoprotein B100 – аполипопротеин B100  
**AVA** – aortic valve area – аортна клапна площ  
**AVC** – aortic valve calcium – калций по аортната клапа  
**AVR** – aortic valve replacement – аортно клапно протезиране  
**BMI** – body-mass index – индекс на телесна маса  
**CAS** – calcific aortic stenosis – калцифицираща аортна стеноза  
**CAVD** – calcific aortic valve disease – калцифицираща аортна клапна болест  
**CHARGE** – „Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology“ - консорциум  
**CHS** – Cardiovascular Health Study  
**CI = ДИ** – confidentiality interval – доверителен интервал  
**СТ** – computed tomography – компютърна томография  
**СТ-изследване** – компютър-томографско изследване  
**CW-Doppler** – continuous wave Doppler  
**DNA = ДНК** – Deoxyribonucleic acid – дезоксирибонуклеинова киселина

**EAE** – European Association of Echocardiography – Европейска Асоциация по Ехокардиография

**ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay

**ESC** – European Society of Cardiology – Европейско дружество по кардиология

**FHS** – Framingham Heart Study

**HDL** – high density lipoproteins – липопротеини с висока плътност

**HDL-C** – cholesterol carried by high density lipoproteins – холестерол, пренасян от липопротеини с висока плътност

**HR** – hazard ratio

**HRMA** – High Resolution Melting Analysis

**KIV-2** – kringle тип IV 2 - повтори

**LDL = ЛПНП** – low density lipoproteins – липопротеини с ниска плътност

**LDL-C** – cholesterol carried by low density lipoproteins – холестерол, пренасян от липопротеини с ниска плътност

**Lp(a)** – Lipoprotein (a) – липопротеин (a)

**LPA (gene)** – Lipoprotein (a) gene – ген за липопротеин (a)

**MDCS** – Malmö Diet and Cancer Study

**MESA** – Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis

**MRI = ЯМР** – magnetic resonance imaging – магнитно-резонансно изследване (ядрено-магнитен резонанс)

**mRNA = мРНК** – matrix ribonucleic acid – матриксна рибонуклеинова киселина

**OR** – odds ratio – отношение на шансовете

**PCI** – percutaneous coronary intervention – перкутанна коронарна интервенция

**PCR** – polymerase chain reaction – полимеразна верижна реакция

**PCSK9** – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

**PGr** – peak gradient – пиков градиент

**RNA = РНК** – ribonucleic acid – рибонуклеинова киселина

**ROC (curve)** – Receiver Operating Characteristic curve

**rs...** – reference SNP – референтен номер на единичен нуклеотиден полиморфизъм

**SNP** - single nucleotide polymorphisms – единични нуклеотидни полиморфизми

**TAVR** - transcatheter aortic valve replacement – транскатетърно аортно клапно протезиране

**TG** – triglycerides – триглицериди

**VHD** – Valvular Heart Disease – клапна сърдечна болест

**V<sub>max</sub>** – maximum aortic velocity, the maximum speed of blood flow in the aorta of the heart – максимална скорост на кръвотока през аортната клапа

## ВЪВЕДЕНИЕ

Терминът „*Калцифицираща аортна клапна болест*“ (CAVD) обхваща всички форми на калцифициращо аортно клапно заболяване, включително субклинични: калций по аортната клапа (*aortic valve calcium - AVC*), идентифициран чрез компютър-томографско (СТ) изследване; аортна склероза (*aortic sclerosis*) – задебеляване, уплътняване и калцификация, установена чрез ехокардиография, както и клиничното заболяване аортна стеноза (*aortic stenosis*) – манифестиращо се с обструкция на кръвотока в ЛК-изходен тракт.

Социалната значимост на CAVD се определя от няколко фактора:

**1. Заболяването има висока честота.** Това е най-честият клапен порок при възрастни, налагащ хирургично лечение, втората по важност причина за кардиохирургични интервенции в страните от Европа и САЩ (след аорто-коронарния бай-пас) и третата най-честа сърдечна болест след артериалната хипертония и исхемичното сърце [Rajamannan, N. M. и съавт., 2009].

**2. Населението в икономически развитите страни застарява, а CAVD е болест на зрялата и напредналата възраст.** По литературни данни, честотата на аортната стеноза сред населението над 65-годишна възраст е между 2 и 7% [Vahanian A. и съавт., 2012], над 75-годишна възраст – между 3 и 9% [Dimitrow P. P., 2014], а на аортната калцификация и склероза – 21 – 29% [Каменова З. и съавт., 2012; Iung, B. и съавт., 2003; Iung, B., & Vahanian, A., 2011].

**3. Заболяването е с недоизяснена патогенеза и няма превенция.** Въпреки редица морфологични и патогенетични сходства със съдовата атеросклероза, между CAVD и формирането на атеросклеротичните плаки има съществени различия. Рисковият профил на двете състояния не се припокрива. Само около половината от пациентите с аортна стеноза, нуждаещи се от клапно протезиране, имат сигнификантна коронарна болест. Статините, които се използват широко за първична и вторична профилактика на атеросклерозата и нейните усложнения чрез понижаване на LDL-холестерола и допълнителни плейотропни ефекти, нямат ефект върху прогресията на аортната стеноза [De Vecchis, R., 2013].

**4. Веднъж започнал, процесът на прогресираща клапна обструкция е необратим.** Само 10-15% от пациентите с аортна калцификация и склероза развиват клапна стеноза, но ако се достигне до стадия на клапно стеснение, еволюцията на CAVD към тежкостепенна аортна стеноза е облигатна и е въпрос на време. Не са известни механизмите, чрез които патологичният процес може да бъде повлиян или спрял [Otto, C. M., & Prendergast, B., 2014].

**5. При консервативно (медикаментозно) лечение прогнозата е лоша.** Без аортно клапно протезиране, средната преживяемост при наличие на симптоми

е, съответно: при ангина пекторис – 5 години; при поява на синкоп – 3 години; при сърдечна недостатъчност – 2 години [Morrow, A. G. и съавт., 1968].

**6. Ефективното лечение на тежката аортна стеноза се свежда единствено до клапно протезиране.** Към 2017 г., в световен мащаб годишно се извършват 275 000 протезирания на аортната клапа, като се очаква към 2050 г. броят им да се утрои [Van der Ven, C. и съавт., 2017]. Биологичните аортни клапи също могат да калцират с течение на времето [Ladich E. и съавт., 2011].

През последните години се натрупват все повече факти относно **каузалната роля на Lp(a) за развитието на калцифицираща аортна стеноза**, но съществуват редица неясноти по отношение на молекулярните механизми на тази патогенетична връзка. Не са дефинирани точно рисковите нива на Lp(a), които евентуално биха били таргет на една бъдеща Lp(a)-понижаваща терапия. Няма установена „прагова концентрация“ на Lp(a), която да е статистически свързана с еволюцията на субклиничните форми на САВД към хемодинамично и клинично значима аортна стеноза.

**Изследванията относно генетичната предиспозиция за появата и прогресията на САВД са разнопосочни и до голяма степен противоречиви.** Като най-тясно свързан с аортната клапна калцификация се очертава един SNP – **rs10455872 в интрон 25 на гена, кодиращ Lp(a)**, макар че тази връзка не е директна, а вероятно опосредствана от редица други фактори и не е ясно дали изпълнява само „тригерна функция“ за отключване на заболяването, или има отношение и към прогресията му към тежкостепенна клапна стеноза.

**Не е напълно изяснено взаимодействието между генетичния полиморфизъм, повишените плазмени нива на Lp(a) и други рискови фактори за инициацията и прогресията на САВД.** Няма точен отговор на въпроса как те си взаимодействат с „класическите“ маркери за висок сърдечно-съдов риск и как биха се вписали в един евентуален прогностичен модел.

**Няма изработени единни критерии за прогностична оценка** – както по отношение на риска за изява на САВД в общата популация, така и за прогнозиране на еволюцията при лица със субклинична САВД към клинично значима аортна стеноза. **Не е изработен общоприет алгоритъм за клинично поведение и проследяване при лица с повишен риск от развитие на калцифицираща аортна стеноза и не са дефинирани рискови групи.**

**Изследвания върху ролята на Lp(a) и rs10455872 – полиморфизма в LPA-гена при САВД в България не са правени.**

## ЦЕЛ

Като изследваме носителството на rs10455872 полиморфизма в интрон 25 на гена, кодиращ липопротеин (а) и плазмените нива на Lp(a), да проучим връзката им с развитието на аортна клапна калциноза и стеноза, както и да установим взаимодействието им с други рискови фактори и да формираме рискови групи.

## ЗАДАЧИ

1. Да извършим ДНК-генотипиране на A/G полиморфизма (rs10455872) в интрон 25 на гена, кодиращ липопротеин (а) при пациенти с аортна клапна калцификация и стеноза и при контролна група пациенти, аналогични по възраст и пол, при които липсват данни за клапно заболяване.

2. Да анализираме плазмените нива на липопротеин (а) при същата група пациенти с аортна клапна калцификация и стеноза и при контролна група пациенти без данни за клапно заболяване.

3. Да изследваме други потенциални рискови фактори за аортна калцификация и стеноза, включващи:

- демографски показатели - пол, възраст;
- коморбидности - артериална хипертония, захарен диабет, ожестет;
- преживян миокарден инфаркт или ангиографски доказана ИБС;
- вредни навици – тютюнопушене.

4. Да проучим отклоненията в следните лабораторни показатели: абнормни нива на кръвна захар на гладно (непокриващи критериите за захарен диабет), отклонения в плазмените липиди (общ холестерол, LDL-C, HDL-C, триглицериди) и повишен плазмен креатинин.

5. Да потърсим връзка между генетичния полиморфизъм, плазмените нива на Lp(a) и другите рискови фактори за формиране на аортна клапна калцификация и стеноза, както и за нейната тежест, като извършим количествена оценка на факторите, влияещи върху риска за развитие на калцифицираща аортна клапна болест.

6. Да изведем критерии за формиране на рискови групи пациенти по отношение възникването на калцификация на аортната клапа със стеноза.

7. Да изработим примерен алгоритъм за клинично поведение и проследяване при лицата с повишен риск от развитие на калцифицираща аортна клапна болест.



## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Клиничен контингент – основни характеристики

Проучването е проспективно, болнично базирано.

Изследваният клиничен контингент включва 156 пациенти, лекувани във Втора клиника по кардиология на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен и в СБАЛ по кардиология – Плевен, за периода от месец май 2015 до месец април 2016 г. (1 година). Изследователският проект е одобрен от Комисията по етика на научно-изследователската дейност при МУ-Плевен.

Всички участници в проучването бяха предварително запознати с целите и методите му и подписаха информирано съгласие за провеждане на генетично и имунологично изследване.

Пациентите са разделени в три групи:

**I група – контроли: 42 пациенти с морфологично и функционално нормална аортна клапа, оценена по ехокардиографски критерии.**

**II група – „междинна“: 30 пациенти, при които са налице ехокардиографски данни за калцификация на аортната клапа, но без формирана клинично значима аортна стеноза.**

**III група - таргетна: 84 пациенти с аортна клапа калциноза и формирана аортна стеноза, доказана чрез ехокардиографски критерии и в по-голямата част от случаите – потвърдена с инвазивен метод на изследване.**

При анализа на факторите за прогресия на клапната обструкция, разделихме таргетната група на три подгрупи: пациенти с лекостепенна, умерена и тежка аортна стеноза, като към последната подгрупа са включени и пациентите след аортно клапно протезиране по повод на Ао-стеноза.

**Критериите за подбора на контролната група (I) са:**

- възраст над 50 години
- липса на ехокардиографски данни за структурно заболяване на аортната клапа (наличие на трикуспидна клапа с нежни платна, с пълен обем на отваряне и пиков градиент  $< 1,7$  m/s)

**Критериите за включване във II група са:**

- възраст над 50 години
- склероза и калцификация на аортната клапа без формирана хемодинамично значима стеноза, оценена с ехокардиографски методи: морфологично задебелени платна с огнища на калцификация, без значимо намален обем на отваряне, пиков градиент под 2,5 m/s, планиметрична площ над 2 cm<sup>2</sup>.

### **Критериите за включване в III група са:**

- възраст над 50 години
- калцификация на аортната клапа с формирана стеноза, оценена по ехокардиографски критерии (пиков трансклапен градиент > 2,5 m/s; планиметрична площ под 2 cm<sup>2</sup>), а при повечето пациенти – потвърдена и чрез инвазивно изследване, или аортно клапно протезирани по повод на високостепенна калцифицираща аортна стеноза, която не е резултат от заболявания, описани в изключващите критерии.

**Освен ехокардиографските показатели, „пресяващ“ клиничен критерий за тази група беше и наличието на аортен систолен шум.**

### **Критерии за изключване от проучването:**

- възраст под 50 години
- ревматичен клапен порок
- вродена аортна стеноза (не включва бикуспидната аортна клапа)
- ендокардит с вегетации на аортната клапа
- напреднало бъбречно заболяване (креатинин над 250 мкмол/л или хемодиализно лечение)
- известни заболявания, свързани с нарушение на калциево-фосфорната обмяна (хиперпаратиреоидизъм, болест на Paget и др.)
- проведена лъчетерапия на медиастинума
- отказ за подписване на Информирано съгласие

Изключващите критерии обхващат състояния, при които е налице аортна клапа дисфункция по друг механизъм (вродено слепване на комисури, хипопластична клапа, ревматичен ендокардит, вегетации, създаващи обструкция на кръвотока през клапата, първични и вторични нарушения на калциевия метаболизъм с повишена склонност към калциеви отлагания в тъканите, радиационни промени и др.), както и оттегляне на информираното съгласие за участие в проучването – по всяко време.

## Дефиниране на изследваните показатели

**Калцифицираща аортна клапна болест (Calcific aortic valve disease - CAVD)** – задебеляване, уплътняване и калцификация, установена чрез ехокардиография, както и клиничното заболяване аортна стеноза (*aortic stenosis*) [Thanassoulis, G., 2016]. В нашето проучване са използвани клинични и ехокардиографски критерии. СТ-оценка на аортната клапа не е правена.

### **Аортна клапна стеноза**

Едно от затрудненията при интерпретация на резултатите от проучвания върху CAVD през годините е свързано и с различните критерии, възприети от авторските колективи относно диагностицирането и степенуването на заболяването [Osnabrugge, R. L., Mylotte, D., 2013].

За оценка на степента на аортната стеноза използвахме критериите, препоръчани в Ръководството за поведение при пациенти с клапни сърдечни заболявания на АНА и ACC „**2014 АНА/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease**“ [Nishimura R. A. и съавт., 2014] (*табл. 1*):

**Таблица 1: Критерии за оценка на тежестта на аортната стеноза**

Степен на аортната стеноза	Максимална скорост на кръвотока през клапата в систола ( $V_{max}$ )	Среден трансклапен градиент	Планиметрична площ (AVA)
Лека	2,5 – 3 m/s	< 25 mm Hg	> 1,5 до 2 cm <sup>2</sup>
Умерена	3 – 4 m/s	25 – 40 mm Hg	1,5 – 1 cm <sup>2</sup>
Тежка	> 4 m/s	> 40 mm Hg	< 1 cm <sup>2</sup> (или индексирана планиметрична клапна площ $\leq 0,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ тел. повърхност)

Посочените максимални скорости са ориентировъчни и важат основно за пациенти със запазена левокамерна систолна функция. В случаите с тежка калцификация, силно ограничена подвижност на аортната клапа и потисната левокамерна систолна функция (ЛК-ФИ < 50%) и/или нисък дебит (индексиран ударен обем < 35 ml/m<sup>2</sup> тел. повърхност), при определянето на тежестта сме се

ръководели от комплексни критерии, вкл. планиметричната площ (AVA) и тежестта на клапната калцификация.

### ***Генетичен полиморфизъм в LPA-локуса***

Носителите на SNP rs10455872 в интрон 25 на гена, кодиращ липопротеин (a) /Lp(a)/, се обозначават като:

GG-генотип – ако са хомозиготни носители на минорния алел G,

GA- или AG-генотип – ако са хетерозиготи.

AA-генотип – означава липса на носителство на G-алела.

### ***Плазмена концентрация на липопротеин (a)***

Използваната мерна единица е **mg/dl**.

На всички участници в проучването е взета венозна кръв за Lp(a) в отделен стандартен вакутейнер за биохимичен анализ. Плазмената концентрация е определена по ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) метода с ab108878 Lipoprotein A (APOA) Human ELISA Kit на фирма Abcam.

### ***Калцификация на митралния клапен пръстен***

Определена е по ехокардиографски критерии при всички пациенти – като качествен показател. Не сме се интересували от степента на митралната клапна дисфункция (която може да е резултат на различни причини, несвързани с наличието на калцификация или с нейната тежест).

### ***Дилатация на асцендентната аорта***

Диаметърът на асцендентната аорта е измерен от лява парастернална позиция, по дългата ос, в M-mode, с курсор, позициониран над нивото на синусите на Valsalva. За дилатация са приети стойности над 40 mm.

### ***Доказана коронарна болест на сърцето***

Имаме предвид:

- пациенти с инвазивна оценка и данни от коронарната ангиография за сигнификантни (> 50%) стенози на една, две или на трите коронарни артерии;
- пациенти, претърпяли интервенционална коронарна реваскуларизация (PCI) или хирургична реваскуларизация (аорто-коронарен байпас)
- пациенти с преживян миокарден инфаркт, документиран в епикриза от хоспитализация, в която е описано повишаване на сърдечните биомаркери над 99-тия персентил на горната граница на нормата (СК-МВ, тропонин), с ST-T-промени, показателни за нова исхемия и/или поява на нови Q-зъбци, и/или нов ЛББ; данни от ЕхоКГ за нова загуба на

жизнеспособен миокард или нови регионални патологични отклонения в ЛК-кинетика

- ЕКГ и ехокардиографски данни за постинфарктен цикатрикс и/или ЛК-аневризма – и без да е налице медицинска документация за преживявн миокарден инфаркт.

