

**Latvijas Universitāte**  
Medicīnas fakultāte

**University of Latvia**  
Faculty of Medicine



**Interleikīnu ģenētisko variāciju ietekme  
uz koronārās sirds slimības gaitu**

Impact of genetic variations of interleukins on the  
course of coronary heart disease

*Gustavs Latkovskis*

**Promocijas darba kopsavilkums**  
Medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai  
Internajā medicīnā

**Summary of thesis**  
submitted for the degree of Doctor of Philosophy  
in Internal medicine

**Rīga, 2006. gads**

**Darbs veikts Paula Stradiņa Klīniskās Universitātes slimnīcas Latvijas Kardioloģijas centrā un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.**

**The work has been conducted at the Latvian Centre of Cardiology of Paula Stradina Clinical University Hospital and Latvian Biomedical research and Study Centre.**

***Darba zinātniskie vadītāji / Research supervisors :***

*Asoc. prof., Dr. med. Uldis Kalniņš<sup>†</sup>*

*Dr. biol. Normunds Līcis*

***Recenzenti / Reviewers:***

*Dr. habil. med. Andris Vītols*

*Prof., Dr. habil. med. Andrejs Kalvelis*

*Prof. emeritus, Dr. habil. biol. Elmārs Grēns*

**Zinātniskais darbs veikts ar Eiropas Sociālā Fonda finansiālu atbalstu  
Research has been supported by European Social Fund.**



## **Pateicības**

*Pirmkārt, vislielāko pateicību vēlos izteikt saviem vecākiem Velgai un Leonardam Latkovskiem, ar kuru gādību un atbalstu esmu varējis iegūt izglītību, kā arī par izpratni vēlākajos gados. Tāpat paldies visiem maniem tuviem cilvēkiem, radiem un draugiem, kas ir pacietuši to, ka laiks, ko labprāt veltītu viņiem, izmantots šā darba tapšanā.*

*Ar pateicību vēlos pieminēt savu pirmo darba vadītāju, asociēto profesoru Uldi Kalniņu, kura vadībā Latvijas Kardioloģijas centrs kļuva par augsti attīstītu klīniski zinātnisku bāzi un kurš atbalstīja manu vēlmi aizsākt kardiovaskulāro slimību ģenētikas pētniecību. Esmu ļoti pateicīgs savam darba vadītājam Dr. biol. Normundam Līcim no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra, ar kuru no nulles punkta esam izveidojuši un attīstījuši šo projektu un kurš grūtā brīdī uzņēmās turpināt mana darba vadīšanu.*

*Īpaši vēlos pateikties Latvijas Kardioloģijas centra vadītājam Dr. med. Andrejam Ērglim par pozitīvo attieksmi pret zinātniskās pētniecības ierosmēm un progresīvo vidi, kas ļauj šīs ieceres īstenot. Nevaru nepieminēt atbalstu, ko darba izstrādes laikā esmu jutis no saviem kolēģiem Latvijas Kardioloģijas centrā. Īpaši pateicos Dr. Sandai Jēgerei, Dr. Gintai Kamzolai, Dr. Aijai Mačai, kā arī jaunajām kolēģēm Dr. Laurai Kreicburgai, Dr. Milanai Zabunovai un Dr. Marinai Berzinai, kas dažādos laikposmos piedalījušās datubāzes fenotipiskās informācijas vākšanā. Paldies medicīnas māsai Sarmītei Drullei par precīzo darbu, palīdzot ar datubāzei nepieciešamiem paraugiem un laboratoriskiem izmeklējumiem, kā arī studentei Dacei Juhnevičai, kas ar entuziasmu iesaistījusi zinātniskajā darbā.*

*Paldies arī profesorei Renātei Ligerei par vērtīgiem padomiem promocijas darba sagatavošanas beiguposmā.*

*Šis darbs pamatā tika veikts par Latvijas Zinātnes padomes grantu līdzekļiem, un es ceru, ka Latvijas valsts atbalsts kardiovaskulāro slimību un to ģenētikas zinātniskiem pētījumiem nākotnē pieaugs. Ar lielu pateicību vēlos atzīmēt Eiropas Sociālo fondu un Latvijas Universitāti par piešķirto pētniecības darba atbalsta grantu, kas būtiski palīdzējis mana darba mērķu īstenošanai. Sirsnīgs paldies Latvijas Universitātes Morberga stipendijas komitejai, kā arī Latvijas Zinātņu akadēmijai un Latvijas Gāzei par piešķirtajām stipendijām, atzīstot manu zinātnisko darbību.*

**Gustavs Latkovskis**

2006. gada jūnijā

## Satura rādītājs

1. Ievads	6
2. Darba aktualitāte un novitāte	6
3. Darba mērķis	7
4. Darba uzdevumi	7
5. Darba struktūra un apjoms	7
6. Zinātniskā darba aprobācija	7
7. Darba metodes	7
Pētījuma dizains un kopējās slimnieku grupas atlasē principi	8
Apkopotā informācija par fenotipu	8
Analizējamo slimnieku apakšgrupu atlasē un izslēgšanas kritēriji	9
Biomolekulārās analīzes	10
Statistiskās apstrādes metodes	11
8. Rezultāti	13
8.1. Pētījuma grupas fenotipiskais un ģenētiskais raksturojums	13
8.2. Interleikīnu ģenētisko variāciju saistība ar KSS klīniskajiem un angiogrāfiskiem kritērijiem	15
Slimnieki ar stabilu un nestabilu KSS sākotnējo gaitu	15
Laiks līdz pirmajam MI	22
Vainagartēriju oklūzija	23
Slimnieki ar MI un vainagartērijas oklūziju	24
Slimnieki ar un bez KSS	26
KSS attīstības vecums	27
Pirmā MI attīstības vecums	28
Miokarda infarkts anamnēzē	29
8.3. Interleikīnu ģenētiskās variācijas un CRP līmenis	30
Pilotpētījuma rezultāti	30
Paplašinātā datu analīze	32
9. Diskusija	40
10. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes	47
11. Secinājumi	48
12. Vēres	49
13. Publikāciju un ziņojumu saraksts par darba tēmu	51

## Saīsinājumi

ABL-H	- Augsta blīvuma lipoproteīnu holesterīns
AKEI	- Angiotenzīnu konvertējošā enzīma inhibitori
AKS	- Akūts koronārs sindroms
ANOVA	- Variācijas analīze (statistikas metode; angļu val., <i>analysis of variance</i> )
BB	- Beta blokatori
BSTE	- [AKS] bez ST segmenta elevācijas
CD	- Cukura diabēts
CRP	- C-reaktīvais proteīns
DNS	- Dezoksiribonukleīnskābe
EDTA	- Etilēndiamīntetraacetāts (antikoagulants)
FG	- Fibrinogēns
GDE	- Gēna devas efekts
HZ	- Homozigoti
IL	- Interleikīns
IL-1B	- Interleikīna-1 $\beta$ gēns
IL-1 $\beta$	- Interleikīns-1 $\beta$
IL-1Ra	- Interleikīna-1 receptora antagonists
IL-1RN	- Interleikīna-1 receptora antagonista gēns
IL-6	- Interleikīns-6
IVUS	- Intravaskulāra ultrasonoskopija
KAS	- Koronāro artēriju slimība
KH	- Kopējais holesterīns
KSS	- Koronārā sirds slimība
LD	- Nelīdzsvarota saistība (angļu val.; <i>linkage disequilibrium</i> )
MI	- Miokarda infarkts
mRNS	- Matricas ribonukleīnskābe
MV	- Daudzmainīgs/a (angļu val., <i>multivariate</i> )
MVA	- Daudzmainīgo analīze (angļu val., <i>multivariate analysis</i> )
NS	- Statistiski nenozīmīgs (angļu val., <i>non-significant</i> )
NSt	- Nestabila stenokardija
OR	- Izredžu attiecība (angļu val., <i>odds ratio</i> )
PCR	- Polimerāžu ķēžu reakcija (angļu val., <i>polymerase chain reaction</i> )
PK	- Slimnieku kontroles grupa
PTCA	- Perkutāna translumināla koronārā angioplastija (angļu val., <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> )
RF	- Riska faktors
SD	- Standarta deviācija
SK	- Standarta kļūda
SNP	- Viena nukleotīda polimorfisms (angļu val., <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SSt	- Stabila stenokardija
TG	- Triglicerīdi
TI	- Ticamības intervāls
UV	- Vienmainīgs (angļu val., <i>univariate</i> )
UVA	- Vienmainīgā analīze (angļu val., <i>univariate analysis</i> )
VNTR	- Mainīga skaita tandēmu atkārtojumi (angļu val., <i>variable number tandem repeat</i> )
vs.	- Salīdzinot ar; pret (latīņu val., <i>versus</i> )
ZBL-H	- Zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns

## 1. Ievads

Ateroskleroze ir izplatītākā no sirds-asinsvadu slimībām, kuras lokalizācija vainagartērijās (koronārā sirds slimība, KSS) ir īpaši bīstama, jo ir saistīta ar lielu kardiālas un pēkšņas nāves risku. Latvijā ir viens no augstākajiem kardiovaskulārās mirstības rādītājiem Eiropā (Sans et al., 1997), tādēļ plašās izplatības un smagās gaitas dēļ, KSS ir kļuvusi ne tikai par medicīnisku, bet arī nopietnu sociālekonomisku problēmu.

Koronārās aterosklerozes pamatā ir hronisks sirds vainagartēriju subintimāls iekaisums ar holesterīna akumulāciju un aterosklerotiskās pangas veidošanos. Atkarā no tā, kā notiek pangas evolūcija, KSS klīniskā manifestācija var būt radikāli atšķirīga. Pangas pakāpeniska progresēšana līdz kritiskam artērijas sašaurinājumam noved pie attiecīgās miokarda zonas išemizācijas paaugstinātu skābekļa prasību apstākļos, piemēram, fiziskas slodzes laikā, kas klasiski izpaužas kā *stabila slodzes stenokardija*. Alternatīva pangas evolūcija ir agrīna fibromuskulārās kapsulas plīšana, kā rezultātā pangas lipīdu serdes saskarsme ar trombocītiem inducē tromba veidošanos un *akūta koronāra sindroma* (AKS) attīstīšanos: vainagartērijas pēkšņas totālas oklūzijas gadījumā attīstās attiecīgās miokarda zonas nekroze jeb *akūta miokarda infarkts* (MI), bet tranzitoras vai subtotālas oklūzijas gadījumā - akūta išēmija bez nekrozes veidošanās, kas klīniski izpaužas kā *nestabila stenokardija*. Atšķirā no stabilas stenokardijas, MI gadījumā pastāv ļoti augsts nāves risks (apmēram 30% viena gada laikā pēc pirmā MI, salīdzinot ar 2% gadā slimniekiem ar stabilu stenokardiju), tādēļ šī slimnieku grupa pieder pie visaugstākās riska kategorijas (Gibbons et al., 2003; Thom et al., 2006), kuras savlaicīga identificēšana, kā arī efektīva profilakse un ārstēšana pieder pie mūsdienu kardioloģijas galvenajām prioritātēm.

Iekaisuma aktivitāte pangā ir centrālais patoģenētiskais process, kas izraisa pangas ruptūru un KSS nestabilu norisi (Ross, 1999). *Interleikīni* (IL) ir starpsūnu mediatoru (citokīnu) grupa, kas uztur un regulē iekaisuma aktivitāti, savukārt IL-1 $\beta$ , IL-1 receptora antagonists (IL-1 Ra) un IL-6 pieder pie grupas pārstāvjiem, kuriem ir aprakstīta loma aterosklerozes patoģenēzē (von der Thusen et al., 2003). Tā kā nosliece uz agrīnu KSS attīstīšanos var būt ģenētiski pārmantota un MI patoģenēzē liela nozīme ir iekaisuma aktivitātei, šajā darbā tika pārbaudīta hipotēze, vai IL ģenētiskās variācijas var ietekmēt KSS klīnisko gaitu.

## 2. Darba aktualitāte un novitāte

Pašreiz nav pilnībā skaidri iemesli, kādēļ KSS slimības sākotnējā gaita slimniekiem var noritēt tik atšķirīgi – gan kā relatīvi labvēlīga ilgstoši stabila stenokardija bez AKS vairāku gadu garumā, gan arī kā MI (bieži bez stenokardijas prodroma vai arī agrīni kopš pirmo stenokardijas simptomu parādīšanās) ar lielu nāves risku. Ja izdotos noskaidrot faktorus, kas ietekmē KSS gaitu labvēlīgi vai nelabvēlīgi, tam būtu vairāki praktiski pielietojumi. Pirmkārt, pavērtos iespējas attīstīt jaunus terapijas virzienus AKS ārstēšanā un profilaksē. Otrkārt, KSS nestabilas gaitas riska faktorus varētu izmantot koronāro notikumu un kardiālas nāves riska aprēķināšanai gan primārās, gan sekundārās profilakses kontekstā. Šādu faktoru identificēšanas aktualitāti uzsver arī zināmo tradicionālo KSS riska faktoru vājā korelācija ar slimības gaitu.

Līdz šim publicētajos pētījumos ir meklētas IL atsevišķu polimorfismu asociācijas ar KSS vai MI, bet nav pievērsta uzmanība KSS klīniskajai gaitai. Slimības gaitas ignorēšana var radīt kļūdainu atrasto asociāciju interpretāciju, tādēļ darba galvenā *novitāte, pirmkārt*, ir ģenētisko variāciju salīdzināšana starp KSS slimnieku *apakšgrupām ar krasi atšķirīgu slimības norisi*. Otrkārt, mūsu darbā ir analizēti ne tikai individuāli polimorfismi, bet arī IL-6 promotera haplotipi. Līdz šim literatūrā IL-6

haplotipi ir aprakstīti tikai nelielām veselu indivīdu vai slimnieku grupām, tomēr nevienā no publicētajiem pētījumiem nav bijusi pievērsta uzmanība KSS klīniskās gaitas aspektam.

### **3. Darba mērķis**

Noskaidrot, vai interleikīnu ģenētiskās variācijas ietekmē KSS klīnisko gaitu.

### **4. Darba uzdevumi**

1. Salīdzināt IL-1 $\beta$ , IL-1Ra un IL-6 ģenētisko variāciju prevalenci slimniekiem ar stabili un nestabili KSS sākotnējo gaitu.
2. Analizēt, vai pastāv šo ģenētisko variāciju saistība ar citiem klīniskiem kritērijiem - MI risku un vecumu, kad attīstījās pirmie KSS simptomi vai pirmais MI.
3. Analizēt IL-1 $\beta$ , IL-1Ra un IL-6 ģenētisko variāciju saikni ar angiogrāfiskām vainagartēriju bojājuma pazīmēm - aterosklerotisku vainagartēriju slimību un vainagartēriju totālu oklūziju.
4. Noskaidrot IL ģenētisko variāciju ietekmi uz iekaisuma aktivitāti, analizējot to saistību ar sensitīvā iekaisuma marķiera - C reaktīvā proteīna - līmeni.

### **5. Darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms ir 138 lappuses. Darbs sastāv no 10 nodaļām: ievada, literatūras apskata, darba mērķu un uzdevumu, kā arī pētījuma metožu izklāsta, rezultātiem, diskusijas, aizstāvēšanai izvirzītajām tēzēm, secinājumiem un citētās literatūras saraksta. Nodaļas sadalītas kopsummā 29 apakšnodaļās. Darbs satur 24 tabulas, 27 diagrammas un 3 attēlus. Literatūras saraksts (vēres) sastāv no 145 atsaucēm.

### **6. Zinātniskā darba aprobācija**

Darba rezultāti ir ziņoti vienā starptautiski citējamā publikācijā, kā arī 18 referātu veidā starptautiskās un Latvijas zinātniskās konferencēs, no kuriem 8 referātu abstrakti ir publicēti starptautiski citējamu žurnālu pielikumos un 5 – citos izdevumos.

Latvijas Zinātņu akadēmija darba ietvaros gūtos rezultātus ir atzinusi par vienu no desmit visievērojamākajiem Latvijas zinātnes sasniegumiem 2005. gadā.

### **7. Darba metodes**

Zinātniskais darbs tika veikts Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Kardioloģijas centrā sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru (BMC, Dr. biol. Normunds Līcis). Kopumā laikā no 2000. līdz 2004. gadam pētījuma datubāzē tika iekļautas 970 personas, par kurām bija apkopota detalizēta medicīniskā informācija. No tiem, 686 slimniekiem ir veiktas arī DNS analīzes un noteiktas pētāmās ģenētiskās variācijas: IL-1B (+3954) C/T, IL-1B (-511) C/T, IL-1RN (VNTR), IL-6 (-596) G/A, IL-6 (-572) G/C, IL-6 (-373) AnTn un IL-6 (-174) G/C polimorfismi, kā arī IL-6 haplotipi. Darbā tiek apskatīti šīs 686 slimnieku grupas un dažādu tās apakšgrupu analīžu rezultāti.

## **Pētījuma dizains un kopējās slimnieku grupas atlases principi**

Pētījumā tika iekļauti slimnieki, kas tika stacionēti Latvijas Kardioloģijas centrā koronāro artēriju angiogrāfijas (koronarogrāfijas) veikšanai, lai būtu precīzi zināma aterosklerotiska bojājuma esamība un pakāpe koronārās artērijās, kas samazinātu citu koronāra rakstura sāpju (piemēram, miokarda tiltiņa vai mikrovaskulāras išēmijas) vai nekoronāru iemeslu ietekmi uz rezultātiem. Tika izmantots vienmomenta (*cross-sectional*) pētījuma dizains, kura ietvaros bija iespējams veikt arī retrospektīvas datu analīzes. Pētījumu apstiprināja Latvijas Medicīnas akadēmijas (Rīgas Stradiņa universitātes) ētikas komiteja. Slimnieku iekļaušanas kritēriji bija: (i) vecums  $\leq 70$  gadiem, (ii) KSS raksturīga klīnika, (iii) stacionārā tiek plānota un veikta koronārā angiogrāfija un (iv) slimnieka rakstiska informētā piekrišana dalībai pētījumā. Izslēgšanas kritēriji: (i) iepriekš veiktas koronārās revaskularizācijas (PTCA un/vai CABG) un/vai (ii) slimnieka nevēlēšanās piedalīties pētījumā.

## **Apkopotā informācija par fenotipu**

Par visiem slimniekiem tika iegūta detalizēta fenotipiskā informācija, kā arī veiktas laboratoriskās un ģenētisko polimorfismu analīzes. Tika reģistrēti konvencionālie riska faktori: vecums, dzimums, informācija par smēķēšanas statusu, arteriālo hipertensiju, cukura diabētu un tā tipu, kā arī par agrīnu miokarda infarktu vai pēkšņu kardiālu nāvi ģimenes anamnēzē pirmās pakāpes radniekiem. Ļoti rūpīgi tika apkopota informācija par KSS klīnisko gaitu: vecums, kad slimnieks ievēroja pirmos simptomus; pirmās manifestācijas veids (slodzes vai miera stenokardija, miokarda infarkts utt.); vai ir bijuši miokarda infarkti un to skaits; vecums, kad attīstījies pirmais MI; laiks kopš pirmo simptomu sākuma līdz pirmajam miokarda infarktam; kopējais KSS anamnēzes ilgums; laiks kopš pēdējā MI vai nestabilas stenokardijas (būtisks iekaisuma marķieru analīzei). Lai uzlabotu datu ticamību, katrā atbildē uz jautājumiem īpaši tika atzīmēts, ja informācija nebija pārliecinoša. Tika atzīmēta farmakoterapija, ko slimnieks bija lietojis regulāri pēdējā mēneša laikā, kā arī stacionārā nozīmētā terapija. Slimniekiem noteica svaru un augumu un aprēķināja ķermeņa masas indeksu.

No *laboratoriskajiem* raksturlielumiem serumā tika noteikts lipīdu (KH, ABLH, TG, ZBLH) un glikozes līmenis (reģistrējot arī informāciju, cik stundas pēc pēdējās maltītes ņemti asins paraugi). Citrētā plazmā tika noteikts fibrinogēna līmenis un EDTA asinīs – hemoglobīns un asins šūnu (eritrocītu, leikocītu un trombocītu) skaits, kā arī atsevišķi eritrocītu grimšanas ātrums.

Pirms angiogrāfijas slimniekiem EDTA vakutaineros tika ņemti arī *plazmas paraugi*, kas tūlīt pēc separācijas ar centrifūgu tika sasaldēti un glabāti  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Atkausētos paraugos 14 dienu laikā tika noteikts *augstas sensitivitātes CRP* (hs-CRP) ar imūnefelometrijas metodi (reaģents *N High Sensitivity CRP, Dade Behring*, Marburga, Vācija; nefelometrs BNA/BN 100, *Behring*, Vācija). Noteikšanas diapazons ar šo metodi bija 0,20 – 220 mg/l, un rezultātu variācijas koeficients bija 5,2%.

Visiem slimniekiem tika veikta *koronarogrāfija*, un tās dati reģistrēti pētījuma anketā, atzīmējot galveno vainagartēriju (kreisās vainagartērijas stumbrs, kreisā priekšējā lejpūējā, kreisā apliecošā un labā artērija) un to lielāko zaru (intermediālais zars, diagonālie, marginālie, mugurējais laterālais un mugurējais lejpūējais zars) bojājumu pakāpi procentos atbilstoši invazīvā kardiologa vērtējumam. Par pārliecinošu vainagartēriju slimības kritēriju tika uzskatīta stenoze, kas kompromitēja vainagartērijas vai nozīmīga zara lumenu par  $>50\%$ . Gadījumos, kad šāda stenoze netika atrasta, tika speciāli atzīmēta difūzas aterosklerozes vai sākotnēju aterosklerotisku bojājumu esamība.



## Analizējamo slimnieku apakšgrupu atlasē un izslēgšanas kritēriji

Darba uzdevumiem nepieciešamajām datu apstrādes analīzēm (piemēram, polimorfismu saistībai ar sākotnējo KSS gaitu, CRP līmeni utml.) no pētījuma datubāzes tika atlasītas dažādas slimnieku apakšgrupas, kuru dati atbilda katra konkrētā jautājuma noskaidrošanai. Turpmāk aprakstīti šo apakšgrupu atlasē kritēriji.