### ***Артериална хипертония***

Оценена е като качествен показател – при анамнестични данни за повишено артериално налягане  $> 140$  mm Hg за систолното и  $> 90$  mm Hg за диастолното и провеждана антихипертензивна терапия, и/или хипертония, установена при измерване на артериалното налягане на а. brachialis, след 5-минутен покой, в седнало положение – посредством трикратни измервания през 2 минути, при изчислени средноаритметични стойности за систолното артериално налягане  $\geq 140$  mm Hg и/или диастолно налягане  $\geq 90$  mm Hg.

### ***Захарен диабет***

Дефиниран като кръвна захар на гладно  $\geq 7$  mmol/l (след поне 8-часова хранителна пауза), или случайна кръвна захар  $\geq 11$  mmol/l със симптоми на диабет, и/или антидиабетна терапия.

### ***Повишена кръвна захар на гладно***

Включва пациенти с кръвна захар на гладно (след поне 8-часова хранителна пауза)  $> 5,6$  mmol/l и  $< 7$  mmol/l, без анамнеза за захарен диабет.

Допълнителни измервания (гликиран хемоглобин, кръвно-захарен профил, орален глюкозотолерантен тест, имунологично определяне на инсулиновите нива и др.) за оценка на метаболитния статус и инсулиновата секреция, респ. резистентност, в настоящото проучване не са правени.

### ***Обезитет***

Оценен качествено – спрямо body-mass индекса (BMI): като обезитетни са класифицирани пациенти с индекс на телесна маса  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. При статистическата обработка не сме вземали предвид степента на затлъстяването.

### ***Хронична бъбречна недостатъчност***

Оценена е по стойностите на серумния креатинин и изчисления креатининов клирънс по формулата на Cockcroft-Gault.

Всички включени в проучването пациенти са с нива на серумния креатинин под 250  $\mu$ mol/l и/или изчислен креатининов клирънс  $> 45$  ml/min, тъй като при напреднала бъбречна недостатъчност (ХБЗ G3b и по-тежко) настъпват вторични промени в калциево-фосфорната обмяна и функцията на паратиреоидните жлези, водещи до повишено отлагане на калций в меките

тъкани, вкл. клапния апарат по механизъм, различен от този при калцифицираща аортна клапна болест с нормални калциево-фосфатни серумни нива.

## Методи

### Документален и социологически метод

#### Анализ на документи

Подробно е проучена историята на заболяването и съпътстващите заболявания, отразени в придружаващата медицинска документация на пациентите (епикризи от болнични пролежавания, фишове с резултати от проведени изследвания и др.).

#### Клиничен метод

**Анамнеза и клиничен статус** – при всички пациенти.

Снета е подробна анамнеза и физикален статус. При наличие на документни и/или клинични данни за аортна клапна стеноза е събрана подробна информация за прояви на сърдечна недостатъчност, ангина пекторис, синкопи; осъществено е детайлно описание на аускултаторните феномени на аортния порок.

#### Електрокардиограма

ЕКГ-12 отвеждания (при скорост на записа 25 mm/s и волтаж 10 mm/mV) е осъществена при всички пациенти към момента на включване в проучването – за оценка на сърдечния ритъм, наличие/отсъствие на ритъмни и проводни нарушения, левокамерна хипертрофия и исхемия/преживян инфаркт.

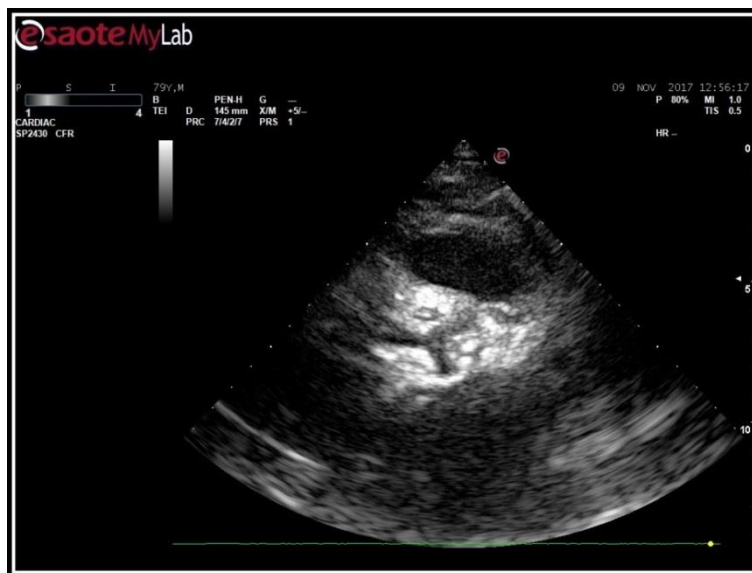
#### Трансторакална ехокардиография

Осъществена е при всички пациенти. Това е основният метод за отдиференциране на пациентите в трите изследвани групи, както и за причисляването им към съответната подгрупа, съобразно тежестта на наличната аортна стеноза.

Трансторакалната ехокардиография е осъществена по стандартна методика с ехокардиографски апарати Phillips HD 7 и Esaote My Lab 7, отговарящи на стандартите на Европейската Асоциация по Ехокардиография (ЕАЕ), с използване на двуразмерна (B-mode), едноразмерна (M-mode) и конвенционална Doppler-ехокардиография (CW-Doppler, PW-Doppler, Colour-Doppler). Пациентите са изследвани в покой, в ляво странично положение.

Измерени са сърдечните размери и обеми, оценена е левокамерната систолна и диастолна функция, състоянието на клапния апарат, аортният корен, възходящата аорта и перикардът.

Калцификацията на аортната клапа е оценена качествено, като всяко наличие на калциеви отлагания върху клапните структури е прието за патологично (Фиг. 1 и 2).



**Фигура 1:** Тежка калцификация на трикуспидна аортна клапа при 79-годишен мъж с високостепенна стеноза, умерена регургитация и практически неподвижни клапни платна (наш случай)



Склероза с калцификация на платната в областта на комисурите на трикуспидна аортна клапа – ехокардиографски образ от лява парастернална позиция – къса ос



Същата клапа в отворено положение – лекоограничен обем на отваряне, без хемодинамично значима обструкция на кръвотока

**Фигура 2:** Склероза и калцификация без стеноза при 47-годишна жена с трикуспидна клапа и фамилна анамнеза за CAVD: майка с високостепенна аортна стеноза, сестра на майката с AVR (наш случай)

Количествената оценка на степента на аортната стеноза е направена с измерване посредством CW-Doppler на пиковия и средния трансклапен градиент и изчисление на планиметричната площ по уравнението за непрекъснатостта. При пациенти с потисната ЛК-сistolна функция (ФИ < 50%), нисък ударен обем (< 35 ml/m<sup>2</sup>) и такива с високостепенна митрална регургитация, при които се очаква разминаване между изчислената и действителната площ на аортния клапен отвор, сме използвали и директно планиметрично измерване на Ао-клапен отвор в систола.

В хода на нашето проучване се установи, че **фотографирането на ехографския образ на аортната клапа от лява парастернална позиция – къса ос и обработката на снимките със специализиран фотообработващ софтуер “PICASA 3” – свободно достъпен в Интернет (<https://picasa.bg.softonic.com/>) дава възможност, чрез визуализиране на т.нар. „топлинна карта“, да се отдиференцират по-ясно огнищата на склероза и калцификация от по-слабо засегнатите или незасегнатите клапни участъци. Калциевите натрупвания се оцветяват в червено, съседните зони на уплътнение и фиброза – в жълто, докато нормалните клапни структури са оцветени в зелено, а кръвта в сърдечните кухини – в мастиленосиньо.**

Към момента „топлинната карта“ е приложена за структурна визуализация на аортната клапа само върху ограничен брой пациенти, и то само в една ехокардиографска проекция – тази, която най-добре изобразява клапата планиметрично. Това свойство на изображенията би могло да се обработи чрез софтуерно кодиране и да се изчисли количествено клапната калцификация, освен това позволява по-добро визуално сравняване на еволюцията на САВД при всеки отделен пациент, проследен във времето (*фиг. 3, 4 и 5*). За клиничното значение на този нов метод, предложен за първи път от нас, са необходими допълнителни проучвания, вкл. сравнителна оценка с друг рефериращ метод, като изчисление на калциевия скор със СТ-скен или MRI и проследяване във времето.

Ограничаващи фактори: методът не е изпробван върху голям брой пациенти, не е сравняван с референтен метод за оценка на калциевия скор.

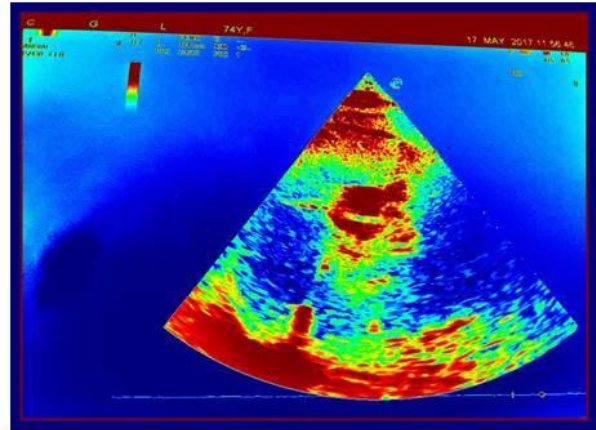
Значението му като допълнение в прогностичната оценка на аортната калцификация и стеноза в дългосрочен план не е оценявано.

Трудно приложим е при пациенти с лош акустичен прозорец в лява парастернална позиция – къса ос.





**Масивна калцификация на бикуспидна аортна клапа**

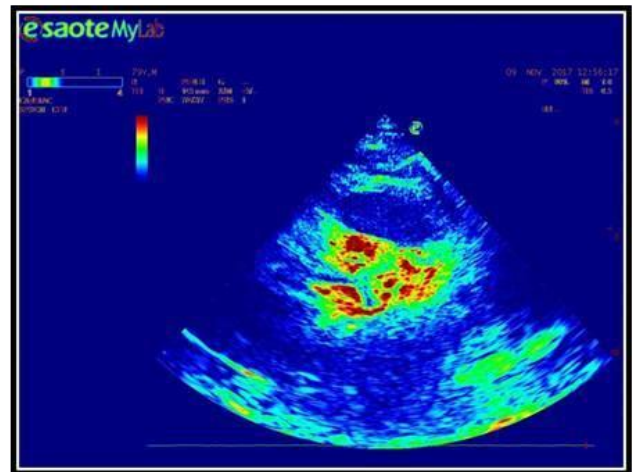


**Масивна калцификация на бикуспидна аортна клапа – „топлинна карта“**

*Фигура 3: „Топлинна карта“ на ехокардиографския образ на калцирала бикуспидна аортна клапа от лява парастернална позиция, къса ос (наш случай)*



**Калцификация на трикуспидна аортна клапа – ехокардиографски образ от лява парастернална позиция – къса ос**

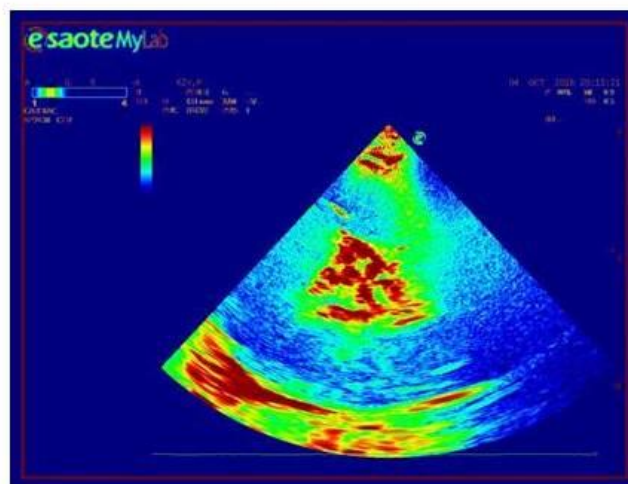


**Калцификация на трикуспидна аортна клапа – „топлинна карта“ (огнищата на минерализация са оцветени в червено)**

*Фигура 4: „Топлинна карта“ на ехокардиографския образ на калцирала трикуспидна аортна клапа от лява парастернална позиция, къса ос (случаят, представен на фиг. 1)*



**Калцификация на четирикуспидна аортна клапа – ехокардиографски образ от лява парастернална позиция – къса ос**



**Калцификация на четирикуспидна аортна клапа – „топлинна карта“ (огнищата на минерализация са оцветени в червено)**

*Фигура 5: „Топлинна карта“ на ехокардиографския образ на калцирала квадрикуспидна аортна клапа от лява парастернална позиция, къса ос (наш случай)*

### **Инвазивна оценка**

Осъществена е при преобладаващата част от пациентите – 88,5%.

Инвазивната оценка включва лява сърдечна катетеризация със селективна коронарна ангиография.

При част от пациентите с клинични и ехокардиографски данни за умерена или високостепенна аортна стеноза е осъществено инвазивно измерване на трансклапния peak to peak градиент, а при съмнение за хемодинамично значима аортна регургитация – и аортография.

### **Лабораторни методи за биохимичен анализ на серумни показатели**

Изследвания на биохимични показатели за оценка на сърдечно-съдовия риск са осъществени при всички пациенти. Измерванията са чрез кръвна проба от венозна кръв, взета на гладно (след поне 8-часово неприемане на храна).

- **Глюкоза** – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на глюкозата над 5,6 mmol/l.
- **Общ холестерол** - отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на общия холестерол над 5,6 mmol/l.
- **LDL-холестерол** - отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на LDL-холестерола над 3,4 mmol/l.

- **HDL-холестерол** - отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на HDL-холестерола под 1,0 mmol/l.
- **Триглицериди** - отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на триглицеридите над 1,7 mmol/l.
- **Креатинин** – отчетените стойности са в mcmol/l.

Както вече беше посочено, пациенти със серумен креатинин над 250 mcmol/l не са включвани в проучването.

### **ELISA-метод за определяне на липопротеин А**

Количествено определяне на серумните нива липопротеин А при всичките 156 пациенти, включени в проучването, се извърши в лаборатория на Сектор „Биология” към Медицински университет – Плевен, посредством „сандвич“ ELISA-метод, с Lipoprotein A (APOA) Human ELISA Kit, фирма Abcam, по указания на производителя.

### **Материали и методи за ДНК-анализ на генетични варианти**

Генетичните изследвания са осъществени в Университетска лаборатория за научни изследвания, МУ – Плевен и включват три етапа:

*I етап:* Изолиране и съхранение на ДНК от всичките 156 участници в проучването

*II етап:* ДНК – генотипиране на A/G полиморфизма (rs 10455872) в интрон 25 на гена, кодиращ липопротеин(а) с TaqMan - метод, базиран на платформата PicoReal 96 – Real-time PCR);

*III етап:* Използване на независим потвърждаващ метод – High Resolution Melting Analysis (HRMA) на алелна дискриминация.

Изолирането на ДНК от венозна кръв осъществихме чрез солево екстрахиране, като използвахме комерсиални китове за изолиране на ДНК от периферна кръв „AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit” – BIONEER, по утвърдени лабораторни протоколи и препоръки на производителя.

Извършихме генотипиране на A>G полиморфизма (rs 10455872) в интрон 25 на гена, кодиращ липопротеин (а) /Lp(a)/, с TaqMan - метод TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay (Life Technologies), с използване на платформата PicoReal 96 – Real-time PCR и последващ анализ на алелните профили, отчитани с помощта на специализиран софтуер (Thermoscientific).

Използвахме TaqMan®Genotyping Master Mix(Life Technologies) – TaqMan – PCR – 5`-екзонуклеазна полимеразна верижна реакция за амплификация и

детекция на специфични полиморфизми в пречистена геномна ДНК с флуоресцентно белязани алел-специфични олигонуклеотидни сонди: FAM – белязана сонда за алел А и VIC – белязана сонда за алел В.

### Статистически методи

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 23.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието  $p < 0.05$ .

Бяха приложени следните статистически методи: **Дескриптивен анализ** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване. **Вариационен анализ** – изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване. **Графичен анализ** – за визуализация на получените резултати. **Алтернативен анализ** – за сравняване на относителни дялове. **Точен тест на Фишер (Fisher) и тест  $\chi^2$**  - за проверка на хипотези за наличие на връзка между категоријни променливи. **Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk)** – за проверка вида на разпределението. **Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA** – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки. **T-тест на Стюдънт (Student's t test)** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки. **Непараметричен тест на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis)** – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки. **Непараметричен тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney)** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки. **Бинарна и мултиноминална логистична регресия** – за количествена оценка на влиянието на изследваните фактори. **ROC крива** – за определяне прагови стойности на количествени признаци с цел класификация на определени състояния.

За оценяване **валидността** на скринирация (диагностицирация) тест се използват следните критерии [Шипковенска, Е. и съавт., 2002]: чувствителност; специфичност; положителна предсказваща стойност; отрицателна предсказваща стойност; прецизност (% на верните отговори).

Възможните резултати от теста са посочени на **табл. 2**.