### Klīnisko un angiogrāfisko kritēriju analīze

- Stabila un nestabila KSS sākotnējā gaita (tikai slimnieki ar precīzi zināmu anamnēzi):
  - *Stabilās* gaitas grupa - slimnieki ar stabilu stenokardiju bez MI un ar kopējo KSS anamnēzi vismaz 1 gadu, kam koronarogrāfijā tika konstatēta pārliecinoši nozīmīga stenoze (KAS >75%, proti, tādas pakāpes stenoze, kas var būt stenokardijas klīnikas iemesls) un nav nevienas koronārās artērijas oklūzijas (kas varētu norādīt uz iespējamu asimptomātiski pārciestu MI);
  - *Nestabilās* gaitas grupa – slimnieki, kam MI attīstījās pirmā viena gada laikā kopš pirmo KSS simptomu sākuma vai MI bija pirmā slimības izpausme un angiogrāfiski tika apstiprināta KAS (stenoze >50%);
  - *Veselo kontroles* grupa – slimnieki, kam angiogrāfiski nebija nekādas norādes par koronāro artēriju aterosklerozi (arī pangas/stenozes <50%) un nav bijis MI vai aizdomas par to.
- Laiks līdz pirmajam MI:
  - Pierādīta KAS >50%;
  - Skaidri zināma KSS sākotnējā gaita – cik ilgs laiks pagājis līdz 1. MI attīstībai (<1 diena, <1 nedēļa, <1 mēnesis, <1gads vai ≥1 gads) vai arī MI nav bijis.
- Koronāro artēriju oklūzija
  - Visi slimnieki;
  - Apakšanalīzes atkarībā no MI anamnēzes (ir vai nav bijis MI) visā slimnieku grupā un tikai slimniekiem ar koronāro artēriju stenozi >50%.
- Slimnieki ar un bez KSS
  - KSS grupa – slimnieki ar pierādītu KAS>50%;
  - Kontroles grupa - slimnieki bez jebkādiem angiogrāfiskiem norādījumiem par KAS.
  - Netika iekļauti slimnieki, kam angiogrāfiski bija aizdomas par pangam, kas stenozeja lumenu par mazāk kā 50%.
- Vecums, kad pirmo reizi klīniski manifestējās KSS:
  - Slimnieki ar koronāro artēriju stenozi >50%;
  - Skaidri zināms vecums, kad parādījās pirmie KSS simptomi;
  - Kopējais KSS anamnēzes ilgums <20 gadiem.
- Vecums, kad attīstījies pirmais miokarda infarkts:
  - Slimnieki ar angiogrāfiski apstiprinātu koronāro artēriju stenozi >50%;
  - Slimnieki ar nešaubīgi zināmu miokarda infarktu anamnēzē un precīzi zināmu vecumu, kad attīstījies pirmais miokarda infarkts;
  - Izslēgti slimnieki ar šaubīgu MI anamnēzi vai pirmā MI attīstīšanās vecumu.

- Slimnieki ar miokarda infarktu:
  - Analizēta visa slimnieku kopa;
  - MI kritēriji:
    - Angiogrāfiski apstiprināta koronāro artēriju stenoze >50%;
    - Skaidri zināma MI anamnēze.

#### Iekaisuma marķieru analīze

- Sākotnējā pilotprojekta analīze:
  - Iekļauti slimnieki ar angiogrāfiski apstiprinātu koronāro artēriju stenozi >50%;
  - Izslēgšanas kritēriji:
    - CRP līmenis >15 mg/L (n=6), ņemot vērā, ka tik augsts CRP līmenis var norādīt uz slēptu aktīvu iekaisuma slimību (Ridker, 2001);
    - Slimnieki ar nesenu notikušu MI vai nestabilu stenokardiju (pēdējo 3 nedēļu laikā; n=16);
    - Zināma hroniska aktīva iekaisuma slimība (viens slimnieks ar Hodžkina slimību).
- Pilnas slimnieku kopas analīze:
  - No visiem slimniekiem, kam bija zināms CRP (n=671), šai datu analīzei tika atlasīti 624 slimnieki
  - Netika iekļauti 47 slimnieki šādu iemeslu dēļ:
    - Pēdējo trīs nedēļu laikā pārciests MI (n=33);
    - Aktīva iekaisuma slimība (n=4);
    - Sevišķi augsts CRP līmenis, definēts kā >3SD (26,4 mg/L; n=10).

#### **Biomolekulārās analīzes**

Genomiskās DNS iegūšana no asins paraugiem un genotipēšana tika veikta Latvijas Universitātes Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā. Personāls, kurš veica DNS analīzes, nezināja klīnisko informāciju par slimniekiem. DNS tika genotipēta, izmantojot uz PCR balstītu metodi un negatīvā kontrole (reakcijas maisījums bez DNS) tika iekļauta katrā eksperimentā. Reakcijas rezultāti tika analizēti elektroforētiski 2% agarozes gelā, kas saturēja etīdija bromīdu (10 µg/ml), un tās produkti, izņemot IL-1RN VNTR gadījumu, tika attīrīti ar DNS ekstrakcijas komplektu (*DNA extraction kit; Fermentas*, Lietuva). IL-1RN VNTR polimorfisms tika noteikts tieši, balstoties uz elektroforēzes datiem par PCR produktu garumu. Pārējo IL-1 grupas polimorfismu noteikšanai PCR produkti pēc to attīrīšanas tika šķelti ar specifiskām restrikcijas endonukleāzēm un šķelšanas produkti analizēti elektroforētiski 2% agarozē. IL-6 ģenētisko variāciju skrīnings tika veikts ar sekvencēšanu.

#### *Interleikīna-6 polimorfismu un haplotipu noteikšanas metodoloģija*

Pirmajā posmā, lai iegūtu eksperimentāli pamatotu informāciju par alēļu asociācijām Latvijā, tiešā veidā tika noteikti haplotipi aptuveni 100 paraugiem. Lai to izdarītu, vispirms tika iegūta genomisko PCR produktu sekvence. Lai noskaidrotu parauga haplotipu kompozīciju heterozigotiskiem paraugiem, kam haplotipus nevarēja skaidri noteikt, genomiskās PCR produkti tika klonēti un iegūtie kloni sekvencēti. Alternatīvi, individuālie haplotipi tika noteikti, balstoties uz alēļu specifiskām PCR un sekojošu sekvencēšanu. Otrajā posmā par pētījuma kopas haplotipiem tika secināts no genomiskās PCR produktu sekvences. Gadījumos, kad par paraugu haplotipu kompozīciju nevarēja spriest, balstoties uz sākotnējā skrīninga datiem, tika lietota

iepriekš aprakstītā klonēšanas vai alēļspecifiskās PCR metode. Visbeidzot, 45 nejauši atlasītiem paraugiem haplotipu datu precizitāte tika pārbaudīta, atdalot un sekvencējot individuālus haplotipus.

### **Statistiskās apstrādes metodes**

Visas statistiskās kalkūlācijas (*Daly, Bourke & McGilvray, 1991; Field, 2000; Petrie & Sabin, 2000; Pallant, 2001*) tika veiktas ar SPSS programmu (12.0 versiju), izņemot  $\chi^2$  atbilstības testu diviem polimorfismiem, kad tika izmantots interaktīvs internetā pieejams kalkulators (sīkāk sk. *Genotipu biežuma atbilstība Hārdija-Veinberga līdzsvaram*). Atbilstoši vispārpieņemtiem principiem p vērtība 0,05 tika uzskatīta par divpusējo testu rezultātu statistiskās ticamības sliekšni.

### *Mainīgo raksturojums*

Kvantitatīvie mainīgie tika aprakstīti ar aritmētisko vidējo un standarta deviāciju, izņemot gadījumus, kad to sadalījums krasi atšķīrās no normālā (piemēram, CRP), un tādēļ tika aprēķināta mediānā vērtība un standartklūda vai starpkvartīļu intervāls. Kategoriskie jeb kvalitatīvie mainīgie tika raksturoti ar procentuālo proporciju. Mainīgie, kuru dispersija krasi atšķīrās no normālās (vērtējot ar histogrammām un Kolmogorova-Smirnova testu), tika transformēti tuvinot dispersiju normālai, un tālākajos aprēķinos tika izmantotas tikai transformētās vērtības. Piemēram, CRP tika transformēts logaritmiski (log-CRP). Labākas datu uzskatāmības nolūkos, atsevišķos gadījumos rezultātos tika uzrādītas no log-CRP atgriezeniski retransformētās vai mediānās CRP vērtības.

### *Vienmainīgās analīzes (UVA)*

Normāli sadalīto *kvantitatīvo mainīgo* salīdzinājumi tika veikti ar Stjudenta t-testu starp divām grupām vai ANOVA metodi starp trīs un vairāk grupām. Multiplu salīdzinājumu korekcijai *post hoc* analīzē, lai mazinātu statistiskās  $\alpha$  kļūdas iespējamību, tika veikta korekcija ar Bonferoni (*Bonferoni*) vai Takija (*Tukey*) testu. Saistība starp diviem kvantitatīvajiem mainīgajiem, kā arī starp ģenētisko variāciju grupām un kvantitatīvo mainīgo tika analizēta ar lineārās regresijas metodi. *Kategoriskie mainīgie* tika salīdzināti ar Pīrsona (*Pearson*)  $\chi^2$  testu vai Fišera (*Fisher*) eksakto testu atbilstoši testu lietošanas nosacījumiem (Fišera tests tika izmantots 2x2 tabulām, ja gaidāmais gadījumu skaits katrā kategorijā bija mazāks par pieciem). Analizējot genotipu saistību ar kategoriskajiem mainīgajiem, gēnu devas efekta (GDE) modelī (ar trim genotipu variantiem – diviem homozigotu un vienu heterozigotu) tika aprēķināta Spīrmana (*Spearman*) korelācija (un tās r (ro) koeficients), kas tiek izmantota ordinālo mainīgo lineāras saistības analīzei un atspoguļo “gēna devas” efektu. Dominantajos modeļos (salīdzinot vismaz vienas alēles nēsātājus ar tiem, kam nav šīs alēles) tika analizēta atšķirība starp divām grupām ar Pīrsona  $\chi^2$  testu vai Fišera eksakto testu. Gadījumos, kad  $\chi^2$  Pīrsona tests tika izmantots 2x2 tabulām, tika veikta kontinuitātes korekcija pēc Jeitsa (*Yates*) metodes un aprēķināta arī izredžu attiecība (*Odds ratio*, OR).

### *Daudzmainīgās analīzes (MVA)*

Lai noteiktu ģenētisko faktoru ietekmi uz analizējamiem parametriem, ņemot vērā arī zināmos fenotipiskos faktorus, tika veiktas daudzmainīgās analīzes (*multivariate analyses, MVA*). Kvantitatīvo mainīgo analīzei tika izmantota multiplā lineārā regresija un ANCOVA metode. Kategoriskie mainīgie tika analizēti ar

loģistiskās regresijas analīzi, kurā tika iegūta  $\text{Exp}(\beta)$  vērtība, kas raksturo koriģēto ģenētiskā faktora OR.

#### *MVA modeļi*

Ar atpakaļejošās (*backward*) atlasē metodi tika noskaidroti mainīgie, kas statistiski ticami korelēja ar atkarīgo mainīgo, kad tika analizēta saistība ar iekaisuma marķieriem pilotanalīzē. Nozīmīgie mainīgie tika iekļauti modelī kopā ar ģenētiskajiem faktoriem attiecīgajos lineārās vai loģistiskās regresijas modeļos. Kvantitatīvajiem mainīgajiem, izmantojot ANCOVA metodi (SPSS programmas *general linear model*, GLM, opcija), tika aprēķināti koriģētie atkarīgā mainīgā vidējie lielumi.

Gadījumos, kad nozīmīgie neģenētiskie faktori bija zināmi jau no literatūras, modeļi tika veidoti ar ievades (*enter*) pieeju, proti, neveicot neģenētisko neatkarīgo faktoru selekciju. Šāda pieeja tika izmantota klīnisko un angiogrāfisko kritēriju analīzei - visos multiplās (gan lineārās, gan loģistiskās) regresijas modeļos par neģenētiskiem mainīgiem faktoriem tika ievadīti visi konvencionālie riska faktori: vecums, dzimums, holesterīna līmenis, cukura diabēts, arteriālā hipertensija, smēķēšana un pozitīva ģimenes anamnēze (agrīns MI pirmās pakāpes radiniekiem).

#### *Gēnu devas efekta vērtēšana*

Lai noteiktu alēļu vai haplotipu skaita ("gēna devas") ietekmi uz kvantitatīviem un kvalitatīviem parametriem gēnu devas efekta (GDE) modelī, genotipi tika kodēti kā 0 (nav nevienas alēles vai haplotipa), 1 (viena alēle vai haplotips, proti, heterozigoti) un 2 (abas alēlēs vai haplotipi, proti, homozigoti). Pārējos (dihotomiskos) gadījumos genotipi tika kodēti kā 0 un 1.

#### *Genotipu biežuma atbilstība Hārdija-Veinberga līdzsvaram*

Novēroto genotipu atbilstība Hārdija-Veinberga (H-W) līdzsvaram (*Hardy-Weinberg equilibrium*) tika pārbaudīta ar  $\chi^2$  atbilstības testu (*Chi-Square Goodness of Fit test*), kurā tika salīdzināts novēroto genotipu biežums ar gaidāmo genotipu biežumu. Gaidāmais genotipu biežums tika aprēķināts pēc novēroto alēļu biežuma un to kombināciju varbūtības. Bialēliskiem polimorfismiem gaidāmais genotipu biežums tika aprēķināts pēc formulas:  $(p \times q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ , kur p ir izplatītākās alēles sastopamības biežums, q – retākās alēles sastopamības biežums un pp, pq un qq abu alēļu attiecīgās genotipus veidojošās kombinācijas. Polimorfismiem ar vairāk nekā divām alēlēm gaidāmais genotipu sadalījums tika aprēķināts pēc attiecīgi koriģētas līdzīgas formulas, piemēram, IL-1RN (VNTR) polimorfismam ar četrām alēlēm (ar alēļu biežumu attiecīgi p, q, r un s):  $(p \times q \times r \times s)^2 = p^2 + 2pq + 2pr + 2ps + q^2 + 2qr + \dots + s^2$ .

Polimorfismiem ar divām alēlēm šai nolūka tika izmantota SPSS programma. Tā kā polimorfismiem ar vairāk nekā divām alēlēm (IL-1RN (VNTR) un IL-6 (-373) AnTn) daži teorētiski iespējamie retie genotipa varianti paraugā netika novēroti, ar SPSS programmu nebija iespējams pārbaudīt šo variāciju genotipu atbilstību H-W līdzsvaram. Tādēļ šo abu polimorfismu gadījumā tika izmantots internetā pieejams interaktīvs  $\chi^2$  atbilstības testa kalkulators (*GraphPad Software*, 2005). Abu metožu kontroles nolūkā, ar kalkulatoru pārbaudot iegūtos rezultātus arī bialēliskiem polimorfismiem, tika iegūti analogiski rezultāti kā ar SPSS programmu.

## 8. Rezultāti

### 8.1. Pētījuma grupas fenotipiskais un ģenētiskais raksturojums

Visas pētījuma kopas (n=686) fenotipiskais raksturojums (demogrāfiskie un riska faktori, laboratoriskie riska faktoru un iekaisuma marķieru raksturlielumi, prehospitalā terapija, koronārā anamnēze un angiogrāfiskā atrade) apkopots 1. tabulā. Jāatzīmē, ka pārliedzoša KSS (definējot pēc angiogrāfiskās atrades kā vismaz 50% stenozi vismaz vienā vainagartērijā) tika konstatēta 83,2% (n=571) slimnieku, kas tika izmantots arī par atlases kritēriju atsevišķu apakšgrupu padziļinātā izpētē.

#### 1. tabula. Pētījuma personu kopas (n=686) neģenētisko parametru raksturojums

<b>Riska faktori</b>	
Vecums (vidējais, SD)	55,8±8,2
Vīrieši (n, %)	519 (75,7)
KH, mmol/l (vidējais, SD)	5,5±1,3
<5 mmol/l (n, %)	228 (33,2)
5,0-7,0 mmol/l (n, %)	376 (54,8)
>7,0 mmol/l (n, %)	82 (12,0)
ABLH, mmol/l (vidējais, SD)	1,4±0,7
TG, mmol/l (vidējais, SD)	2,2±1,5
ZBLH, mmol/l (vidējais, SD)	3,2±1,1
Arteriālā hipertensija (n, %)	431 (62,8)
Cukura diabēts (n, %)	66 (9,6)
ĶMI, kg x m <sup>2</sup> (vidējais, SD)	28,4±4,3
Adipozitāte (ĶMI >30 kg x m <sup>2</sup> ) (n, %)	208 (30,3)
Smēķēšanas statuss	
Aktīvs smēķētājs (n, %)	203 (29,6)
Izbijis smēķētājs (n, %)	242 (35,3)
Nesmēķētājs (n, %)	241 (35,1)
Agrīns MI ģimenē (n, %)	134 (19,5)
<b>Iekaisuma marķieri</b>	
CRP, mg/l (mediānais, SK)	1,8 (0,3)
CRP >3 mg/l (n, %)	65 (9,5)
FG, g/L (vidējais, SD)	3,3±1,0
<b>KSS raksturojums</b>	
Angiogrāfiski apstiprināta KSS (n, %)	571 (83,2)
Vidējais KSS ilgums (gados)	
<1 gads (n, %)	287 (50,3)
1-5 gadi (n, %)	179 (31,3)
6-10 gadi (n, %)	64 (11,2)
>10 gadi (n, %)	41 (7,2)
Miokarda infarkts anamnēzē	421 (61,4)
<b>Prehospitalā terapija</b>	
Aspirīns (n, %)	600 (87,5)
Klopidogrels (n, %)	53 (7,7)
Statīni (n, %)	286 (41,7)
AKEI (n, %)	387 (56,4)
BB (n, %)	541 (78,9)
Kalcija antagonisti (n, %)	186 (27,1)
Nitrāti (n, %)	438 (63,9)

**2. tabula. Pētījuma kopas analizēto ģenētisko variāciju raksturojums**

Polimorfisms	Alēle	Prevalence (n)	Genotips	Prevalence (n)	P vērtība (H-W)*
IL-1B (-511)	C	0,673 (923)	CC	0,448 (307)	0,830
	T	0,327 (449)	CT	0,450 (309)	
			TT	0,102 (70)	
IL-1B (+3954)	C	0,758 (1040)	CC	0,583 (400)	0,501
	T	0,242 (332)	CT	0,350 (240)	
			TT	0,067 (46)	
IL-1RN (VNTR)	1	0,691 (948)	11	0,474 (325)	0,527
	2	0,288 (395)	12	0,413 (283)	
	3	0,020 (28)	13	0,020 (14)	
	4	0,001 (1)	14	0,002 (1)	
			22	0,071 (49)	
			23	0,020 (14)	
IL-6 (-596)	G	0,502 (689)	GG	0,233 (160)	0,139
	A	0,498 (683)	AG	0,538 (369)	
			AA	0,229 (157)	
IL-6 (-373)	8/12	0,494 (678)	11	0,226 (155)	0,605
	9/11	0,209 (287)	12	0,212 (145)	
	10/11	0,152 (209)	13	0,152 (104)	
	10/10	0,138 (189)	14	0,163 (112)	
	9/12	0,007 (9)	15	0,010 (7)	
			22	0,045 (31)	
			23	0,071 (49)	
			24	0,044 (30)	
			25	0,002 (1)	
			33	0,023 (16)	
			34	0,035 (24)	
			44	0,016 (11)	
			45	0,001 (1)	
IL-6 (-572)	G	0,939 (1288)	GG	0,882 (605)	0,983
	C	0,061 (84)	GC	0,114 (78)	
			CC	0,004 (3)	
IL-6 (-174)	G	0,499 (684)	GG	0,230 (158)	0,162
	C	0,501 (688)	GC	0,537 (368)	
			CC	0,233 (160)	

\* Salīdzinot ar sagaidāmajiem genotipiem atbilstoši Hardija-Veinberga līdzsvaram.

Visi analizētie polimorfismi bija Hārdija–Veinberga līdzsvarā (sk 2. tabulu). Pretstatā vairumam citu personu kopu, kurās IL-6 (-174) G alēle ir izplatītākā (*Humphries et al., 2001; Jones et al., 2001; Margaglione et al., 2001; Vickers et al., 2002; Bennet et al., 2003; Chapman et al., 2003* u.c.), mūsu analizētajos paraugos biežāk sastopama bija IL-6 (-174) C alēle (50,1%). Veicot IL-6 gēna promotora apvidus secības analīzi, tika identificēti deviņi haplotipu varianti (sk 3. tabulu), no kuriem pieci bija plaši izplatīti (>1%), bet pārējie četri - reti (novēroti tikai 21 personai). Haplotipu prevalences bija līdzīga kā iepriekš literatūrā minētajos ziņojumos (*Terry et al., 2000; Acalovshi et al., 2003; Kelberman et al., 2004a*), izņemot biežāk novēroto pirmo haplotipa variantu, kurā ietilpst arī (-174) C alēle. Pie tam, tika konstatēts jauns haplotipa variants (Hap\*6; sk. 3. tabulu), kas iepriekš nav aprakstīts, bet mūsu paraugos bija visizplatītākais no retajiem haplotipiem.