**Таблица 2: Възможни резултати от теста**

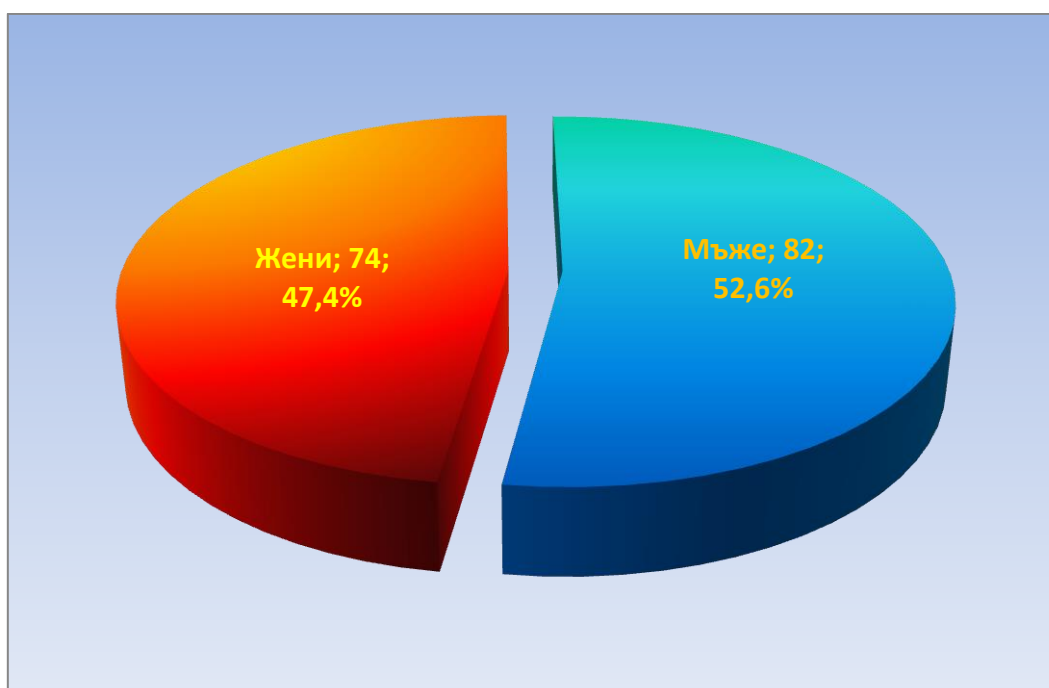
Резултати от теста	Със заболяване	Без заболяване	Общо
Положителен	a истински положителни	b фалшиво положителни	a+b

Отрицателен	c фалшиво отрицателни	d истински отрицателни	c+d
Общо	a+c	b+d	a+b+c+d

## РЕЗУЛТАТИ

### Характеристика на целия изследван контингент по демографски показатели

От обхванатите общо 156 пациенти, 82 (52,6%) са мъже и 74 (47,4%) жени (*фиг. 6*). Средната възраст на изследваната група е  $70,67 \pm 7,75$  години, в интервала между 50 и 91 г.

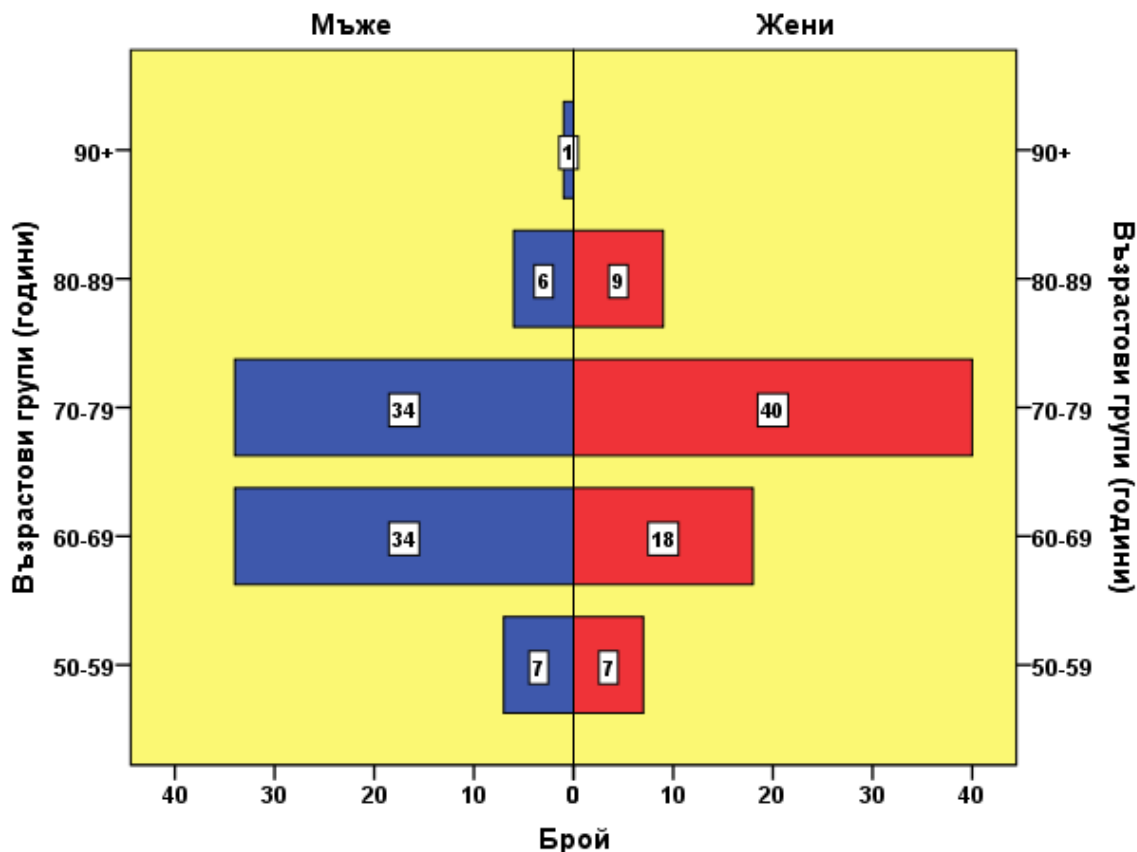


*Фигура 6: Честотно разпределение на изследвания контингент по полова принадлежност*

Разпределението по възраст и пол едновременно е представено на *фиг. 7*. От нея се вижда, че:

- Най-голям брой пациенти (34) при мъжете са от възрастовите групи 60-69 и 70-79 години, следвани от възрастовата група 50-59 години (7). Най-малко са във възрастовата група 90+ години (1);

- При жените най-много пациенти са от възрастова група 70-79 години – 40, следвани от тези между 60-69 г. (18). Най-малко (7) са от възрастова група 50-59 години, а във възрастова група 90+ години участнички в проучването липсват.



Фигура 7: Разпределение на изследвания контингент по пол и възрастови групи

### Базисни характеристики на трите групи

За целите на проучването изследваният контингент беше разделен на три групи (описани подробно в главата „Материал и методи“ – „Клиничен контингент“):

*I група* – 42 контроли – участници в проучването, при които липсват данни за аортна клапна калцификация и/или стеноза (т.е. пациенти с морфологично нормална аортна клапа);

*II група* – 30 пациенти с калцифицирана аортна клапа, но без стеноза;

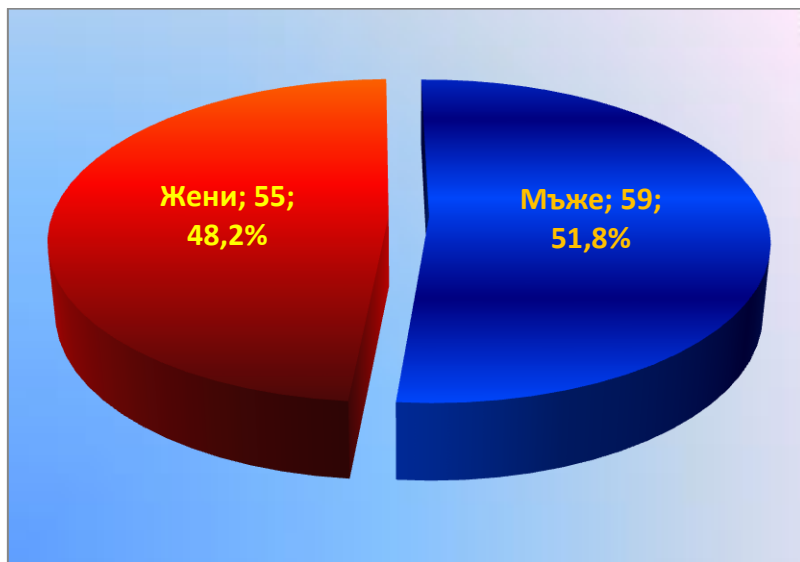
*III група* – 84 пациенти с калцифицирана аортна клапа, със стеноза.

Трите изследвани групи се различават сигнификантно по възрастта, която е значимо по-висока при имащите калцифицирана аортна клапа със стеноза. Няма статистически значимо различие по пол между лицата с CAVD и контролите.

## Вътрегрупов анализ на демографски и някои клинични показатели при пациентите с САВД (група II + III)

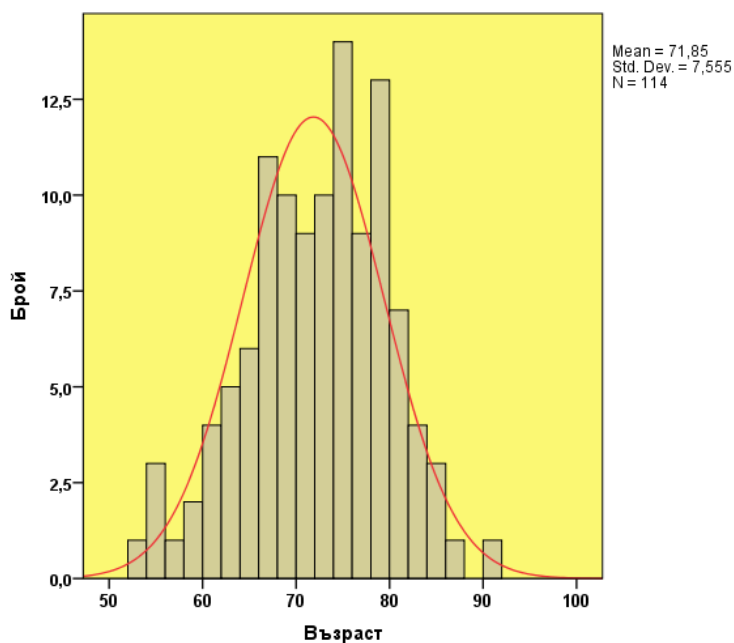
### Разпределение по пол и възраст

От **фиг. 8** става ясно, че пациентите с САВД са 114, от които 59 (51,8%) мъже и 55 (48,2%) жени.



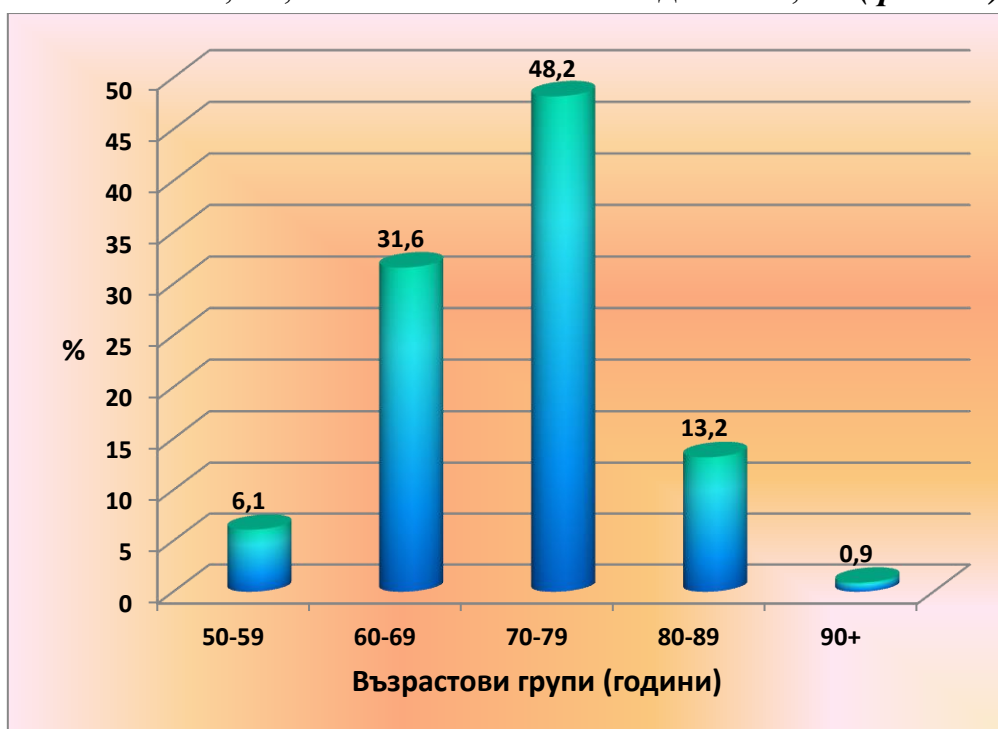
**Фигура 8:** Честотно разпределение на пациентите с САВД по пола принадлежност

Според представената хистограма с крива на нормалното разпределение (**фиг. 9**) и теста на Колмогоров-Смирнов, възрастта на пациентите с САВД има нормално разпределение.



**Фигура 9:** Честотно разпределение на пациентите с САВД по възраст

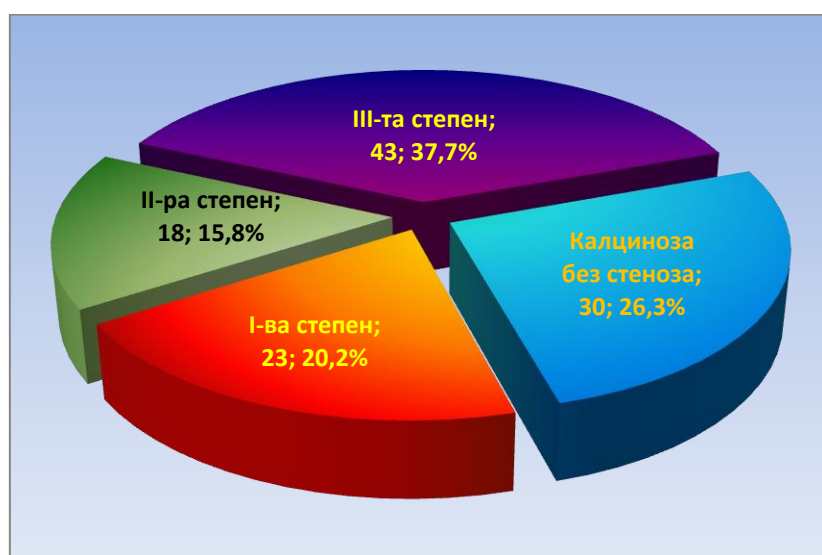
С най-голям относителен дял (48,2%) е възрастова група 70-79 години, следвана от 60-69 с 31,6%, а с най-малък – 90+ години с 0,9% (*фиг. 10*).



*Фигура 10: Честотно разпределение на пациентите с CAVD по възрастови групи*

### Разпределение според характеристиката на CAVD

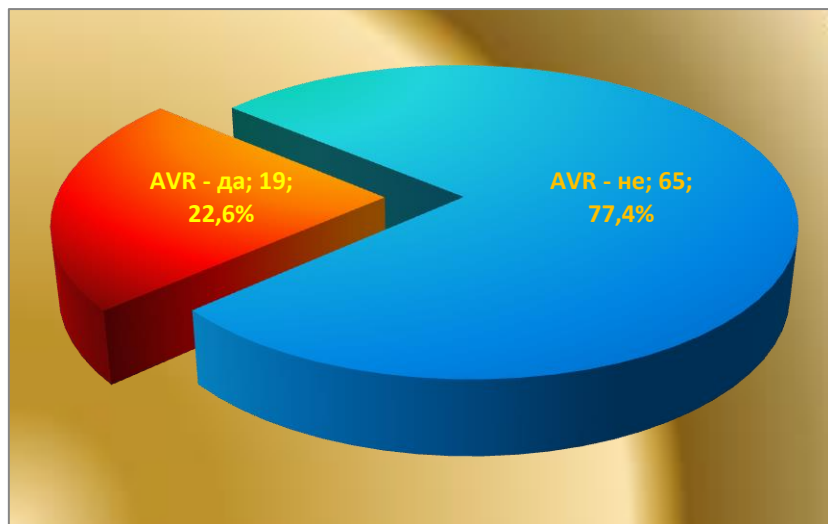
На *фиг. 11* се вижда, че с най-голям относителен дял (37,7%) са пациентите с високостепенна калцифицираща аортна стеноза, следвани от тези с калциноза на клапата без формирана хемодинамично значима стеноза (26,3%). С най-малък относителен дял са пациентите с умерена аортна стеноза – 15,8%.