**3. tabula. Interleikīna-6 gēna promotora rajona haplotipu raksturojums pētījuma kopā**

Nr.	Haplotips*	Prevalence (n)	Haplotipu kombinācijas	Prevalence (n)
1	AG8/12C	0,493 (677)	11	0,224 (154)
2	GG9/11G	0,201 (276)	12	0,203 (139)
3	GG10/11G	0,152 (209)	13	0,152 (104)
4	GG10/10G	0,077 (105)	14	0,089 (61)
5	GC10/10G	0,061 (84)	15	0,074 (51)
6	GG9/12G	0,007 (9)	16	0,010 (7)
7	GG9/11C	0,004 (6)	17	0,006 (4)
8	AG9/11C	0,004 (5)	18	0,003 (2)
9	AG8/12G	0,001 (1)	19	0,001 (1)
			22	0,041 (28)
			23	0,069 (47)
			24	0,031 (21)
			25	0,013 (9)
			26	0,001 (1)
			27	0,001 (1)
			28	0,003 (2)
			33	0,023 (16)
			34	0,013 (9)
			35	0,022 (15)
			37	0,001 (1)
			38	0,001 (1)
			44	0,007 (5)
			45	0,004 (3)
			46	0,001 (1)
			55	0,004 (3)

\* Polimorfismu secība: (-596) G/A, (-572) G/C, (-373) AnTn, (-174) G/C

## 8.2. Interleikīnu ģenētisko variāciju saistība ar KSS klīniskiem un angiogrāfiskiem kritērijiem

### *Slimnieki ar stabilu un nestabilu KSS sākotnējo gaitu*

Analīzes mērķis bija noskaidrot, vai kāds no ģenētiskajiem faktoriem varētu veicināt MI attīstīšanos jau agrīnā slimības etapā vai arī, gluži pretēji, sekmēt labvēlīgu slimības gaitu ar ilgstoši stabilu stenokardiju bez MI riska. Atbilstoši metodoloģijā aprakstītajiem klīniskiem un angiogrāfiskiem kritērijiem, tika atlasītas divas KSS klīniskās apakšgrupas – ar klasisku stabilu vai nestabilu KSS norisi, kā arī kontroles (veselo cilvēku) grupa.

No visiem šai analīzei derīgiem cilvēkiem (n=334; 48,7% visas pētījuma kopas) klasiski stabilas KSS gaitas grupai atbilda 50 slimnieki (15,0%), nestabilas norises kritērijiem - 201 slimnieks (60,2%), bet 83 personām (24,9%) KSS angiogrāfiski netika apstiprināta (4. tabula).

Vērtējot slimnieku anamnēzi, konvencionālos RF un saņemto farmakoterapiju (sk. 3. tabulu), redzams, ka nestabilās gaitas slimnieku grupa bija par aptuveni trīs gadiem jaunāka nekā stabilo slimnieku grupa, un arī KSS anamnēzes ilgums šiem cilvēkiem bija īsāks. Abi novērojumi bija gaidāmi, jo slimniekiem ar stabilu KSS gaitu

parasti paiet ilgāks laiks līdz nonākšanai mediķu redzeslokā tieši slimības relatīvi labdabīgās sākotnējās gaitas dēļ. Tāpat arī izskaidrojams fakts, ka MI grupā KH līmenis bija zemāks, visticamāk, tieši aktīvas statīnterapijas dēļ (51,2% vs. 30,0%, p=0,007) - šie slimnieki ātrāk nonāk stacionārā un biežāk saņem savlaicīgu agresīvu hipolipidemizējošu ārstēšanu.

Nestabilo slimnieku grupā bija vairāk vīriešu (85,1% vs. 64,0% stabilo slimnieku grupā, p=0,001). Citi RF starp abām KSS apakšgrupām statistiski ticami neatšķīrās. Tomēr jāatzīmē, ka stabilās gaitas grupa bija par aptuveni diviem gadiem vecāka, un, lai gan šī atšķirība nebija statistiski ticama (p=0,142), tā ir saprotama – ateromas pakāpeniskas progresēšanas gadījumā pirmā manifestācija gaidāma vēlāk. Veicot MVA ar neģenētiskiem riska faktoriem, tikai arteriālā hipertensija, sieviešu dzimums un holesterīna līmenis bija statistiski ticami saistīti ar stabilu sākotnējo gaitu (sk. 5. tabulu).

**4. tabula. Neģenētisko riska faktoru un saņemtās terapijas salīdzinājums starp trim klīniski angiogrāfiskām slimnieku grupām**

	Kontrolgrupa bez KSS (n=83)	Stabilas stenokardijas grupa (n=50)	Nestabilas gaitas grupa (n=201)	p (starp grupām)
Vecums (vidējais±SD)	55,3±9,1	58,3±6,9	55,0±8,7*	0,052
KSS ilgums (gados, vidējais±SD)	-	4,2±3,2	2,6±5,4*	0,131
Vecums, kad attīstījās pirmie KSS simptomi (gados, vidējais±SD)	-	54,2±7,5	52,2±9,1	0,142
RF <sup>‡</sup> skaits (vidējais±SD)	2,3±1,2	2,7±1,1	2,8±1,2 <sup>†</sup>	0,016
KH (mmol/l, vidējais±SD)	5,4±1,2	5,8±1,5	5,3±1,3*	0,025
ĶMI (kg x m <sup>-2</sup> , vidējais±SD)	28,2±4,1	28,2±4,3	28,3±4,5	0,975
CRP (mg/l, mediānais±SK)	1,3±0,5	2,2±0,9 <sup>†</sup>	2,4±0,7 <sup>†</sup>	0,003
FG (vidējais±SD)	3,2±1,7	3,3±1,2	3,2±0,9	0,858
Vīrieši (%)	60,2	64,0	85,1* <sup>†</sup>	<0,001
CD (%)	8,4	12,0	9,0	0,765
Hipertensija (%)	66,3	84,0 <sup>†</sup>	59,2*	0,004
Smēķēšana (%)	45,8	64,0 <sup>†</sup>	76,1 <sup>†</sup>	<0,001
Agrīns MI ģimenē (%)	18,1	20,0	18,9	0,963
Prehospitālā terapija				
Aspirīns (%)	75,9	80,0	89,1 <sup>†</sup>	0,014
Statīni (%)	21,7	30,0	51,2* <sup>†</sup>	<0,001
AKEI (%)	53,0	58,0	58,2	0,713
BB (%)	53,0	76,0 <sup>†</sup>	82,1 <sup>†</sup>	<0,001

\* p<0,05, salīdzinot ar stabilas stenokardijas slimniekiem.

<sup>†</sup> p<0,05, salīdzinot ar kontrolgrupu bez KSS.

<sup>‡</sup> Kategoriskie riska faktori: vecums (>55 gadi sievietei vai >45 gadi vīrietim) saslimšanas brīdī, arteriālā hipertensija, KH >5 mmol/l, CD, smēķēšana, ĶMI >30 kg/m<sup>2</sup>, agrīns MI ģimenē.

**5. tabula. Neģenētisko riska faktoru saistība ar stabilu, salīdzinot ar nestabilu, KSS gaitu (MVA)**

Mainīgais raksturlielums	Exp(β)	p
Konstante	1,35	0,091
Vecums	1,04	0,121
KH līmenis	1,35	0,019
ĶMI	0,93	0,105
Sieviešu dzimums	0,38	0,031
CD	1,24	0,690
Arteriālā hipertensija	3,06	0,011
Smēķēšana	1,10	0,835
Agrīns MI ģimenē	0,80	0,614

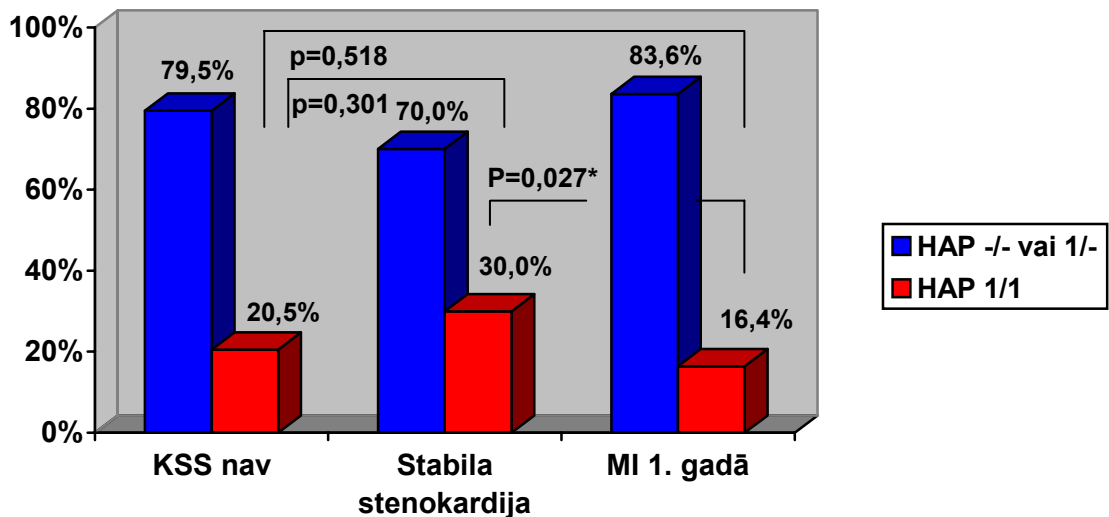


### Ģenētisko variāciju atšķirības starp klīniski angiogrāfiskām slimnieku grupām

Salīdzinot slimniekus ar angiogrāfiski neapstiprinātu KSS ar katru no pārējām klīniski angiogrāfiskām grupām, netika konstatētas statistiski nozīmīgas genotipu atšķirības. Savukārt starp slimniekiem ar stabilu un nestabilu KSS gaitu (sk. 6. tabulu) būtiski atšķirās Hap\*1 homozigotu īpatsvars (sk. 1. diagrammu). Starp slimniekiem, kam MI bija attīstījies jau pirmā gada laikā, Hap\*1 homozigoti bija gandrīz divreiz retāk nekā starp slimniekiem ar ilgstoši stabilu stenokardiju (attiecīgi 16,4% un 30,0%; OR=0,458; nekoriģētais p=0,029, ar Jeitsa korekciju p=0,047).

Atšķirības starp abām KSS klīniskām grupām Hap\*1 heterozigotu un homozigotu ziņā atainotas 2. diagrammā (Pīrsona  $\chi^2$  atšķirības p=0,070; Spīrmena ordinālās korelācijas p=0,243). Veicot MV analīzi, atšķirīgā homozigotu proporcija abām klīniskām grupām saglabājās statistiski ticama, arī ņemot vērā visus tradicionālos RF (Exp( $\beta$ )= 0,41 nestabilai gaitai vai 2,41 stabilai gaitai; p=0,027; sk. 6. tabulu).

### 1. diagramma. IL-6 promotora Hap\*1 homozigotu prevalence starp personām ar angiogrāfiski neapstiprinātu KSS, slimniekiem ar stabilu un nestabilu slimības gaitu



\* Ņemot vērā neģenētiskos riska faktorus (MVA): vecums, KH līmenis, ĶMI, dzimums, CD, arteriālā hipertensija, smēķēšana un agrīns MI ģimenē.