*Фигура 11: Процентно съотношение на пациентите с 4-те степени на CAVD*

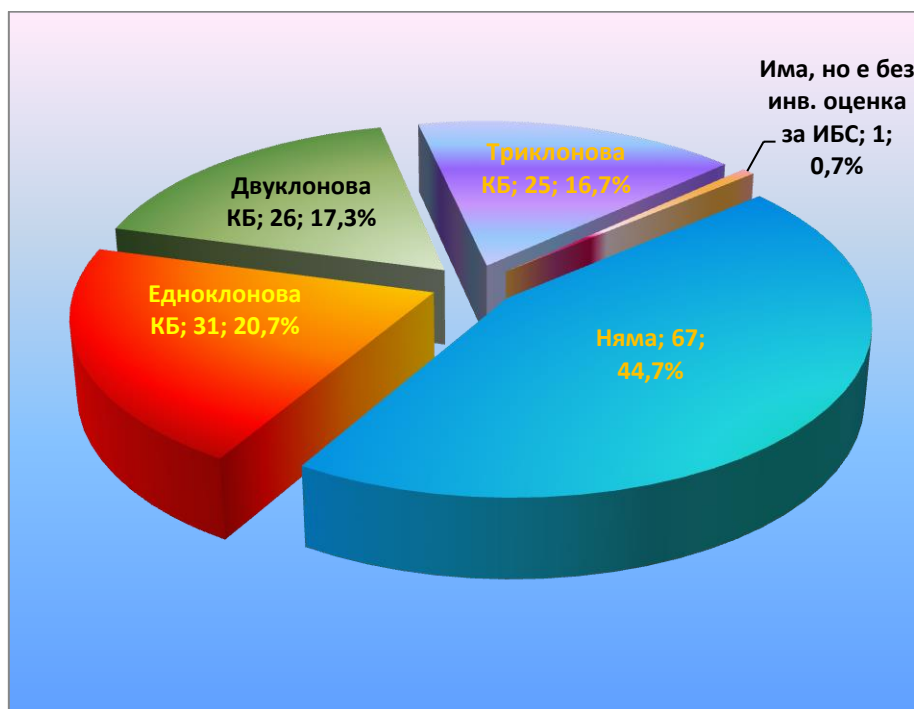
Клапно протезирани са близо  $\frac{1}{4}$  от пациентите (19 или 22,6%) с калцифицираща аортна стеноза (*фиг. 12*).





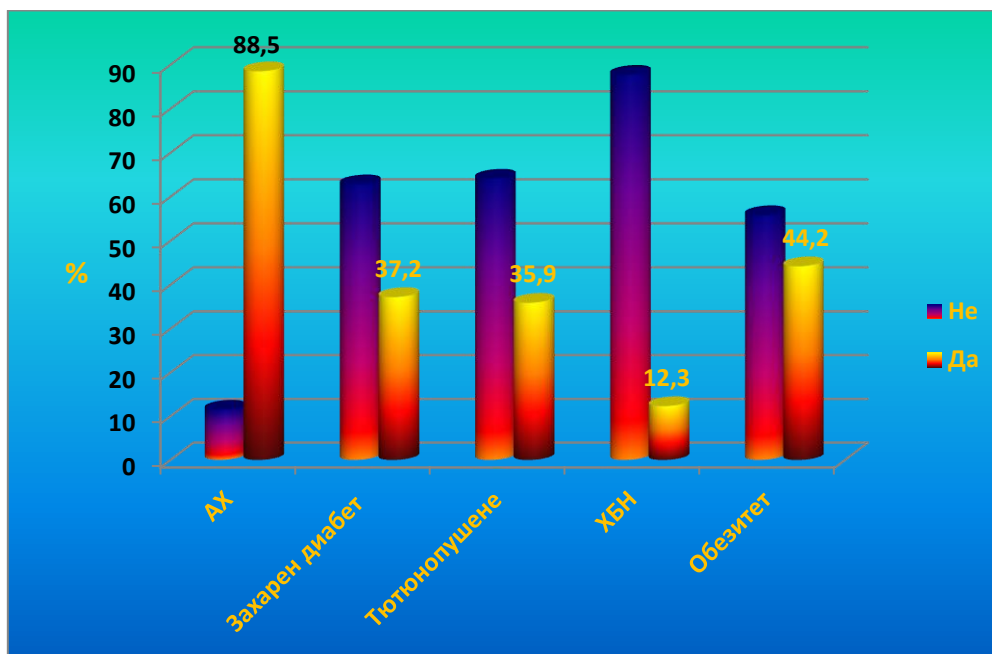
**Фигура 12:** Честотно разпределение на пациентите от група III с и без аортно клапно протезиране

Почти половината (49,4%) от изследвания контингент има съпътстваща калциноза на митралната клапа (предимно калцификация на пръстена). Малко под 1/3 (30,8%) имат съпътстваща дилатация на възходящата аорта. Според наличието/отсъствието на коронарна болест на сърцето (КБС), разпределението на пациентите с САВД е следното: с най-голям относителен дял (44,7%) са пациентите без КБС, следвани от тези с едноклонова коронарна болест (20,7%). Най-малък е дялът на пациентите с триклонова коронарна болест (16,7%) (*фиг. 13*).



**Фигура 13:** Разпределение на пациентите с САВД според наличието/отсъствието на коронарна болест на сърцето (КБС) и нейната тежест

Останалите общоприети фактори на сърдечно-съдовия риск са представени разнородно при пациентите с CAVD, като най-висок е дялът на артериалната хипертония, следван от обезитета, захарния диабет и тютюнопушенето (*фиг. 14*).

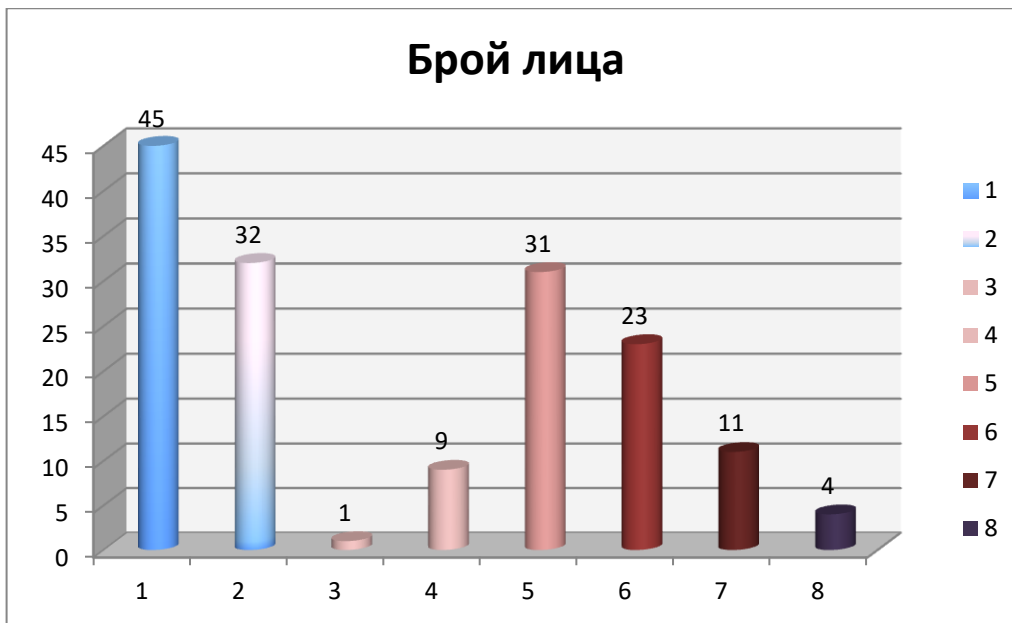


*Фигура 14: Разпределение на пациентите с CAVD според наличието/отсъствието на изследваните рискови фактори*

## Плазмена концентрация на липопротеин (а)

### Особености в разпределението на плазмените нива на Lp(a) сред всички изследвани лица

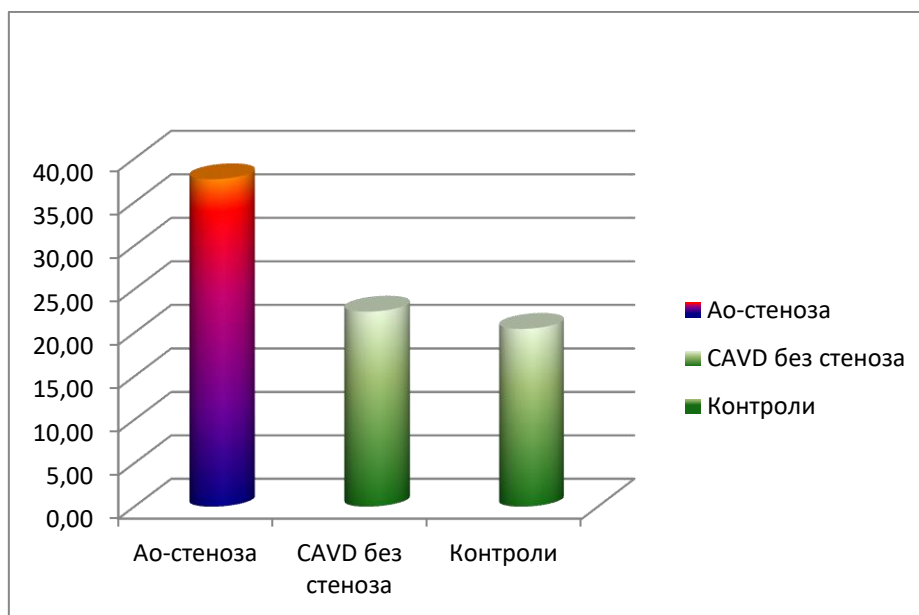
Установихме, че нивото на Lp(a) при изследваните лица показва значителна хетерогенност: най-ниската измерена концентрация е 15,4 mg/dl, най-високата – 56,7 mg/dl, средната – 30,1 mg/dl, като величината не показва Гаус-Лапласово разпределение (*фиг. 15*). **Не открихме концентрации на Lp(a) над 57 mg/dl дори в групата с най-висока вероятност за такава:** лица-хомозиготи по минорния G-алел на rs10455872, с тежка калцифицираща аортна стеноза. Този резултат изисква проучвания върху по-голям брой пациенти, за да се изясни дали става дума за етнически различия, или дискрепансът произтича от особеностите на използвания лабораторен метод. Така напр. в проучването Framingham Heart Study (FHS) плазмената концентрация на Lp(a) е измервана чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ [Jenner, J. L. и съавт., 1993], а в проучването Age, Gene/Environment Susceptibility–Reykjavik Study (AGES-RS) – чрез турбидиметричен имуноен анализ (Denka Seiken) [Thanassoulis, G., 2013], докато ние използвахме ELISA-метод.



**Фигура 15:** Разпределение на участниците в проучването в 8 категории, в зависимост от плазменото ниво на Lp(a):

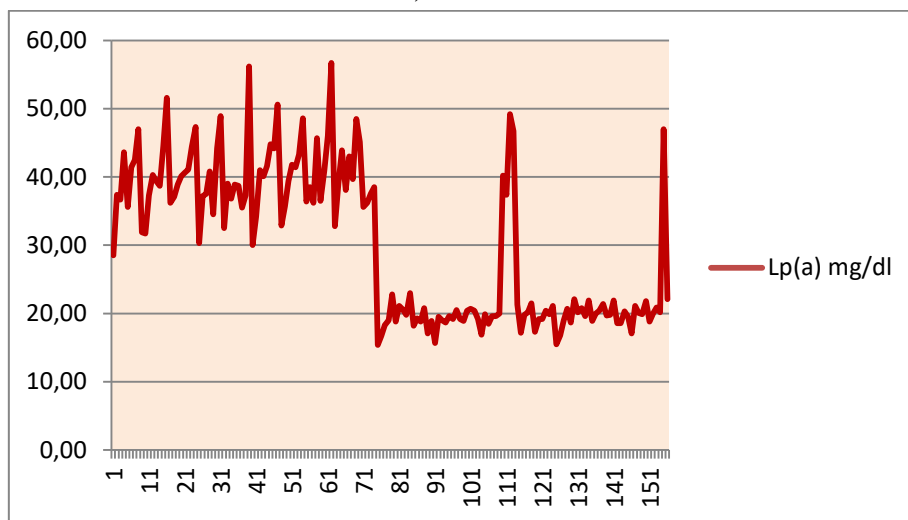
1. 15,00 – 19,99 mg/dl; 2. 20,00 – 24,99 mg/dl; 3. 25,00 – 29,99 mg/dl; 4. 30,00 – 34,99 mg/dl; 5. 35,00 – 39,99 mg/dl; 6. 40,00 – 44,99 mg/dl; 7. 45,00 – 49,99 mg/dl; 8. > 50 mg/dl

В нашето проучване в групата с аортна стеноза средната плазмена концентрация на Lp(a) е **38,7 mg/dl**, докато между лицата с калцификация без стеноза и тези с морфологично нормална аортна клапа, разликата е статистически незначима и средната концентрация на Lp(a) в сборната им група е **19,8 mg/dl** (фиг. 16).



**Фигура 16:** Средно плазмено ниво на Lp(a) при пациенти с аортна стеноза, с клапна склероза и калцификация без стеноза и с морфологично нормална аортна клапа

Установихме, че в цялата извадка при  $Lp(a) > 23 \text{ mg/dl}$  има само един здрав участник в проучването. Всички останали са с САVD, КБС и/или калцификация на МК-пръстен („пиковете“ сред пациентите с морфологично нормални аортни клапи в дясната част на графиката на *фиг. 17* са двама мъже с калцификация на митралния клапен пръстен в комбинация с триклонова КБС; 1 с калцификация на МК-пръстен без обструктивна коронарна болест и 1 – с триклонова КБС без данни за клапно заболяване. Последният пик в края на графиката е на жена на 65 г., попаднала в групата на контролите, която е с изява на начална САVD 2 години по-късно).



*Фигура 17: Крива на стойностите на  $Lp(a)$  сред всички участници в проучването. Пациентите с номера от 1 до 84 са с аортна стеноза, от 85 до 114 са с САVD без патологичен трансклапен градиент, от 115 до 156 са контроли с морфологично нормална аортна клапа.*

### Роля на носителството на rs10455872 полиморфизма в интрон 25 гена, кодиращ $Lp(a)$ за възникване на калцифицираща аортна клапна болест

С помощта на дескриптивна статистика изследвахме ролята на rs10455872 полиморфизма за възникване на калцифицираща аортна клапна болест, като анализирахме честотата на носителството на G-алела между пациентите с всякаква форма на САVD, от една страна, и контролите със структурно нормална аортна клапа, от друга. Тъй като съществуваше статистически значима разлика между групата на болните и контролата по отношение на фактора „възраст“, с цел уеднаквяване от анализа са изключени общо 10 лица – най-възрастните 6 лица от таргетната група и най-младите 4 лица от контролата. От останалите 146 пациенти, 38 са контроли (пациенти с морфологично и функционално нормална аортна клапа) и 108 са пациенти, при които са налице ехокардиографски данни за САVD.

**Таблица 3: Кростабулация: Генотип/изследвани лица**

			Изследвани лица		Общо
			Болни	Контрола	
<b>Генотип</b>	Наличие на поне един G-алел /rs10455872	Брой	21	2	23
		% в изследваната група	19,4%	5,3%	15,8%
Хомозиготен AA-генотип		Брой	87	36	123
		% в изследваната група	80,6%	94,7%	84,2%
		Общо	108	38	146
		% в изследваната група	100,0%	100,0%	100,0%

Данните показват, че 19,4% от пациентите с CAVD и 5,3% от контролите имат поне един G-алел (**таблица 3**). Проведеният Pearson  $\chi^2$ -тест сочи наличие на асоциация между носителството на rs10455872 полиморфизма и сърдечно-съдовото заболяване ( $\chi^2=4,259$ ,  $p=0,039$ ).

Силата на асоциацията беше установена въз основа на показателя съотношение на шансовете (OR), който в случая е равен на отношението на шанса да има заболяване при наличие на мутантен алел към това да има заболяване при липса на мутация (**таблица 4**). От таблицата се вижда, че доверителният интервал за Odds е  $OR = 4,345$  (95% CI 0,968 – 19,501). Това означава, че при лица с носителство на поне един G-алел (rs10455872) е повече от 4 пъти по-вероятно да се наблюдава калцифицираща аортна клапа болест, отколкото при лица с хомозиготен AA-генотип.

**Таблица 4: Оценка на риска за изява на CAVD при носителство на G-алела / rs10455872**

	Стойност	95% доверителен интервал	
		Долна граница	Горна граница
OR при наличие на поне един G алел / rs10455872 спрямо хомозиготен AA-генотип	4.345	0.968	19.501
За групата на пациентите с CAVD	1.291	1.089	1.530
За контролната група	0.297	0.077	1.149
Брой изследвани случаи	146		

**Няма статистически достоверна зависимост между генотипа и различните степени на аортната стеноза.**

Беше направен анализ на връзката между *rs10455872*-полиморфизма (хомо- и хетерозиготи – GA, AG и GG-генотип) и наличието на калций по левите сърдечни клапи (всякакви форми на САVD и/или калцификация на митралния клапен пръстен) в цялата извадка от 156 лица, като резултатите сочат сигнификантна връзка между наличието на минорния G-алел и развитието на калцификация на левите сърдечни клапи (Pearson Chi-Square=5.171, p=0.023).

### Оценка на връзката между тежестта на САVD, плазмените нива на Lp(a) и някои общоприети рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания

Потърсихме отговор на въпроса съществува ли зависимост между **тежестта на САVD** и: плазмените нива на Lp(a); пола; възрастта; наличието на КБС и нейната тежест; наличието на дилатация на възходящата аорта; наличието на артериална хипертония; наличието на захарен диабет; серумната глюкоза на гладно; тютюнопушенето; наличие на начална ХБН; серумния креатинин; наличие на обезитет; общия холестерол; LDL-холестерола; HDL-холестерола; триглицеридите.

За целта осъществихме вътрегрупов анализ само на пациентите с САVD (114 лица), които разпределихме в 4 подгрупи:

- I. Калциноза на аортната клапа без значима стеноза (30 пациенти);*
- II. Лекостепенна аортна стеноза (23 пациенти);*
- III. Умерена аортна стеноза (18 пациенти);*
- IV. Високостепенна аортна стеноза или аортно клапно протезиране по повод на високостепенна неревматична аортна стеноза (43 пациенти).*

Статистически значима разлика между пациентите с различни степени на САVD се установява единствено при показателя **плазмени нива на Lp(a)** – пациентите със стеноза са със значимо по-високи средни стойности в сравнение с тези САVD без стеноза. Всички останали конвенционални рискови фактори за ССЗ не показват сигнификантни разлики при пациенти със субклинични и клинично проявени форми на аортна клапна калцификация.

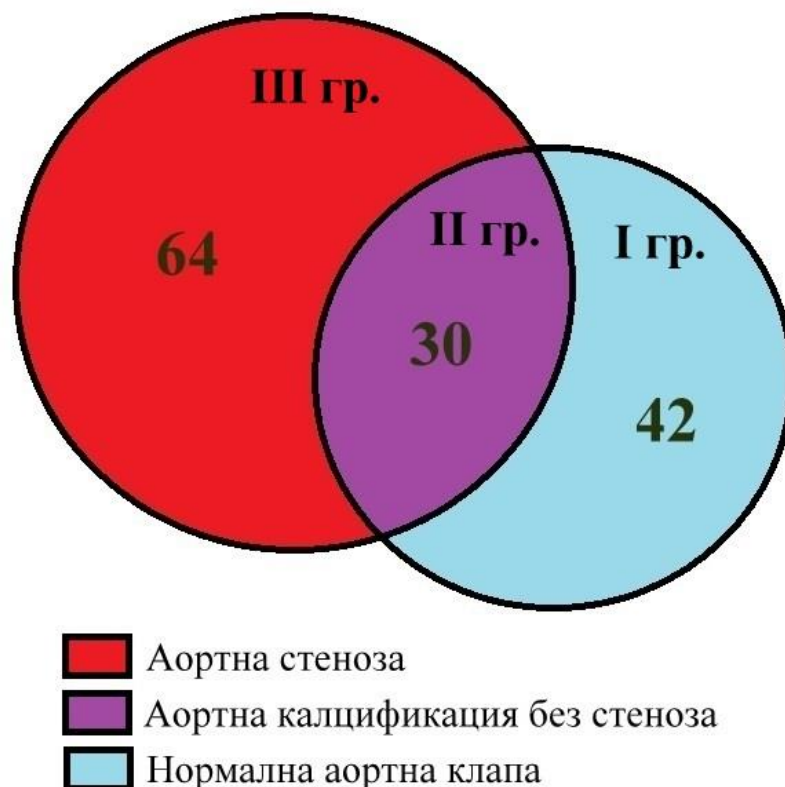
## Междугрупов анализ на рисковите фактори при пациентите с нормална аортна клапа, аортна клапна калциноза без хемодинамично значима стеноза и с формирана аортна стеноза

За да отдиференцираме факторите, инициращи появата на САВД и еволюцията ѝ към клинично значима аортна стеноза след елиминиране на „замъгляващия“ фактор възраст, прегрупирахме изследвания контингент, като изключихме от групата на пациентите с аортна стеноза най-възрастните 20 и получихме нови 3 подгрупи, статистически уеднаквени по възраст (фиг. 18):

*Група I (контроли - без данни за аортна клапна болест) – 42 пациенти;*

*Група II (аортна калцификация без стеноза) – 30 пациенти;*

*Група III (калцифицираща аортна стеноза) – 64 пациенти.*

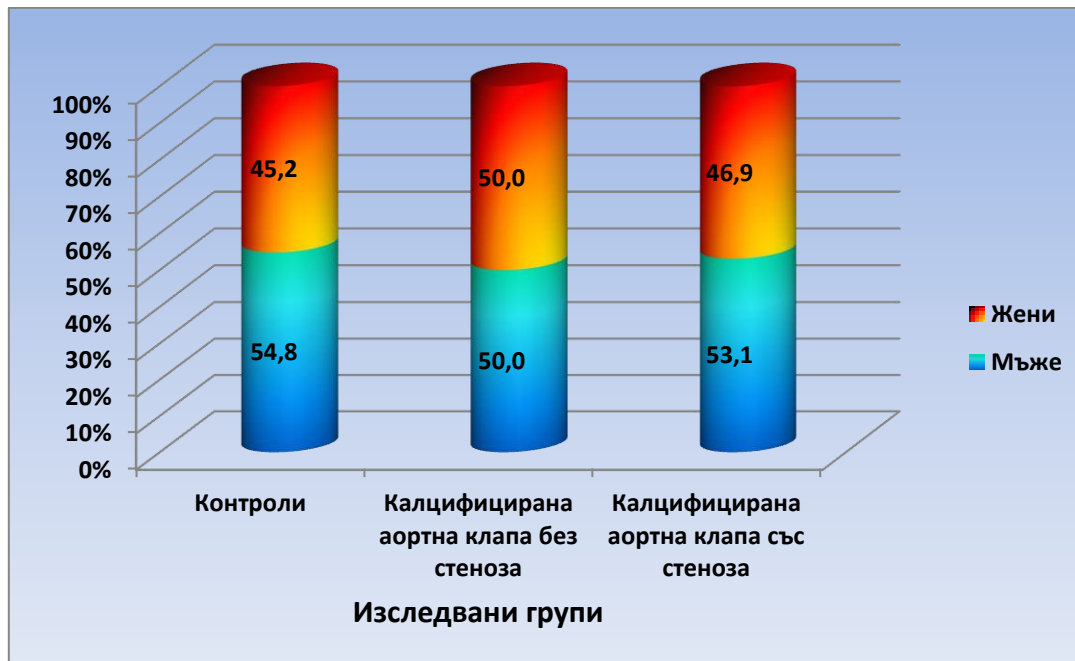


*I + II гр. = пациенти без аортна стеноза (без или с САВД)*

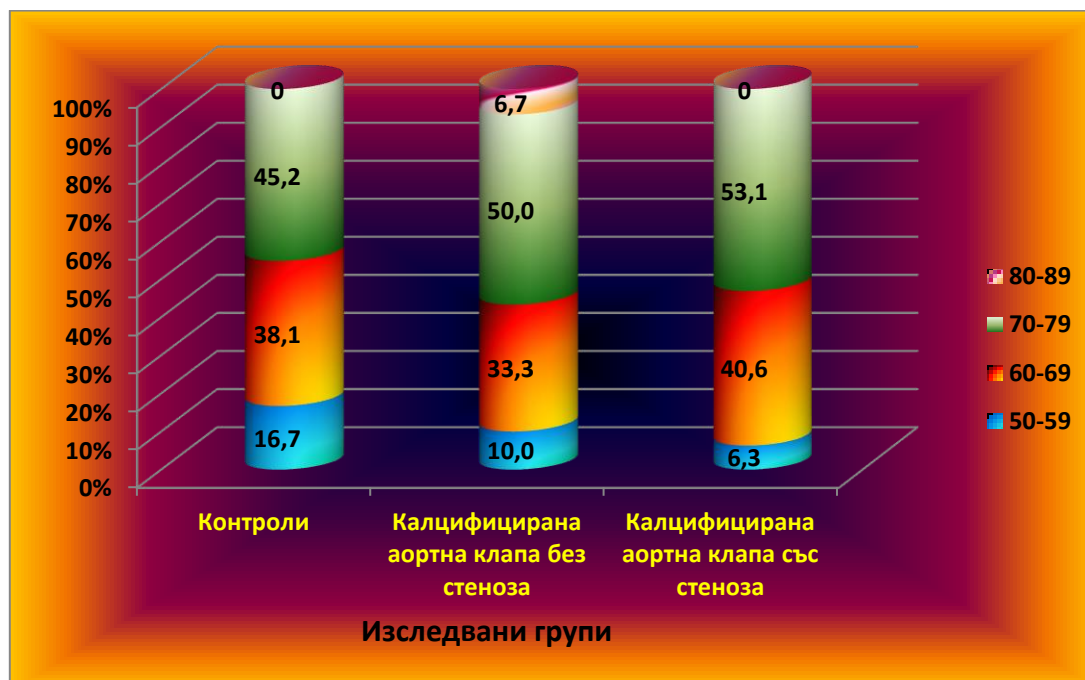
*II + III гр. = пациенти с САВД (без или с аортна стеноза)*

*Фигура 18: Трите сравняеми групи участници в проучването: с аортна стеноза, с нормална аортна клапа и „междинна“ група с калцификация на аортната клапа, без формирана хемодинамично значима стеноза*

Разпределението по пол на пациентите, включени в трите статистически уеднаквени по показателя „възраст“ групи, е представено на *фиг. 19*, а честотното им разпределение по възрастови групи – на *фиг. 20*. От графиката личи, че преобладаващият брой пациенти с аортна стеноза са в осмата декада от живота, следвани от тези – в седмата.



*Фигура 19: Честотно разпределение на пациентите от изследваните групи по пола принадлежност*



*Фигура 20: Честотно разпределение на пациентите по възрастови групи*



Сравнителният анализ на трите групи **не показва статистически значими разлики по показателите:** захарен диабет; хипергликемия на гладно; тютюнопушене; плазмен креатинин; общ холестерол; HDL-холестерол; употреба на статини.

**Артериалната хипертония е със значимо по-висок относителен дял при пациентите с аортна клапна калциноза без стеноза спрямо тези с калцифицирана аортна клапа със стеноза (с еволюцията на аортната клапна склероза и калцификация без стеноза към хемодинамично значима обструкция на ЛК-изходен тракт, честотата на артериалната хипертония намалява).**

**Относно обезитета – честотата на лицата с  $BMI \geq 30$  е най-ниска в групата с аортна стеноза. Останалите две групи не се различават статистически помежду си по този показател.**

**Триглицеридите имат по-високи стойности в контролната група, което кореспондира с по-високата честота на обезитета при тези пациенти. Интересна зависимост се установи при сравняване на серумното ниво на LDL-холестерола: пациентите с всякаква форма на CAVD (гр. II + III) имат статистически достоверно по-висок LDL-C: 2.82 (2.09 – 3.57) спрямо контролната група - 2.22 (1.97 – 3.20) ( $p=0.022$ ), но нивата на LDL-C при пациентите с CAVD без стеноза и тези с аортна стеноза не показват статистически значима разлика. Широката употреба на липидопонижаващи средства във всички изследвани групи, обаче, прави анализа на LDL-C и триглицеридите неубедителен.**

**Установихме, че пациентите с калцифицираща аортна стеноза имат значимо по-висока средна стойност на плазмените нива на Lp(a) спрямо останалите две групи, които не се различават статистически по този показател (таблица 5). Фактът, че статините не оказват влияние върху плазменото ниво на Lp(a), прави резултатите достоверни. Пациентите с хемодинамично значима калцифицираща аортна стеноза от всички степени на тежест (лека, умерена и тежка) имат сигнификантно по-високи стойности на плазмените нива на Lp(a) спрямо лицата с калциноза на аортната клапа, без формирана стеноза (таблица 6, фиг. 21).**

**Клиничното значение на този факт е, че определено ниво на Lp(a) може да се използва като „cut-off level“ – параклиничен тест за ранно отдиференциране на двете групи предсказване на еволюцията на калцинозата от състояние без стеноза към развитие на аортна стеноза.**

**Таблица 5: Сравнителен анализ на изследваните групи по плазмените нива на Lp(a) (mg/dl)**

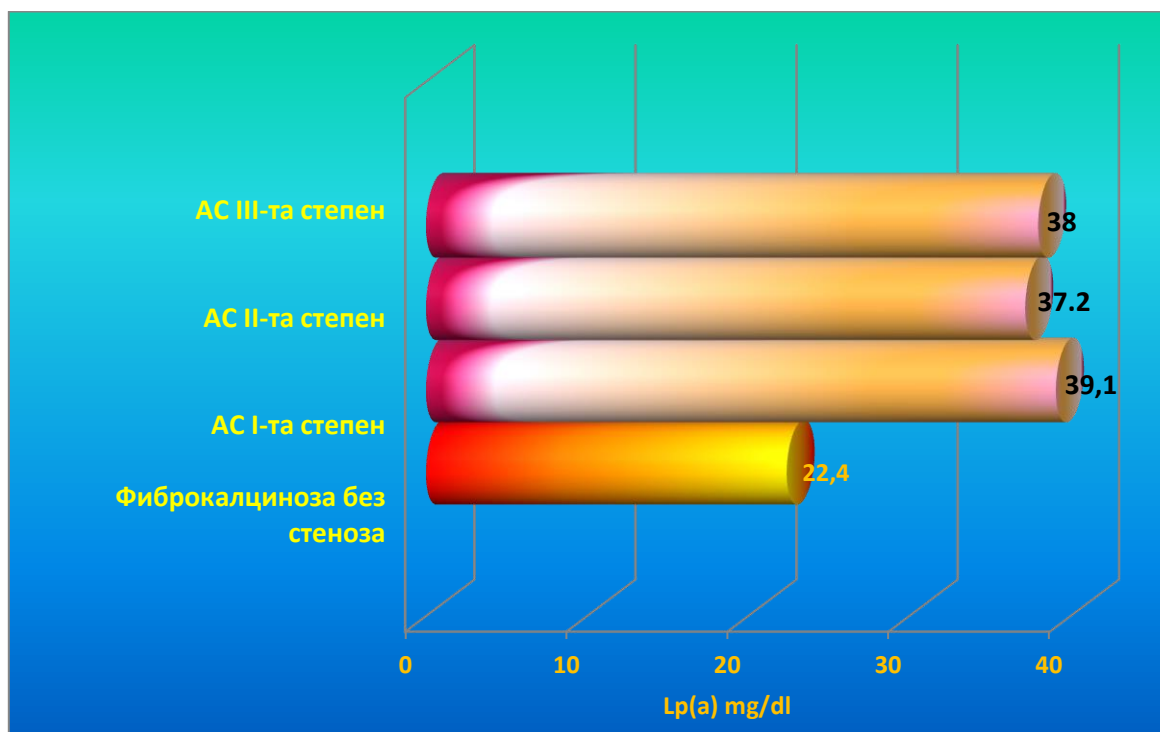
Група	n	$\bar{X}$	SD
Контроли	42	20,5 <sup>a</sup>	4,4
Калцифицирана аортна клапа без стеноза	30	22,4 <sup>a</sup>	8,6
Калцифицирана аортна клапа със стеноза	64	32,1 <sup>b</sup>	8,9

\* - еднаквите букви означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ( $p < 0,05$ )

**Таблица 6: Сравнителен анализ на плазмените нива на Lp(a) (mg/dl) при изследваните групи по степени на аортна стеноза**

Група	n	$\bar{X}$	SD
Фиброкалциноза без стеноза	30	22,4 <sup>a</sup>	8,6
АС I-ва степен - лека	15	39,1 <sup>b</sup>	7,6
АС II-ра степен - умерена	15	37,2 <sup>b</sup>	7,6
АС III-та степен – тежка (или AVR)	34	38,0 <sup>b</sup>	5,0

\* - еднаквите букви означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ( $p < 0,05$ )



**Фигура 21: Сравнителен анализ на плазмените нива на Lp(a) (mg/dl) при изследваните групи по степени на аортна стеноза**

## Количествена оценка на факторите, влияещи върху риска за развитие на калцифицирана аортна клапа със стеноза

Получените дотук резултати показват, че в повечето случаи групата с калцифицирана аортна клапа без стеноза не се различава статистически от контролите. Това дава възможност да се приложи бинарен логистичен регресионен анализ с две категории на резултативната променлива – *контроли* и *пациенти с калцифицирана аортна клапа със стеноза*. Поради това, че Lp(a) като един от малкото показатели, по които се различават статистически изследваните групи, има честотно разпределение, различно от нормалното, се наложи да приложим метода на ROC кривата, за да установим праговата му стойност. Другият показател – възрастта, има нормално разпределение, но въпреки това потърсихме възможността за определяне на прагова стойност.

От *фиг. 22 и 23* става ясно, че и двете променливи имат **сигнификантна прагова стойност, позволяваща да се отграничат пациентите с калциноза и аортна стеноза от контролите. За Lp(a) това е величината 21 mg/dl, а за възрастта – 66 години.** При тези прагови стойности на разглежданите показатели стойностите на критериите за валидизация имат не особено високи, но приемливи стойности при възрастта и високи стойности при Lp(a) (*таблица 7*).

Прилагането на бинарната логистична регресия даде следните резултати:

### *В индивидуален план*

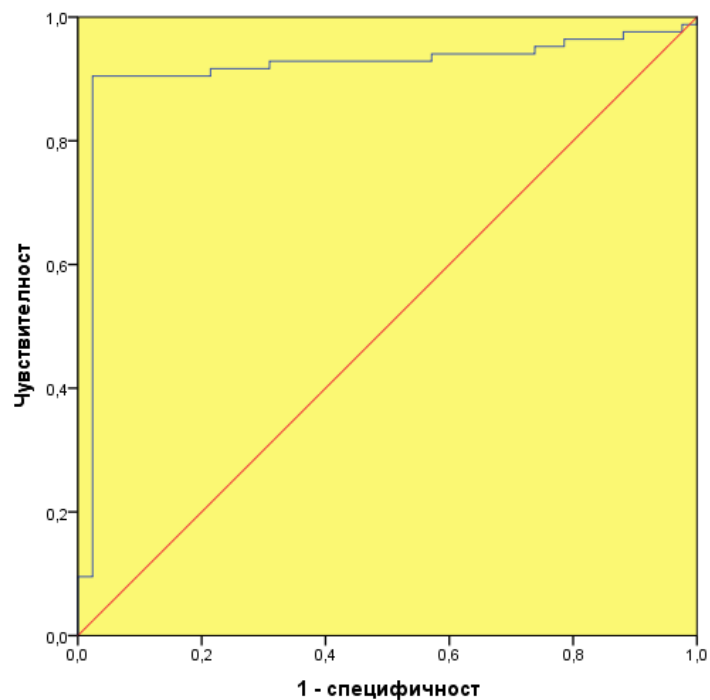
На *таблица 8* се вижда, че:

- При имащите плазмено ниво на Lp(a)  $\geq 21$  mg/dl спрямо тези с по-малка стойност, рискът за възникване на калцифицирана аортна клапа със стеноза е около **35 пъти по-висок**;
- При лицата с BMI < 30 спрямо имащите обезитет рискът за възникване на калцифицирана аортна клапа със стеноза е около **3,3 пъти по-висок**;
- При имащите възраст 66+ години спрямо тези с по-малка, рискът за възникване на калцифицирана аортна клапа със стеноза е около **3 пъти по-висок**, а увеличението на възрастта с една година увеличава този риск с около **10%**.