**6. tabula. Ģenētisko variāciju salīdzinājums slimniekiem ar stabilu (n=50) un nestabilu (n=201) KSS sākotnējo gaitu.**

	Modelis*	N <sup>†</sup>	% <sup>†</sup>	Vienmainīgā analīze			Daudzmainīgo analīze <sup>‡</sup>	
				R (Spearman)	OR	P vērtība	Exp(β)	P vērtība
<b>IL-1B (-511) C/T</b>								
CC	GDE	91/112	81,3%	-0,014	-	0,820	0,833	0,505
CT		90/115	78,3%					
TT		20/24	83,3%					
CC+CT (vs. TT)	D (C)	181/227	79,7%	-	0,787	0,794	1,317	0,653
CT+TT (vs. CC)	D (T)	110/139	79,1%	-	0,875	0,797	0,812	0,551
<b>IL-1B (+3954) C/T</b>								
CC	GDE	125/157	79,6%	0,018	-	0,771	1,224	0,500
CT		65/81	80,2%					
TT		11/13	84,6%					
CC+CT (vs. TT)	D (C)	190/238	79,8%	-	0,720	1,000	0,646	0,609
CT+TT (vs. CC)	D (T)	76/94	80,9%	-	1,081	0,941	1,236	0,556
<b>IL-1RN (VNTR)</b>								
<i>IL-1RN(VNTR)*1</i>								
-/-	GDE	20/26	76,9%	0,065	-	0,307	1,405	0,185
1/-		80/103	77,7%					
1/1		101/122	82,8%					
Vismaz viena *1 (vs. -/-)	D	181/225	80,4%	-	1,234	0,868	1,365	0,562
Nav 1/1 (vs. 1/1)	R	100/129	77,5%	-	1,395 <sup>§</sup>	0,375	1,649 <sup>§</sup>	0,159
<i>IL-1RN(VNTR)*2</i>								
-/-	GDE	105/130	80,8%	-0,313	-	0,626	0,745	0,265
2/-		80/99	80,8%					
2/2		16/22	72,7%					
Vismaz viena *2 (vs. -/-)	D	96/121	79,3%	-	0,914	0,900	0,772	0,461
Nav 2/2 (vs. 2/2)	R	185/229	80,8%	-	0,634 <sup>§</sup>	0,402	0,508 <sup>§</sup>	0,217
<i>IL-1RN(VNTR)*3</i>								
-/-	D	194/240	80,8%	-	0,415	0,237	0,531	0,368
3/-		7/11	63,6%					

**6. tabula (turpinājums).**

<b>IL-6 (-596) G/A</b>									
AA	GDE	33/49	67,3%	0,098	-	0,120	1,480	0,129	
AG		117/139	84,2%						
GG		51/63	81,0%						
AA+AG (vs. GG)	D (A)	150/188	79,8%	-	0,929	0,986	0,992	0,985	
AG+GG (vs. AA)	D (G)	168/202	83,2%	-	<b>2,396<sup>†</sup></b>	<b>0,022</b>	<b>2,638</b>	<b>0,014</b>	
<b>IL-6 (-572) G/C</b>									
GG	GDE	177/224	79,0%	0,077	-	0,222	2,050	0,244	
GC		22/25	88,0%						
CC		2/2	100,0%						
GG+GC (vs. CC)	D (G)	199/249	79,9%	-	-	1,000	-	0,999	
GC+CC (vs. GG)	D (C)	24/27	88,9%	-	2,124	0,338	2,003	0,298	
<b>IL-6 (-373) AnTn</b>									
<i>A8T12 (*1)</i>									
-/-	GDE	51/64	79,7%	-0,085	-	0,178	0,708	0,175	
1/-		117/138	84,8%						
1/1		33/49	67,3%						
Vismaz viena *1 (vs. -/-)	D	150/187	80,2%	-	1,033	1,000	1,088	0,829	
Nav 1/1 (vs. 1/1)	R	168/202	83,2%	-	<b>0,417<sup>§</sup></b>	<b>0,022</b>	<b>0,379<sup>§</sup></b>	<b>0,014</b>	
<i>A9T11 (*2)</i>									
-/-	GDE	123/155	79,4%	0,025	-	0,697	1,259	0,454	
2/-		68/84	81,0%						
2/2		10/12	83,3%						
Vismaz viena *2 (vs. -/-)	D	78/96	81,3%	-	1,127	0,839	1,349	0,410	
Nav 2/2 (vs. 2/2)	R	191/239	79,9%	-	1,257 <sup>§</sup>	1,000	1,159 <sup>§</sup>	0,859	
<i>A10T11 (*3)</i>									
-/-	GDE	139/177	78,5%	0,064	-	0,313	1,506	0,274	
3/-		58/70	82,9%						
3/3		4/4	100,0%						
Vismaz viena *3 (vs. -/-)	D	62/74	83,8%	-	1,412	0,437	1,441	0,355	
Nav 3/3 (vs. 3/3)	R	197/247	79,8%	-	-	0,587	-	0,999	

**6. tabula (turpinājums).**

<i>A10T10 (*4)</i>									
-/-	GDE	142/180	78,9%	0,036	-	0,571	0,945	0,861	
4/-		55/64	85,9%						
4/4		4/7	57,1%						
Vismaz viena *4 (vs. -/-)	D	59/71	83,1%	-	1,316	0,564	1,104	0,805	
Nav 4/4 (vs. 4/4)	R	197/244	80,7%	-	0,318 <sup>§</sup>	0,144	0,407 <sup>§</sup>	0,288	
<i>A9T12 (*5)</i>									
-/-	GDE	199/249	79,9%	-	-	-	-	0,999	
5/-		2/2	100%						
5/5		0/0	0%						
Vismaz viena *5 (vs. -/-)	D	2/2	100%	-	-	1,000	-	0,999	
Nav 5/5 (vs. 5/5)	R	251/251	100%	-	-	-	-	-	
<b>IL-6 (-174) G/C</b>									
GG	GDE	50/62	80,6%	-0,090	-	0,156	0,694	0,155	
GC		116/138	84,1%						
CC		35/51	68,6%						
GG+GC (vs. CC)	D (G)	166/200	83,0%	-	<b>2,232</b>	<b>0,036</b>	<b>2,503</b>	<b>0,019</b>	
GC+CC (vs. GG)	D (C)	151/189	79,9%	-	0,954	1,000	1,010	0,981	
<b>IL-6 haplotipi</b>									
<i>Hap*1</i>									
-/-	GDE	51/64	79,7%	-0,074	-	0,243	0,737	0,233	
1/-		117/139	84,2%						
1/1		33/48	68,8%						
Vismaz viens *1 (vs. -/-)	D	150/187	80,2%	-	1,033	1,000	1,088	0,829	
Nav 1/1 (vs. 1/1)	R	168/203	82,8%	-	<b>0,458<sup>§</sup></b>	<b>0,047</b>	<b>0,414<sup>§</sup></b>	<b>0,027</b>	
<i>Hap*2</i>									
-/-	GDE	125/158	79,1%	0,037	-	0,555	1,407	0,292	
2/-		67/83	80,7%						
2/2		9/10	90,0%						
Vismaz viens *2 (vs. -/-)	D	76/93	81,7%	-	1,180	0,737	1,436	0,325	
Nav 2/2 (vs. 2/2)	R	192/241	79,7%	-	2,297 <sup>§</sup>	0,692	1,991 <sup>§</sup>	0,531	

**6. tabula (turpinājums).**

<i>Hap*3</i>									
-/-	GDE	139/177	78,5%	0,059	-	0,313	1,506	0,274	
3/-		58/70	82,9%						
3/3		4/4	100%						
Vismaz viens *3 (vs. -/-)	D	62/74	83,8%	-	1,412	0,437	1,441	0,355	
Nav 3/3 (vs. 3/3)	R	197/247	79,8%	-	-	0,587	-	0,999	
<i>Hap*4</i>									
-/-	GDE	166/206	80,6%	-0,032	-	0,613	1,276	0,244	
4/-		33/41	80,5%						
4/4		2/4	50,0%						
Vismaz viens *4 (vs. -/-)	D	35/45	77,8%	-	0,843	0,825	0,679	0,379	
Nav 4/4 (vs. 4/4)	R	199/247	80,6%	-	0,241 <sup>§</sup>	0,178	0,235 <sup>§</sup>	0,197	
<i>Hap*5</i>									
-/-	GDE	177/224	79,0%	0,077	-	0,222	2,050	0,244	
5/-		22/25	88,0%						
5/5		2/2	100%						
Vismaz viens *5 (vs. -/-)	D	24/27	88,9%	-	2,124	0,338	2,003	0,298	
Nav 5/5 (vs. 5/5)	R	199/249	79,9%	-	-	1,000	-	0,999	
<i>Hap*6</i>									
-/-	D	199/249	79,9%	-	-	1,000	-	0,999	
6/-		2/2	100%						
<i>Hap*7</i>									
-/-	D	198/247	80,2%	-	0,742	1,000	0,569	0,649	
7/-		3/4	75,0%						
<i>Hap*8</i>									
-/-	D	201/250	80,4%	-	-	0,199	-	1,000	
8/-		0/1	0%						
<i>Hap*9</i>									
-/-	D	201/250	80,4%	-	-	0,199	-	1,000	
9/-		0/1	0%						

\* „Gēna devas” modelis: GDE – gēna devas efekts, D – dominants, R – recesīvs.

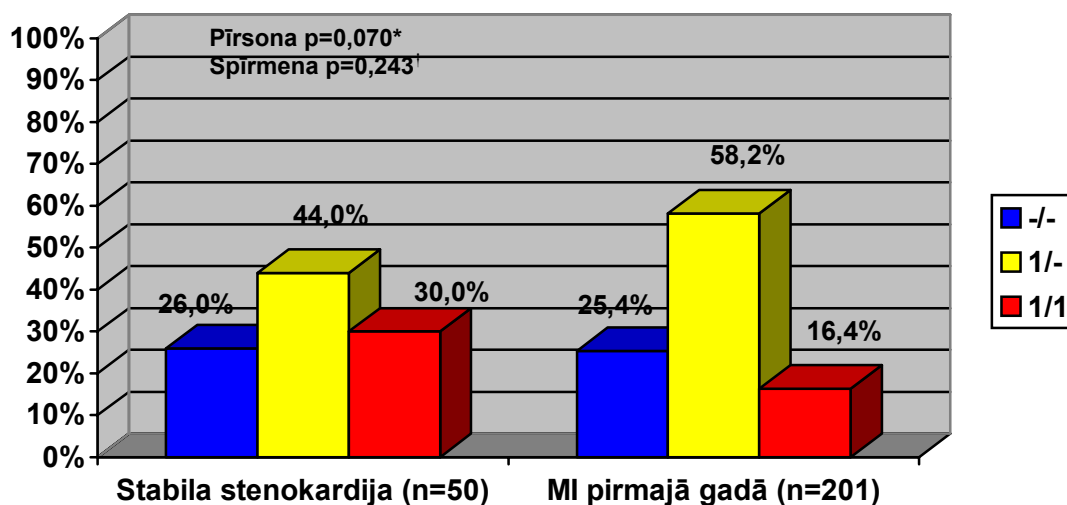
† Slimnieki ar nestabilu gaitu no visiem slimniekiem ar attiecīgu genotipu.