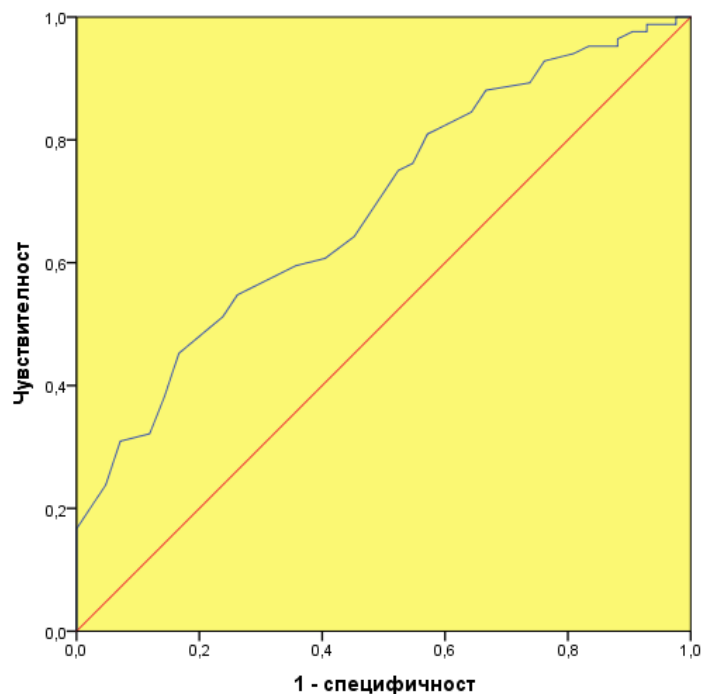
### *В групов план*

От *таблица 8* става ясно, че:

- В регресионния модел са останали показателите Lp(a) и възраст;
- Рисковото влияние на серумните нива на Lp(a)  $\geq 21$  mg/dl спрямо тези < 21 mg/dl се е увеличило до около **46 пъти**;
- Рисковото влияние на възрастта се е увеличило до около **21%** за всяка година.



**Фигура 22: ROC крива на  $Lp(a)$  за определяне праговата му стойност при отграничаването на пациентите с калциноза и аортна стеноза от контролите (площ под кривата 0,916,  $p < 0,001$ )**



**Фигура 23: ROC крива на възрастта за определяне праговата ѝ стойност при отграничаването на пациентите с калциноза и аортна стеноза от контролите (площ под кривата 0,690,  $p = 0,001$ )**

## Определяне на прогностични групи

Въз основа на резултатите от *таблица 8*, могат да се оформят **три** **рискови групи по отношение възникването на калцифицирана аортна клапа със стеноза:**

- **Група с нисък риск** - имаци стойности на серумното ниво на Lp(a)  $< 21$  mg/dl, имаци BMI  $\geq 30$  и възраст под 66 години;
- **Група със среден риск** – имаци стойности на серумното ниво на Lp(a)  $< 21$  mg/dl и/или BMI  $< 30$ , и/или възраст 66+ години;
- **Група с висок риск** - имаци стойности на серумното ниво на Lp(a)  $\geq 21$  mg/dl и/или BMI  $< 30$ , и/или възраст 66+ години.

**Таблица 7: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с калцифицирана аортна клапа със стеноза от контролите**

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Прецизност (%)
Lp(a) (mg/dl)	≥ 21	92	76	89	82	87
Възраст	≥ 66	85	36	72	54	68

**Таблица 8: Отношение на рисковете и 95% ДИ на изследваните предиктори за възникване на калцифицирана аортна клапа със стеноза**

Показател	Сравнение	Индивидуално				Групово			
		OR	95% CI		p	OR	95% CI		p
			Долна граница	Горна граница			Долна граница	Горна граница	
Lp(a) (mg/dl)	≥ 21/ < 21	35,200	2,4	20,1	<0,001	46,188	2,5	31,8	<0,001
АХ	Няма/има	2,600	0,704	9,607	0,152				
Обезитас	Няма/има	3,281	1,518	7,088	0,003				
Възраст (години)	≥ 66/ < 66	3,034	1,278	7,205	0,012				
Възраст (години)	Увеличение с 1	1,098	1,041	1,158	0,001	1,207	1,055	1,381	0,006

## ДИСКУСИЯ

Никое заболяване не може да бъде ефикасно лекувано и профилактирано, ако не се познава добре неговата етиология и патогенеза. Едно от най-често срещаните заболявания в кардиологията – калцифициращата аортна клапна болест, считана до неотдавна за „дегенеративен“ или „атеросклеротичен“ процес, през последните години се очертава като генетично детерминирано, тясно свързано с плазмените нива и индивидуалните вариации в молекулярния строеж на Lp(a). Отчитането на тези нови рискови фактори до голяма степен „обезсилва“ значението на „традиционните“ рискови фактори за ССЗ по отношение на аортната стеноза и очертава нови възможности за медикаментозна профилактика и лечение на CAVD, каквито към настоящия момент не съществуват.

Носителството на минорния G-алел е свързано със синтезирането на Lp(a)-молекули с по-малък брой KIV-2 – домени в апо(a) – частицата, което резултира в два важни клинични ефекта:

- Повишено плазмено ниво на Lp(a) – най-вероятно дължащо се основно на повишена скорост на синтез и/или екскреция от хепатоцитите;
- Повишена способност на по-многобройните и с по-малко молекулно тегло Lp(a)-изоформи да проникват в субендотелното пространство и там, свързвайки се с оксидирани фосфолипиди, лизофосфатидилхолин, аутотаксин и др. високоактивни реагенти, да индуцират възпалителен процес с последваща склероза и калцификация на аортната клапа (отлагане на калциев хидроксиапатит и пр.) [Bouchareb, R. и съавт., 2015].

Установено е, че само 28% от общите вариации в плазмените нива на Lp(a) се определят от носителството на минорния G-алел на rs10455872 [Kamstrup P. R. и съавт., 2014; Kutikhin A. G. и съавт., 2014].

В нашето проучване за първи път в България беше извършено генотипиране на A>G полиморфизма (rs10455872) в интрон 25 на гена, кодиращ Lp(a). Статистическата обработка на резултатите от генотипирането беше осъществена на два етапа, като целта беше да се потърси отговор на въпросите:

1. Дали rs10455872 има отношение към **възникването на CAVD**;

2. Дали rs10455872 има отношение към **тежестта на заболяването (респ. степента на аортната стеноза)**.

3. Дали носителството на rs10455872 обуславя по-висока честота на сърдечно-съдови заболявания въобще и в частност такива, свързани с клапна калциноза или артериална болест (коронарна, аортна).

За да се отговори на първия въпрос, беше осъществено сравнение между две **уеднаквени по възраст подгрупи от проучваните лица: нямащи и имащи САВД (без да се интересуваме от нейната тежест)**. Беше установено, че повече от 4 пъти е по-вероятно да се наблюдава калцифицираща аортна клапна болест при лица с поне един мутантен алел, отколкото при лица с нормален генотип. Този резултат намира потвърждение в работата на други автори, които са докладвали, че SNP rs10455872 в гена на Lp(a) корелира с наличието на аортна клапна калцификация, но тази корелация се влияе значително от расовата и етническата принадлежност на изследваната популация [Thanassoulis G., 2013; Thanassoulis, G., 2016]. Нашите резултати показват много по-силна асоциация между изследвания полиморфизъм и калцификацията на аортната клапа в сравнение с европейските кохорти и е близка до тази на афроамериканците.

Отговорът на втория въпрос наложи **прегрупиране на изследвания контингент, с формирането на нови три подгрупи (статистически уеднаквени по „замъгляващия“ критерий възраст): здрави лица (контроли); лица с клапна калцификация без стеноза и такива с аортна стеноза**. Установи се, че **относителният дял на нормалния генотип (AA) в контролната група е значимо по-голям от този на пациентите с аортна стеноза. Няма статистически достоверна зависимост между генотипа и различните степени на аортна стеноза**.

Нашите резултати могат да се обяснят с хипотезата, че генетичният полиморфизъм е само един от факторите, участващи в етиопатогенезата на САВД, като тежестта на действието му се отнася основно за по-ранните етапи на аортната склероза и калцификация. Микротравмите на клапния ендотел водят до лезии, в чиято репарация участва Lp(a), в качеството си на „молекула-съшивател“ [Thanassoulis G., 2016], но генетично детерминирани частици с по-голям брой и по-малко молекулно тегло проникват в субендотелното пространство, задържат се там и индуцират възпалителен процес, включвайки редица молекулни и клетъчни механизми на възпаление, фиброза и осификация – както чрез свързване с



оксидирани фосфолипиди и отключване на имунно-медиран инфламаторен процес, така и по път, независим от OxP1 [Yu, B., 2017]. За по-нататъшната еволюция към формиране на хемодинамично значима клапна обструкция, респ. аортна стеноза, роля играят и други фактори – част от тях негенетични или поне несвързани с rs10455872 [Leopold J. A., 2012].

Установи се също така, че сред носителите на минорния G алел на rs10455872 е повишена честотата на калцификация на митралния клапен пръстен (относителен дял 62,5%), както и на КБС (54,2%), и на дилатацията на асцендентната аорта (45,8%). Нашите резултати кореспондират с данните на други автори, според които rs10455872 – G-носителите имат повишен риск не само за изява на аортна калцификация и стеноза, но и за сърдечно-съдови заболявания като цяло – 1,47 увеличение на риска спрямо неносителите на G-алела [Li Y. и съавт., 2011; Schunkert, H., 2011; Kronenberg F., 2016], като асоциацията на rs10455872 е силно изразена в частност с миокардния инфаркт [Clarke R. и съавт., 2009].

Нашите данни поддържат твърдението, че носителството на G-генотипа на rs10455872, обуславящо по-малък брой KIV-2-домени в индивидуалния фенотип на Lp(a) молекулата (малки apo(a)-изоформи), е свързан с повишен сърдечно-съдов риск, вероятно като елемент от инициацията на патологичен процес на субендотелна увреда, който най-често резултира в аортна клапна калцификация и стеноза. В част от случаите този процес е съчетан с калцификация на митралния клапен пръстен, като последната може да се изяви и като самостоятелно заболяване, с или без значима дисфункция на митралната клапа.

Аортните клапни платна са предилекционно място на склероза и калцификация, в сравнение с митралните. Това може частично да се обясни с по-високия хемодинамичен стрес поради по-високоскоростния кръвоток през аортната клапа, в сравнение с митралната и оттам – по-честа увреда (микротравматизъм) на клапния ендотел, която се смята за първи и ключов етап в развитието на калцифициращата клапна болест [Leopold J. A., 2012].

Интересен е въпросът, каква би била еволюцията при носителите на минорния G-алел, при които не е установена CAVD към момента на включване в проучването, но е налице изолирана калцификация на митралния клапен пръстен. Дали след време в патологичния процес ще

бъде въввлечена и аортната клапа, на каква възраст ще настъпи това и с каква скорост на прогресия. Отговор на тези въпроси може да даде едно бъдещо, поне 5-годишно проследяване.

Анализирахме **плазмените нива на Lp(a)** при всичките 156 участници в проучването по ELISA-метод, описан в раздела „Материал и методи“, като получените стойности са в **mg/dl**. Резултатите ни показват разпределение, различно от нормалното, със значителна хетерогенност и преобладаване на по-ниските стойности (*фиг. 15*).

**Не намерихме данни за проучване на Lp(a)-концентрацията в България.** В достъпната литература се откриват много големи вариации в нивата на Lp(a): разликата между най-ниските ( $< 0,1$  mg/dl) и най-високите стойности ( $> 300$  mg/dl) е повече от 1000-кратна [Kronenberg F., 2016]. Нашите данни, че разпределението не е Гаус-Лапласово и на популационно ниво преобладават по-ниските концентрации, корелират с тези на Laschkolnig и кол. [Laschkolnig A. и съавт., 2014]. Това, обаче, се отнася основно за европейски и северноамерикански кохорти. В някои части на света (напр. сред африканското население на юг от Сахара) нивата на Lp(a) са доста по-високи, а разпределението им значително се доближава до Гаус-Лапласовото [Kronenberg F., 2016].

При нашите пациенти „маржът“ между най-ниската и най-високата измерена стойност на Lp(a) е много по-малък от съобщавания в литературата – **само четирима участници в проучването имат плазмена концентрация над 50 mg/dl**, сочена от повечето автори като „граница“ между умерения и високия риск за ССЗ [Gotoh T. и съавт., 1995; Kamstrup P. R. и съавт., 2009; Kamstrup P. R. и съавт., 2014; Anderson T. J. и съавт., 2016], а според други – за „граница“ между желателните нива и граничния риск [Jayasinghe R., 2014].

**Нито един участник в нашата извадка няма ниво на Lp(a)  $< 15$  mg/dl, а ниво  $< 30$  mg/dl имат 50% от изследваните лица.**

В това отношение данните ни се различават от съобщените стойности в публикациите на други автори. Nordestgaard и сътр. [Nordestgaard V. G. и съавт., 2010] установяват в популационно проучване сред населението от Южна Германия, че приблизително 50% от лицата имат концентрации на Lp(a) под 10 mg/dl, 25% имат концентрации над 30 mg/dl и 14% имат концентрации над 50 mg/dl, като и двата прага се считат

за свързани с повишен риск от ССЗ. В Copenhagen City Heart Study Kamstrup и съавт. намират, че 22% от изследваните лица имат ниво на Lp(a) < 5 mg/dl (< 22-рия перцентил), 45% имат ниво между 5 и 29 mg/dl (22-66-ти перцентил), 22% са с ниво между 30 и 76 mg/dl (67-89-ти перцентил), 6% - с нива 77-117 mg/dl (90-95-ти перцентил) и 5% - с най-високи нива > 117 mg/dl (> 95-тия перцентил) [Kamstrup P. R. и съавт., 2009].

Възможно обяснение за **по-ниския относителен дял на лицата с плазмено ниво Lp(a) < 30 mg/dl** в нашата извадка е фактът, че **тя не е популационна** – преобладаващият брой лица, включени в нея (73%), имат някаква форма на CAVD и по-високите концентрации на Lp(a) са очакван резултат.

Различни проучвания търсят **връзката между нивото на Lp(a) и наличието на CAVD**, като едни от тях обхващат **само пациенти с аортна стеноза** [Arsenault B. J., Boekholdt, S. M. и съавт, 2014], други – **с калцификация на аортната клапа, без значение дали е налице, или не патологичен трансклапен градиент** [Thanassoulis, 2016].

Кривата на стойностите на Lp(a) при всичките 156 участници в нашето проучване (представени на **фиг. 17**) бележи впечатляващ „скок“ между плазмените нива на Lp(a) на пациентите с аортна стеноза (лявата част на графиката) спрямо останалите две групи: тези със склероза и калцификация на клапата, без формирана стеноза и здравите контроли. В резултатите описахме „изключенията: четирима пациенти с други форми на сърдечно-съдови заболявания: двама са с калцификация на митралния клапен пръстен в комбинация с триклонова КБС; 1 – с калцификация на МК-пръстен без обструктивна коронарна болест и 1 – с триклонова КБС без данни за клапно заболяване. Интерес представлява единственият участник в проучването, който е с относително високо плазмено ниво на Lp(a) (попада в четвъртия перцентил на нашата извадка), освен това е и хетерозигот по минорния G-алел на rs10455872 и няма данни за клапно или коронарно заболяване към момента на включване в проучването. Това е жена-хетерозигот по минорния алел G на rs10455872, на сравнително по-млада възраст (65 г.) към момента на включване в проучването, с изява на начална CAVD – клапна склероза с лекостепенна инсуфициенция 2 години по-късно. Като се има предвид, че не само генетичният вариант, но и плазмената концентрация на Lp(a) са практически константни във времето,

еволюцията при тази пациентка на практика потвърждава правилото за връзка между генетичния полиморфизъм, високия Lp(a) и развитието на аортна клапна калцификация.

Първоначалният замисъл на нашето проучване беше да се сравнят някои рискови фактори, вкл. LPA-генотипът по отношение на rs10455872-полиморфизма и плазмените нива на Lp(a) между две групи лица: такива с калцифицираща аортна клапна стеноза и контрола без аортна стеноза. В хода на изследването се взе решение да бъде сформирана отделна трета, „междинна“ група лица, при които е налице склероза и калцификация на клапата, без наличие на патологичен трансклапен градиент – с презумпцията, че при тях заболяването CAVD е в начален стадий, при който еволюцията към клапна стеноза е възможна, но не е задължителна и се влияе от допълнителни фактори, върху които един сравнителен анализ би могъл да хвърли по-голяма светлина (*фиг. 18*).

След уеднаквяване на трите групи по „замъгляващия фактор“ възраст (което наложи отпадане на най-възрастните 20 пациенти от групата с аортна стеноза), предположихме, че така направеното разделение ще позволи по-ясно да бъдат отдиференцирани факторите, които имат значение за инициацията на CAVD и за нейната прогресия до хемодинамично значима клапна обструкция.

Очаквахме инициращите фактори, асоциирани с ранните стадии на заболяването, да присъстват в сигнификантно по-високи стойности и в двете групи лица с CAVD – с или без стеноза, спрямо контролите без клапна болест. И обратното – факторите, свързани с тежестта, респ. прогресията на заболяването, да бъдат по-добре представени в групата с аортна стеноза, спрямо другите две групи – лица с CAVD без стеноза и тези с нормална аортна клапа.

Сравнителното разпределение на пациентите от трите групи по плазмено ниво на Lp(a) показва, че **при лицата с аортна стеноза средната стойност на Lp(a) е сигнификантно по-висока ( $p < 0,05$ ) спрямо останалите две групи, които нямат статистически значима разлика по този показател.** От друга страна, не се намери доказателство със статистическа сила за зависимост между плазменото ниво на Lp(a) и rs10455872-полиморфизма в цялата извадка и във всяка от трите изследвани групи поотделно, макар че големината на извадката не е достатъчна, за да се направи категоричен извод в това отношение.

Като имаме предвид дискутирания вече резултат от нашето генетично проучване, според което **носителството на минорния G-алел в SNP rs10455872** увеличава повече от 4 пъти риска от поява на **клапна калцификация** в сравнение с **неносителите** (OR 4,345; [95% CI] 0,968 – 19,501), но **не показва статистически значима разлика** между лицата с **CAVD без и с аортна стеноза**, от една страна,

и резултата от изследването на **плазменото ниво на Lp(a)**, според който **имащите стеноза на аортната клапа са със сигнификантно по-високи стойности спрямо тези с калциноза без стеноза и от здравите контроли**, като между последните две групи няма значима разлика,

можем да формулираме предположението, че **rs10455872-носителството играе роля в тригерирането** на патологичния процес, но вероятно няма пряко отношение към неговата еволюция към клинично значима аортна стеноза, докато **повишеното плазмено ниво на Lp(a)** може би не е „пусков момент“ за **CAVD**, обаче **силно допринася за прогресията на вече започналото заболяване към тежка калцификация, склеротична деформация и обструкция** на аортната клапа.

**Съществува „прагова стойност“ на Lp(a) – 21 mg/dl**, над която **рискът за възникване на калцифицирана аортна клапна стеноза нараства около 35 пъти (в индивидуален план) и 46 пъти (в групов план) в сравнение с лицата с по-ниски стойности.**

Анализът на демографския показател „възраст“ в нашето проучване показва, че **при пациентите с CAVD, пикът на клинична изява е в седмата и осмата декада от живота (възрастовите групи 60-69 и 70-79 г.); там е и най-висок дялът на аортно клапно протезираните пациенти (47,4%, респ. 31,6% относителен дял за двете групи, при средна възраст към момента на клапното протезиране 66,47±7,9 г.).**

Беше доказана „прагова стойност“ по отношение на възрастта: **при пациенти на възраст над 66 години рискът от развитие на калцифицираща аортна клапна стеноза е около 3 пъти по-висок спрямо по-младите**, като **рискът нараства с около 10% за всяка следваща година (в индивидуален план) и около 21% за всяка следваща година (в групов план).** Тези резултати се доближават до установената в рамките на **The Cardiovascular Health Study (CHS)** зависимост между възрастта и **CAVD**: **двойно нарастване на риска на всеки 10 години увеличаване на**

възрастта (OR 2,18; 95% CI) [Stewart, B. F., Siscovick, D.,1997]. Проучването, обаче, обхваща само лица над 65-годишна възраст.

**Седмата декада е своеобразен разделител между калцифициращата аортна стеноза (при по-възрастните пациенти) и аортната стеноза с друга етиология (ревматична, вродена, ендокардит и др.).** В нашето проучване се установи, че **при вече налична САVD в стадий на калцификация и склероза, без формиран патологичен стенолитичен градиент, увеличението на възрастта с 1 година увеличава риска от прогресия на клапната калцификация към стеноза в индивидуален план с около 7%, а в групов – с около 5%.** Това позволява прогнозиране на популационно ниво на честотата на клинично значимата аортна стеноза и оттам – планиране на необходимостта от средства за лечението ѝ (аортно клапно протезиране = Aortic valve replacement, AVR; транскатетърно аортно клапно протезиране = Transcatheter aortic valve replacement, TAVR и др.) в национален мащаб. Голямо проучване в тази насока в България до момента не е правено.

По отношение на **пола**, беше установено минимално (статистически незначимо) превалиране на мъжкия пол сред пациентите с САVD: 51,8% +мъже/48,2% жени. Резултатите ни са аналогични с данните от Euro Heart Survey VHD, където сред клапно болните пациенти съотношението мъже/жени е 50,5%/49,5% [Jung, B. и съавт., 2003]. Сходни са данните и от едно българско проучване върху пациенти с умерена и тежка аортна стеноза и стенокардия, хоспитализирани за предоперативна инвазивна оценка, при което съотношението мъже/жени е 53,25%/48,68% [Каменова З. и съавт., 2012].

Тези резултати се разминават с публикуваните данни от други автори в по-ранни проучвания, според които е налице двойно повишение на риска за аортна стеноза при мъжете ( $P < 0,001$ ; OR 2.03; 95%CI в Cardiovascular Health Study, 1997 г.) [Stewart, B. F., Siscovick, D., 1997]. Мъжкният пол е сочен като рисков фактор за инициацията, но не и за прогресията на САVD и в по-късни публикации [Owens, D. S., & O'Brien, K. D., 2014]. Тази концепция е възприета и цитирана и от други автори [Rashedi, N., & Otto, C. M., 2015].

Изхождайки от съвременните представи за етиопатогенезата на САVD, в която половите хормони нямат пряко участие, не би трябвало да очакваме статистически значима разлика в заболеваемостта при мъжете и

жените. При анализа на данните за разпределението по пол, съотнесено към тежестта на САVD, бе установена липса на разлика между честотата при мъже и жени в групата с аортна склероза и калцификация без стеноза, а също и при пациентите с лека и умерена аортна стеноза, докато в групата с тежкостепенна аортна стеноза съотношението мъже/жени беше 55,8/44,2%. Едно бъдещо, по-широкообхватно проучване върху честотата и разпространението на САVD и нейния най-тежък вариант – високостепенната аортна стеноза сред българското население, би дало по-ясен отговор на въпроса за значението на пола като рисков фактор за това заболяване.

От изследваните коморбидности, сред пациентите с всички форми на САVD най-разпространена е **артериалната хипертония**: 86,8% са хипертоници, срещу 92,9% хипертоници в контролната група лица без САVD. Резултатите ни са сходни с тези, съобщени от З. Каменова и кол. - 92,11% от пациентите с тежка аортна стеноза в тяхното проучване са с артериална хипертония [Каменова З. и съавт., 2012]. В дисертационния труд на К. Колева „Характеристика на дегенеративната аортна стеноза чрез ехографски показатели и циркулиращи серумни маркери“ не се установява статистически значима разлика в честотата на артериалната хипертония между лицата с аортна стеноза и контролите. Посочените от различните научни колективи данни за дела на пациентите с артериална хипертония варират в много широки граници – от 33% [Mohler E. R. и съавт., 1991] до над 90% [Колева К., 2010; Каменова З. и съавт., 2012]. Основната причина за това разминаване най-вероятно се крие в различния дизайн на тези проучвания, отнасящ се до следните критерии: възрастов обхват (силно вариабилна долната граница на възрастта, в диапазона между 31 и 65 години); етиология на аортната стеноза (в по-ранни проучвания с ниска долна прагова възрастова граница и по-нисък процент на артериалната хипертония са включени и пациенти с ревматична генеза на клапния порок [Mohler E. R. и съавт., 1991]); различни критерии за подбор: обхващане на лица с всички форми на САVD, включително субклинични такива; лица само с клинично значима аортна стеноза или такива, които са клапно протезирани по повод на аортна стеноза.

Напоследък публикувани данни сочат за съществуването на умерена позитивна асоциация между артериалната хипертония и възникването, но не и прогресията на САVD [Owens, D. S., & O'Brien, K. D., 2014]. В нашето проучване доказахме по-висок относителен дял на артериална хипертония

при пациентите с калцификация и склероза без стеноза спрямо тези с хемодинамично значима стеноза, но показателят не достига статистическа значимост.

**Обезитетът** в нашето проучване показва интересна зависимост спрямо наличието на калцифицираща аортната стеноза: сравнителният анализ между групите без CAVD, с CAVD без стеноза и с аортна клапна стеноза показва липса на статистическа значимост в честотата на обезитета между първите две групи и **сигнификантно по-ниска честота на затлъстяване при пациенти с хемодинамично значима аортна стеноза ( $p < 0,05$ ).**

Становищата относно обезитета като рисков фактор за CAVD са много противоречиви. Повечето автори на проучвания върху рисковите фактори за аортна калцификация и стеноза не причисляват към тях обезитета. Но той е посочен като такъв в едни от най-авторитетните публикации по темата, като тази на P. Fraggiano и кол. [Faggiano, P. и съавт., 2006] от Mayo Clinic (5-г на аортна стеноза) и D. S. Owens и O'Brien във *Valvular heart disease: a companion to Braunwald's heart disease, 4th ed., Philadelphia* [Owens, D. S., & O'Brien, K. D., 2014] – в тази широко цитирана публикация BMI е посочен като рисков фактор за инициацията, но без отношение към прогресията на CAVD.

Обезитетът (по-конкретно неговата висцерална форма), артериалната хипертония, захарният диабет или повишената кръвна захар на гладно, дислипидемията (характеризираща се с понижено ниво на HDL-холестерол и повишени триглицериди) са елементи на т.нар. метаболитен синдром. След като метаболитният синдром е доказан рисков фактор за атеросклероза, логично е да се очаква той да улеснява инициацията и развитието на CAVD. Такива са изводите от публикуваното през 2006 г. широкомащабно проучване върху аортната клапна калцификация след мултиетническа кохорта от САЩ - Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [Katz R. и съавт., 2006]. Авторите намират степенна линейна връзка между разпространението на CAVD и броя на компонентите на метаболитния синдром при жените и мъжете (и за двете  $P < 0.001$ ). Заключение им е, че в групата на MESA метаболитният синдром и захарният диабет са свързани с повишен риск от аортна клапна калцификация, а разпространението на клапната калцификация се увеличава с нарастващия брой компоненти на метаболитния синдром. Според резултатите от AIM-HIGH-Trial, повишените нива на Lp(a)



допринасят за остатъчния кардиоваскуларен риск след на фона на холестерол-понижавата терапия при пациенти с метаболитен синдром [Albers J. J., 2013].

В нашето проучване бяха обхванати всички компоненти на метаболитния синдром: обезитет, артериална хипертония, захарен диабет или хипергликемия на гладно, нисък HDL-C и повишени триглицериди. Изследвахме и корелацията на абнормните нива на общия холестерол и LDL-C с CAVD.

При съпоставянето на данните за изследваните показатели между контролите спрямо сборната група пациенти с всички форми на CAVD, **само LDL-C и триглицеридите показват сигнификантни различия:** средното ниво на LDL-C е по-високо при лицата с CAVD ( $p < 0,022$ ), а на триглицеридите – по-високо в групата на контролите в сравнение с групата на пациентите с аортна стеноза ( $P < 0,05$ ). Широкото използване на статините в съвременната кардиологична практика би могло да замъгли изследваните показатели като абсолютни стойности. Въпреки че сравнението между пациентите с CAVD и контролите по отношение на терапията на статини не показва сигнификантна разлика, не включихме LDL-C и триглицеридите в изработения от нас прогностичен модел.

Процесът на колокализация на холестерол и хидроксиапатит, а също и на неестерифициран холестерол, свързан с калциеви гранули, в атеросклеротичните съдови лезии е описан още в началото на 90-те години на миналия век [Hirsch, D. и съавт., 1993]. Плазменият липопротеинов холестерол с ниска плътност (LDL-C) е свързан с аортна стеноза в обсервационни проучвания, обаче рандомизираните проучвания с терапии за понижаване на холестерола при лица с установена клапна болест не са показали намалена прогресия на заболяването [Smith, J. G., 2014].

Нашите резултати за наличието на корелация между повишеното ниво на LDL-холестерола и CAVD се подкрепят и от проучванията на други автори. Един голям метаанализ, базиран на обединените данни от кохортите, участващи в консорциума CHARGE ( $n=6942$ ), включително Framingham Heart Study (кохортно начало до последно проследяване: 1971-2013;  $n = 1295$ ), Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (2000-2012 г.,  $n = 2527$ ), Age Gene/Environment Study–Reykjavik (2000-2012 г.,  $n = 3120$ ) и Malmö Diet and Cancer Study (MDCS, 1991-2010;  $n = 28\ 461$ ) установява, че

генетичното предразположение към повишен LDL-C е свързано с наличието на калций по аортната клапа и с поява на аортна стеноза, което е доказателство, подкрепящо причинно-следствената връзка между LDL-C и CAVD. Дали по-ранната намеса за намаляване на LDL-C може да предотврати заболяването на аортната клапа, според авторите заслужава допълнително проучване [Smith, J. G., 2014].

С откриването на важната роля, която **Lp(a)** има за появата и прогресията на CAVD, и като се има предвид състава на Lp(a)-молекулата, която включва в себе си LDL-частица, апо-B 100 и апо (a), логично е да се предположи, че **част от LDL-партикулите, които се откриват в аортните клапни лезии, са доставени там не от липопротеините с ниска плътност (ЛПНП), а от Lp(a). И тъй като най-разпространените понастоящем медикаменти за лечение на хиперхолестеролемията – хидрокси-метил-глутарил-коензим А-редуктазните инхибитори (статините) понижават нивото на LDL-C, но не и това на Lp(a), те не могат да предотвратят появата и еволюцията на CAVD.** В подкрепа на тази хипотеза са и резултатите от едно проучване на R. Vongpromek и кол. върху връзката между повишеното ниво на Lp(a) и CAVD при пациенти с хетерозиготна форма на фамилна хиперхолестеролемиа, лекувани със статини [Vongpromek, R., Bos, S., 2015]. Авторите докладват за значителна асоциация между плазмената Lp(a)-концентрация и аортната клапна калцификация, която е независима от възрастта и другите рискови фактори, свързани със сърдечно-съдовите заболявания. Въпреки че аортната клапна калцификация и калцификацията на коронарните артерии са силно свързани помежду си, концентрацията на Lp(a) не корелира с коронарния калциев скор, което предполага специфична роля на Lp(a) при патогенезата на CAVD при тези пациенти.

Не намерихме асоциация и между **тютюнопушенето** и аортната калцификация и стеноза: пушачите в контролната група са 47%, срещу 33% в групата с CAVD ( $p=0,123$ ). Анализът на подгрупите с различна по тежест аортна стеноза също не показва статистическа значимост: сред пациентите с лекостепенна аортна стеноза за тютюнопушене съобщават 26,1%, сред тези с умерена – 22,2%, а в подгрупата с тежкостепенна аортна стеноза процентът на пушачите е 27,9% ( $p>0,05$ ). Данните ни се разминават с публикациите на редица автори, които поставят тютюнопушенето сред основните рискови фактори за CAVD [Stewart, B.

F., Siscovick, D.,1997]. Публикации от първото десетилетие на XXI в. също посочват тютюнопушенето като свързано с повишен риск за аортна калцификация, склероза и стеноза [Faggiano, P. и съавт., 2006].

От друга страна, факт е, че от CAVD боледуват много хора, които никога не са пушили – в нашата извадка такива са около 70% от лицата с тежкостепенна калцифицираща аортна стеноза. Механизмът на съдовия спазъм и микроциркулационната увреда, който играе важна роля за никотиновата токсичност, няма как да причинява директни поражения върху една аваскуларна структура, каквато е аортната клапа. Освен това, основното количество свободни радикали при CAVD произхождат от оксидираните фосфолипиди, свързани с Lp(a), макар че Lp(a) сам по себе си може да индуцира остеогенна диференциация на клетките от интрацелуларния матрикс и да промотира аортна клапа калцификация и стеноза по механизъм, различен от зависимото от OxPL възпаление [Yu, B., Nafiane, A., Thanassoulis, G., 2017].

Въпреки повишения интерес и новите проучвания относно етиопатогенезата на CAVD, натрупаното до момента познание все още търси отговор на няколко много важни въпроса:

- Генетично предопределено ли е заболяването и доколко „придобитите“ рискови фактори модифицират изявата и прогресията му?
- Защо възникването на аортна склероза и калцификация, което е често в напредналата възраст, само в малка част от пациентите прогресира до клинично значима стеноза, при това с различна скорост на неблагоприятна еволюция? От какво зависи тази еволюция и може ли да бъде предсказана, предотвратена или поне забавена във времето?

**Разбирането, че факторите за инициацията и за прогресията на CAVD са сходни, но не са идентични, както и затова, че един и същи фактор може да има различна сила (тежест) във възникването и началните стадии на заболяването, когато преобладава възпалителната компонента и клетъчната трансформация и в късната му фаза, когато преобладават процесите на склероза, калцификация и осификация, е в основата на търсене на нови подходи за**

**детерминиране на рисковия профил на САVD и отдиференциране на лицата, застрашени от този тип клапна увреда.**

Въз основа на получените от нас данни и публикуваните от други автори резултати може да се предположи, че синергичното действие на генетични фактори, определящи индивидуални вариации в структурата и плазмената концентрация на Lp(a), от една страна, и включващи се на по-късен етап възпалителни и др. патологични процеси, води до формиране и задълбочаване на клапната увреда при САVD.