‡ Modelī iekļautie mainīgie: vecums, dzimums, KH, KMI, CD, arteriālā hipertensija, smēķēšana, MI ģimenē un ģenētiskā variācija.

§ Homozigotu OR vai Exp( $\beta$ ), salīdzinot ar pārējiem slimniekiem.

¶ Ar trekniem burtiem atzīmēti statistiski ticamie rezultāti ( $p < 0,05$ ).

**2. diagramma. Hap\*1 skaita sadalījums slimniekiem ar stabilu un nestabilu KSS sākotnējo gaitu**



\* Pīrsona  $\chi^2$  tests (atšķirība starp grupām).

† Spīrmena ordinālās korelācijas tests (lineārā tendence).

No Hap\*1 veidojošām alēlēm visspilgtākā korelācija ar KSS gaitu bija vērojama IL-6 (-596) A un IL-6 (-373) A8T12 homozigotiem (abiem polimorfismiem  $p=0,022$  un  $0,014$  attiecīgi vienmainīgā un daudzmainīgo analīzēs; sk. 6. tabulu). Papildinot MVA modeli ar vecumu, kad attīstījās pirmā KSS klīniskā manifestācija, Hap\*1 homozigotu saistība ar retāku nestabilu KSS gaitu būtiski nemainījās ( $\text{Exp}(\beta)=0,421$ ;  $p=0,030$ ), kas ļauj izslēgt vecumu kā iespējamo rezultātus ietekmējošo faktoru. Arī vecums, kad manifestējās pirmie KSS simptomi, Hap\*1 homozigotiem šai analīzē neatšķīrās no pārējiem slimniekiem (attiecīgi  $52,1 \pm 9,1$  un  $52,7 \pm 8,8$  gadi;  $p=0,671$ ).

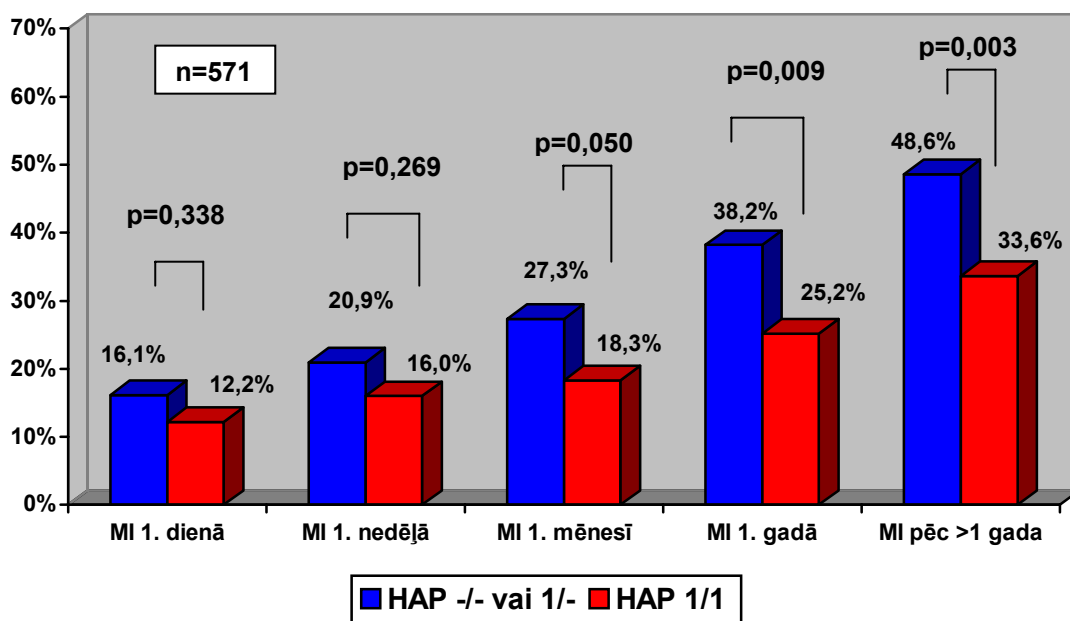
Vienmainīgajā analīzē Hap\*1 homozigotu biežums kontrolgrupā nebija statistiski ticami atšķirīgs no šā haplotipa sastopamības stabilas ( $p=0,301$ ) vai nestabilas gaitas ( $p=0,518$ ) slimniekiem. Arī MV analīzē šīs atšķirības nekļuva nozīmīgas (attiecīgi  $p=0,188$  un  $p=0,570$ ).

**Laiks līdz pirmajam MI**

Tā kā iepriekšējā analīzē tika atklāts, ka Hap\*1 homozigotiem biežāk ir stabila sākotnējā slimības gaita pirmā gada laikā, tika veikti papildaprēķini, lai noskaidrotu, vai viena gada izvēle par laika kritēriju MI grupā nav radījusi slimnieku atlasē un līdz ar to aprēķinu kļūdu. Šim nolūkam atsevišķi tika salīdzināts intervāls līdz pirmā MI attīstības brīdim Hap\*1 homozigotiem un pārējiem slimniekiem. Analīzei tika atlasīti slimnieki ar KSS ( $n=571$ ), starp tiem 381 (66,7%) slimniekam bija MI anamnēze, un 259 slimniekiem (45,4% no visiem jeb 68,0% MI slimnieku) precīzi zināms laiks, kas pagājis no pirmajiem simptomiem līdz pirmajam MI.

Hap\*1 homozigotiem visos analizētajos laikposmos kopš KSS pirmo simptomu sākuma bija vērojama tendence MI attīstīties retāk nekā pārējiem slimniekiem (sk. 3. diagrammu), un šī atšķirība sasniedza statistiskas ticamības robežu pirmā mēneša laikā ( $p=0,050$ ) un īpaši nozīmīga kļuva pēc pirmā mēneša ( $p<0,01$ ).

**3. diagramma. Pirmā miokarda infarkta attīstības laiks kopš KSS klīniskās izpausmes sākuma IL-6 promotora 1. haplotipa homozigotiem, salīdzinot ar pārējiem slimniekiem: kumulatīvā incidence\***



\* No visiem slimniekiem ar angiogrāfiski pierādītu KSS ņemti vērā tikai gadījumi ar skaidru slimības sākotnējo gaitu.

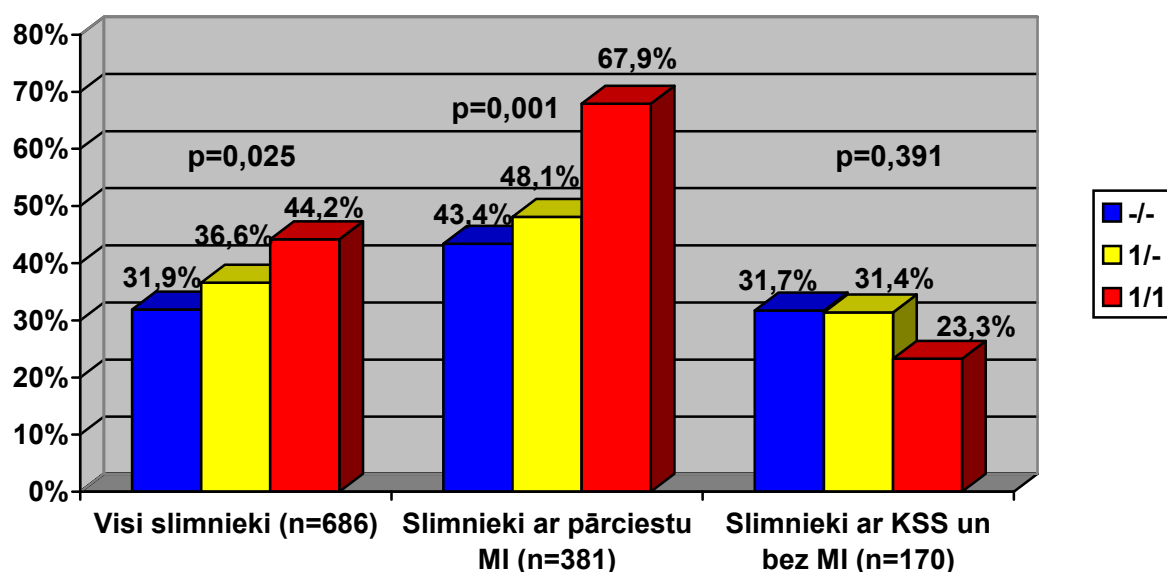
***Vainagartēriju oklūzija***

Analizējot kopējo pētījuma grupu (n=686), 255 slimniekiem (37,2%) tika atrasta vismaz vienas vainagartērijas oklūzija. No visām ģenētiskajām variācijām ar oklūziju no gēna devas atkarīgā veidā korelēja Hap\*1: oklūziju biežums angiogrammā slimniekiem bez Hap\*1 bija 31,9%, ar vienu Hap\*1 – 36,6% un ar abiem Hap\*1 – 44,2% (Spīrmena ordinālās korelācijas  $r=0,086$  un  $p=0,025$ ; sk. 4. diagrammu). Homozigotiem oklūzijas OR bija 1,46 salīdzinot ar pārējiem slimniekiem ( $p=0,052$ ). Pēc MV analīzes Hap\*1 skaita un oklūzijas korelācijas statistiskā ticamība mazinājās ( $\text{Exp}(\beta)=1,221$ ;  $p=0,097$ ).

No visiem slimniekiem ar vainagartērijas oklūziju 246 (96,5%) gadījumos bija skaidri zināma informācija par MI anamnēzi. No tiem savukārt 196 slimniekiem (79,7%) bija pozitīva un 50 slimniekiem – negatīva MI anamnēze (19,6%). Vismaz viena vainagartērija bija okludēta 29,4% (50/170) KSS slimnieku bez MI anamnēzes un 51,4% (196/381) slimnieku ar pārciestu MI.

Analizējot atsevišķi slimniekus ar zināmu pārciestu MI (n=381), Hap\*1 homozigotiem bija statistiski ticami daudz biežākas oklūzijas (67,9%) nekā slimniekiem ar vienu (48,1%) vai nevienu (43,4%) šo haplotipa variantu ( $r=0,163$ ;  $p=0,001$ ; sk. 4. diagrammu). Salīdzinot Hap\*1 homozigotus ar pārējiem genotipiem kopumā (recesīva efekta modelis), statistiskā ticamība saglabājās ( $p=0,001$ ). Lai gan starp slimniekiem bez MI (n=170) Hap\*1 homozigotiem oklūzijas atrada retāk (23,3%, salīdzinot ar 31,4% un 31,7%), šī atšķirība nebija statistiski ticama ne gēna devas ( $r=-0,066$ ;  $p=0,391$ ), ne recesīvā modelī ( $p=0,406$ ).