Очаква се по-нататъшните проучвания да оценят по-детайлно връзката между генетичните вариации в молекулната структура и плазменото ниво на Lp(a) и развитието на калцифициращата аортна клапна болест, както и възможността чрез медикаментозно снижаване на нивата на Lp(a) през ранната фаза на САVD да се постигне забавяне или спиране на прогресията на болестта.

Всички дотук изложени резултати са основание да предложим **прогностичен модел за оценка на риска от развитие на заболяването калцифицираща аортна клапна стеноза, въз основа на три показателя: възраст, серумно ниво на Lp(a) и обезитет.** Резултатите от нашето проучване за първи път позволяват да се дефинират **три прогностични групи** по отношение на появата на калцифицираща аортна стеноза (*таблица 9*).

*Таблица 9: Прогностични групи за възникване на аортна стеноза*

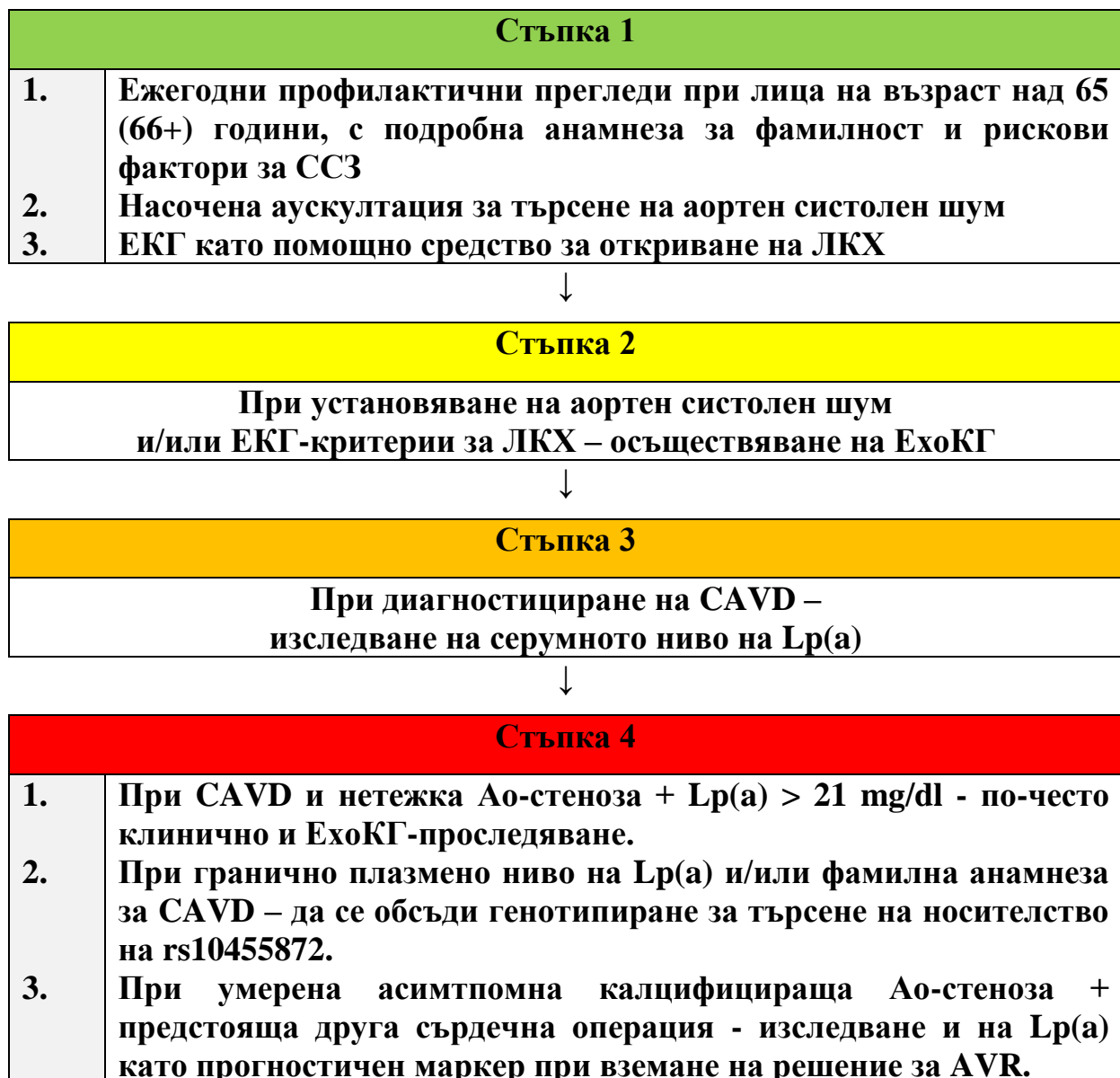
Критерии за стратификация на риска за AS	Нисък риск	Умерен риск	Висок риск
Стойност на Lp(a)	< 21 mg/dl	< 21 mg/dl	≥ 21 mg/dl
Възраст	< 66 г.	и/или > 66 г.	и/или > 66 г.
Обезитет	BMI ≥ 30	и/или BMI < 30	и/или BMI < 30

От формираните три рискови групи (*таблица 9*), най-голям интерес представлява групата с **висок риск: пациенти на възраст 66+ години, със серумно ниво на Lp(a) ≥ 21 mg/dl и с BMI < 30.** При тези

пациенти шансовете за изява на САVD с прогресия до хемодинамично значима аортна стеноза са много големи.

Въз основа на тези резултати, можем да предложим алгоритъм за ранно откриване на пациенти, застрашени от развитие на калцифицираща аортна клапна стеноза, базиран на демографски, клинични и лабораторни критерии.

Алгоритъмът е насочен към високорисковите пациенти и се осъществява в четири стъпки (фиг. 24):



Фигура 24: Алгоритъм за клинично поведение при пациенти с калцификация на аортната клапа

**Изследването на плазменото ниво на Lp(a) може да се окаже много полезен предиктор при пациенти на възраст 66+ години с аортна клапна калцификация и умерена стеноза (непокриваща ЕхоКГ-критерии за AVR), на които предстои сърдечна операция по друг повод (напр. хирургична интервенция върху митралната клапа, аорто-коронарен байпас, операция на аневризма на асцендентната аорта и др.) – относно вземане на решение за аортно клапно протезиране.**

Предстои изясняване на ползите от стартиране на специфична Lp(a)-понижаваща терапия като превенция на еволюцията на хемодинамично незначимата клапната склероза и калцификация към високостепенна аортна стеноза. Според един метаанализ на Afshar и съавт. от 2016 г., оценяващ потенциалното въздействие на евентуална Lp(a)-понижаваща терапия като първична профилактика на риска от миокарден инфаркт и аортна стеноза, понижаването на Lp(a) сред най-високите 20% от разпределението в популацията може да предотврати 1 от 14 случая на миокарден инфаркт и 1 от 7 случая на аортна стеноза [Afshar и сътр., 2016]. Към момента няма утвърден липидопонижаващ медикамент с възможност за повлияване нивото на Lp(a) и индикация за превенция на CAVD при пациенти с генетично високи серумни нива на Lp(a), но вече съществуват медикаменти, чиито ефект на намаляване на Lp(a)-нивото е известен: това са ниацинът (който намалява чернодробното производство на ApoB, но на практика е неприложим за масова употреба поради редица странични действия); PCSK9-инхибиторите (вече достъпни в амбулаторната практика); antisense-олигонуклеотидите (Mipomersen), които се свързват с mRNA на ApoB-100 и, спирайки транслацията, причиняват дозозависимо намаление на LDL-холестерола, ApoB-100, Lp(a) и триглицеридите; ApoB-ваксините и др. Тяхното място при първичната профилактика на калцифициращата аортна стеноза при високорисковите пациенти тепърва предстои да се проучва.

Откриването на ефикасен медикамент за профилактика на CAVD би променило генерално прогнозата на това често срещано и тежко сърдечно заболяване в глобален мащаб.

## ИЗВОДИ

1. Рисковите фактори за развитие на калцифицираща аортна стеноза се различават от тези за появата на съдова атеросклероза и в частност на КБС, което потвърждава различната етиопатогенеза на двете заболявания. Чрез множествен бинарен логистичен регресионен анализ бяха установени 3 сигнификантни фактора за аортна стеноза: възраст, плазмено ниво на Lp(a) и липса на обезитет.
2. Носителството на поне един G-алел на rs10455872 в LPA-гена увеличава риска от появата на САВД около 4,3 пъти в сравнение с неносителите (AA-генотип). Няма статистически значима разлика между лицата с САВД без и с аортна стеноза по отношение на носителството на G-алела. Това ни дава основание да предположим, че изследваният генетичен полиморфизъм играе роля в отключването на заболяването, но не и в неговата прогресия. Налице е сигнификантна връзка между наличието на генетичния полиморфизъм и развитието на калцификация на левите сърдечни клапи (комбиниран показател, включващ наличие на САВД и/или калцификация на митралния клапен пръстен).
3. Повишеното плазмено ниво на Lp(a) строго корелира с развитието на САВД и в частност на аортна стеноза, като тази зависимост не е линейна. Съществува прагова стойност („критичен праг“) – концентрация на Lp(a) над 21 mg/dl, над която рискът от прогресия на аортната склероза и калцификация към хемодинамично значима стеноза нараства около 35 пъти (в индивидуален план) и 46 пъти (в групов план).
4. Съществува второ „критично ниво“ на Lp(a) – 23 mg/dl, над което всички пациенти развиват някаква форма на ССЗ (САВД, калциноза на митралния клапен пръстен, КБС, дилатация на асцендентната аорта).
5. Възрастта е другият много съществен фактор за прогресията на САВД. При лицата с аортна калцификация и склероза, увеличението на възрастта с 1 година увеличава риска за възникване на хемодинамично значима стеноза с около 7%. Съществува „прагова стойност“ на възрастта, позволяваща да се отграничат пациентите с аортна стеноза от контролите – 66 години. Над тази възраст рискът за поява на аортна стеноза нараства трикратно, като всяка добавена година над 66 г. увеличава риска за аортна стеноза с 10%.

6. Обезитетът е негативен предиктор за калцифицираща аортна стеноза: лицата с САVD без стеноза и с обезитет имат около 70% по-нисък риск от прогресия на заболяването към хемодинамично значима стеноза в сравнение с лицата с САVD без стеноза, които са с нормално или наднормено тегло ( $BMI < 30$ ).
7. Артериалната хипертония се среща с по-висока честота при пациентите с САVD без стеноза, в сравнение с имащите калцифицираща аортна стеноза. Според нас, този факт не може да се тълкува като „обратен рисков фактор“, по-скоро е резултат от хемодинамичната характеристика на тежкостепенната аортна стеноза: тенденция към понижаване на системното артериално налягане поради ограничен, лимитиран от тежестта на стенозата и левокамерния статус сърдечен дебит, както и медикаментозни ефекти (употреба на диуретици и др.).
8. Нивото на LDL-C е по-високо при пациентите с САVD в сравнение с контролите, но вътрегруповият анализ не показва статистически значима разлика между подгрупите с и без стеноза, така че този показател не може да бъде използван в прогностичен модел за предсказване на риска от еволюция към аортна стеноза.
9. Делът на лицата с общ холестерол над 5,6 е статистически значимо по-висок при пациентите с лекостепенна аортна стеноза спрямо тези с умерена и високостепенна, а средната стойност на триглицеридите е по-висока в групата на контролите спрямо тези с калцифицираща аортна стеноза, но интерпретацията на тези данни не може да бъде коректна, предвид широката употреба на липидопонижаващи агенти (предимно статини) във всички сравнявани групи.
10. Всички други изследвани рискови фактори (пол, захарен диабет, хипергликемия на гладно, тютюнопушене, плазмен креатинин, обезитет, HDL-холестерол) не показват сигнификантна разлика между лицата с и без САVD, както и между тези с различна по тежест калцифицираща аортна стеноза.
11. Данните позволяват да се формират три рискови групи за поява на калцифицираща аортна стеноза, въз основа на 3 показателя: плазмено ниво на Lp(a) – под или над 21 mmol/l, възраст – под или над 66 години и BMI – под или над 30.



## **ПРИНОСИ**

### **Научно-теоретични**

За първи път в България е извършено комплексно изследване на рисковите фактори при пациенти с калцифицираща аортна клапна болест, включващо ДНК-генотипиране на A/G полиморфизма (rs10455872) в интрон 25 на LPA-гена и измерване на плазменото ниво на Lp(a), като е осъществен сравнителен анализ с контролна група пациенти без CAVD.

### **Научно-методични**

1. Разработена е модификация на метода за генотипиране на A>G полиморфизма (rs10455872) в интрон 25 на гена, кодиращ Lp(a), с помощта на TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay (Life Technologies), с използване на платформата PicoReal 96 – Real-time PCR и последващ анализ на алелните профили със специализиран софтуер (Thermoscientific).

2. Въведено е обработването на заснетия ехокардиографски образ на аортната клапа от лява парастернална позиция – къса ос, с помощта на свободно достъпен фотообработващ софтуер Picasa 3: визуализация на т.нар. „топлинна карта“ на клапата, която позволява по-ясно отдиференциране на огнищата на склероза и калцификация.

### **Научно-практически**

1. Направено е проспективно, болнично базирано клинично проучване на рисковите фактори за аортна калцификация и стеноза. Представени са и са анализирани резултатите от това проучване.

3. Установени са основните рискови фактори, отличаващи групата на пациентите с CAVD от контролите без клапна калцификация (след уеднаквяването им по фактора „възраст“), а именно:

- по-висока честота на носителство на G-алела (rs10455872) при пациентите с CAVD;
- по-високи плазмени концентрации на Lp(a) при пациентите с CAVD;
- по-високи серумни нива на общия холестерол в групата с CAVD;
- по-голяма честота на обезитет в групата на контролите.

4. Потвърдена е асоциацията между rs10455872-полиморфизма и САВД, като установихме, че в българската популация носителството на G-алела (в хомо- или хетерозиготна форма) увеличава вероятността за аортна клапна калцификация повече от 4 пъти в сравнение с носителите на AA-генотип.

5. Потвърдена е силната корелация между повишената концентрация на Lp(a) и развитието на аортна стеноза, като е намерена „прагова концентрация“ на Lp(a), над която рискът за аортна стеноза нараства рязко.

6. Потвърдена е силна корелация между възрастта и появата на САВД, като е установена „прагова стойност“ за възрастта, над която рискът от развитие на аортна стеноза нараства около 3 пъти. Доказано е ежегодното процентно нарастване на риска от аортна стеноза (в индивидуален и групов план) над тази прагова възраст.

7. Формирани са 3 прогностични групи с повишен риск за възникване на аортна стеноза въз основа на 3 показателя: плазмена концентрация на Lp(a), възраст и обезитет.

8. Създаден е клиничен алгоритъм в 4 стъпки за ранно откриване и проследяване на лица, застрашени от развитие на калцифицираща аортна клапна стеноза.

## НАУЧНИ ТРУДОВЕ по ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

### Публикации в медицински списания

1. V Tomova, M Alexandrova, M Atanasova, T Rashev, M Tzekova.  
**Polymorphism Rs10455872 at The Lipoprotein(A) Gene Locus Enhances the Risk of Aortic Valve Disease.** J Cardiol & Cardiovasc Ther 2018; 9(4): 555766. J Cardiol & Cardiovasc Ther 2018; 9(4): 555767. DOI: 10.19080/JOCCT.2018.09.555767.
2. Томова В., Рашев Т., Атанасова М. **Genetic polymorphisms, plasma levels of Lipoprotein(a) and its possible links with degenerative aortic stenosis (Генетичен полиморфизъм, плазмени нива на Lp(a) и възможната им връзка с дегенеративната калцификатна аортна стеноза).** Journal of Biomedical and Clinical Research (JBRCR) Vol. 9, Number 1, 2016, p. 59-64 – МУ-Плевен.
3. Томова В., Рашев Т. **Генетични аспекти на дегенеративната аортна стеноза.** Сп. „Наука кардиология“, 2015; 3: 109-111.

### Научни съобщения и презентации

1. Весела Томова, „**Нов щрих към ехокардиографската оценка на аортната клапа – „топлинна карта“ вместо калциев скор?**“ – VIII Научна конференция „Съвременни акценти в сърдечната и съдовата патология“ – Българска сърдечно-съдова асоциация, 30-31.03.2018 г., Медицински университет – Плевен (е-постер)
2. Весела Томова, Милена Атанасова, Маргарита Александрова, Мария Цекова, „**Особености на плазменото ниво на Lp(a) при лица без и с аортна стеноза**“ – VIII Научна конференция „Съвременни акценти в сърдечната и съдовата патология“ – Българска сърдечно-съдова асоциация, 30-31.03.2018 г., Медицински университет – Плевен (е-постер)
3. Весела Томова, „**Калцифицираща аортна клапа болест**“ – VIII Научна конференция „Съвременни акценти в сърдечната и съдовата патология“ – Българска сърдечно-съдова асоциация, 30-31.03.2018 г., Медицински университет – Плевен (презентация)

## ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Авторът на настоящия дисертационен труд декларира, че всички описани данни са оригинални и получени в резултат на изследователската му работа във Втора клиника по кардиология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен и СБАЛ по кардиология – Плевен, в сътрудничество със Сектор „Биология“ към Медицински университет – Плевен и Университетска лаборатория за научни изследвания, МУ – Плевен.

Резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Декларатор:

Д-р Весела Димчева Томова