#### 4. diagramma. Vainagartēriju oklūziju biežums atkarā no IL-6 Hap\*1 skaita



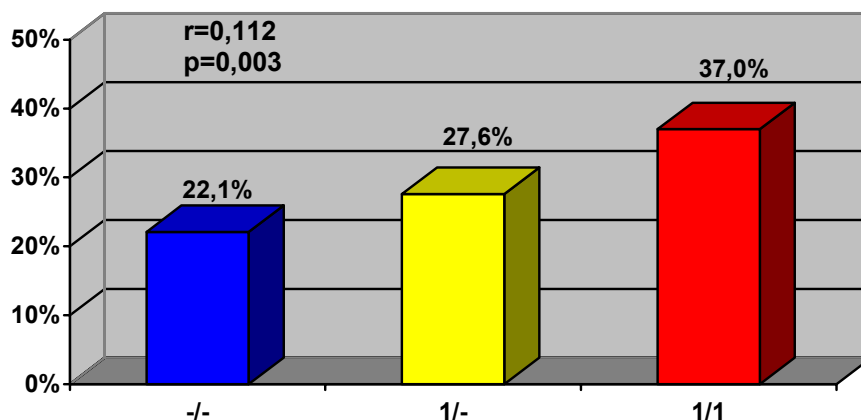
#### *Slimnieki ar MI un vainagartērijas oklūziju*

No visiem slimniekiem 195 (28,4%) bija nešaubīga pārciesta MI diagnoze, kas tika apstiprināta arī angiogrāfiski, konstatējot vainagartērijas oklūziju. Analizējot kombinētā kritērija (MI anamnēze un vainagartērijas oklūzija) biežumu visā slimnieku grupā (n=686), IL-6 promotora apvidus pirmais haplotips stipri korelēja ar MI/oklūziju no gēna devas atkarīgā veidā. Slimniekiem bez Hap\*1, ar vienu un abiem Hap\*1 MI/oklūzijas biežums proporcionāli pieauga: attiecīgi 22,1%, 27,6% un 37,0% slimnieku ( $r=0,112$ ;  $p=0,003$ ; sk. 5. diagrammu). Hap\*1 homozigotiem MI/oklūzijas varbūtība bija par 68% lielāka nekā pārējiem slimniekiem ( $OR=1,678$ ,  $p=0,007$ ). Pārliecinoša Hap\*1 saistība ar biežāku MI/oklūziju saglabājās, arī veicot MV analīzi ( $Exp(\beta)=1,391$ ;  $p=0,011$ ). Jāatzīmē, ka no visiem regresijas modelī ievadītiem tradicionāliem RF tikai smēķēšanas  $Exp(\beta)$  koeficients (1,576) bija lielāks nekā Hap\*1, kas liecina, ka atrastajai sakarībai ir ne tikai statistiska ticamība, bet arī liels ietekmes spēks.

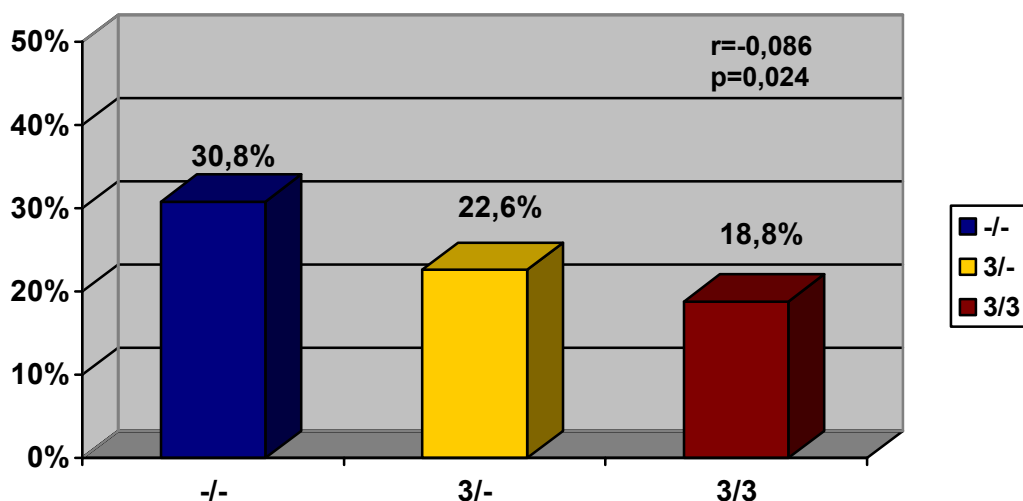
No citiem polimorfismiem statistiski ticami retāku MI un oklūzijas kombināciju novēroja A10T11 (Hap\*3) nēsātājiem: attiecīgi 30,8%, 22,6% un 18,8% slimnieku bez nevienas, ar vienu un abām alēlēm ( $r=-0,086$ ;  $p=0,024$ ; sk. 6. diagrammu). Salīdzinot vismaz vienas A10T11 alēles nēsātājus ar tiem, kas nebija šās alēles nēsātāji, atšķirība (attiecīgi 22,3% un 30,8%) bija joprojām nozīmīga ( $OR=0,643$ ;  $p=0,032$ ). Tā kā A10T11 homozigotu skaits kopā bija neliels (16 slimnieki), nav iespējams nepārprotami spriest par alēles ietekmes veidu, tomēr absolūtie procentuālie rezultāti un fakts, ka homozigoti būtiski neatšķirās no heterozigotiem, liecina par alēles dominanto efektu. Arī MV analīzē A10T11 saistība ar retākām oklūzijām pēc MI saglabāja statistisku ticamību ( $Exp(\beta)=0,664$ ;  $p=0,024$ ).



5. diagramma. Kombinētā kritērija (vainagartērijas oklūzija pēc pārciesta miokarda infarkta) prevalence atkarā no Hap\*1 skaita (n=686)



6. diagramma. Kombinētā kritērija (vainagartērijas oklūzija pēc pārciesta miokarda infarkta) prevalence atkarā no Hap\*3 skaita (n=686)



### Citi klīniskie kritēriji

Tika veiktas arī vairākas papildanalīzes, kuru mērķi bija divi:

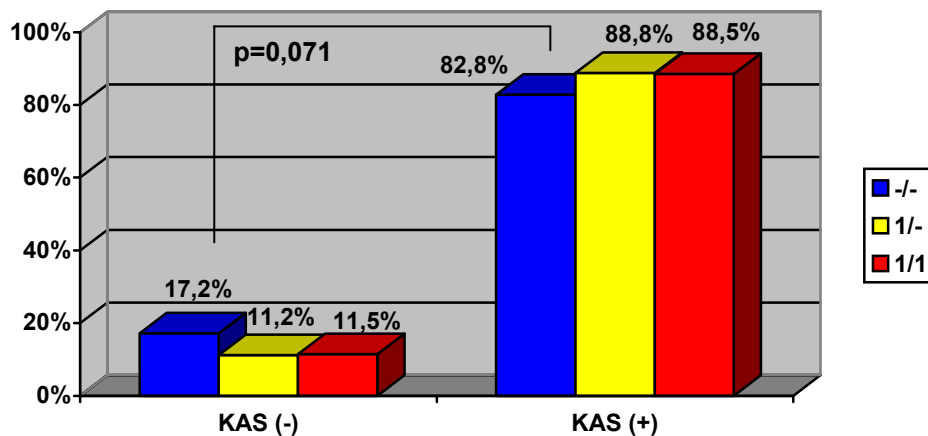
1. Izslēgt varbūtību, ka iepriekš atklātās saistības ir netieši saistītas ar citiem KSS norises faktoriem, piemēram, KSS attīstības risku (neatkarīgi no klīniskās gaitas).
2. Analizēt citas potenciālās polimorfismu saistības ar KSS un tās izpausmēm.

### Slimnieki ar un bez KSS

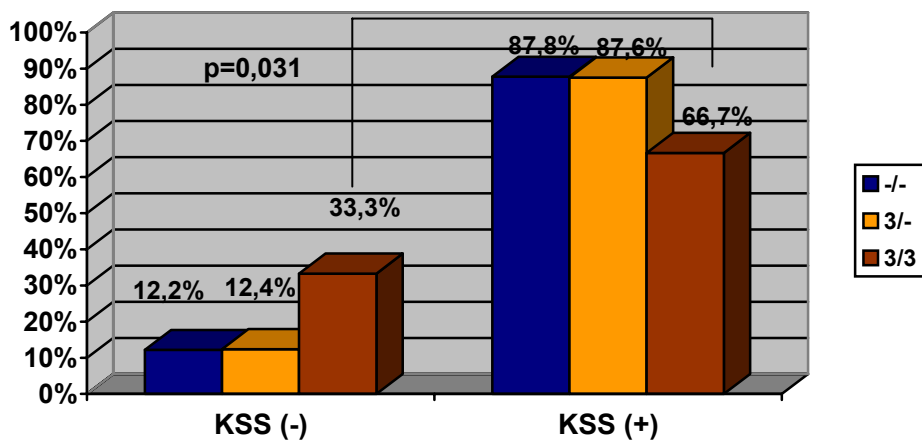
Lai salīdzinātu ģenētisko variāciju atšķirības starp slimniekiem, kam angiogrāfiski tika apstiprināta KSS (stenoze >50%; n=571; 87,3%) un slimniekiem bez jebkādiem angiogrāfiskiem norādījumiem par KSS (n=83; 12,7%), atsevišķi tika analizētas šo slimnieku apakšgrupas (n=654). Netika iekļauti slimnieki, kam angiogrāfiski bija aizdomas par pangām, kas stenozēja lūmenu par mazāk nekā 50%.

Vismaz viena Hap\*1 nēsātājiem biežāk tika atklāta KSS (88,7% vs. 82,8%; sk. 7. diagrammu), lai gan šī sakarība nerasniedza statistisko ticamību (OR=1,636; p=0,071) un MV analizē kļuva vājāka (Exp(β)=1,575; p=0,086). No citām ģenētiskām variācijām nozīmīga saistība tika atrasta Hap\*3 homozigotiem, kam retāk novēroja KAS (66,7% vs. 87,8%; OR=0,28; p=0,031; sk. 8. diagrammu), un šī korelācija saglabāja statistisku ticamību arī pēc MVA (Exp(β)=0,234; p=0,015). Jāpiebilst, ka visi šie slimnieki bija arī IL-6 (-373) A10T11 homozigoti un to kopējais skaits bija neliels (n=15).

7. diagramma. Angiogrāfiski apstiprinātas vainagartēriju slimības biežums atkarā no Hap\*1 skaita (n=654)



8. diagramma. Angiogrāfiski apstiprinātas vainagartēriju slimības biežums atkarā no Hap\*3 skaita (n=654)

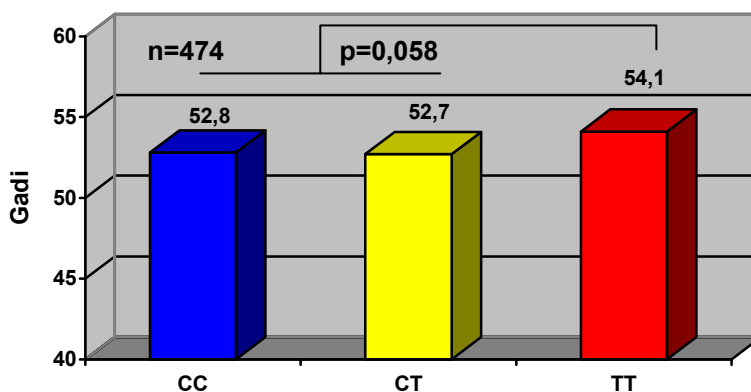


### KSS attīstības vecums

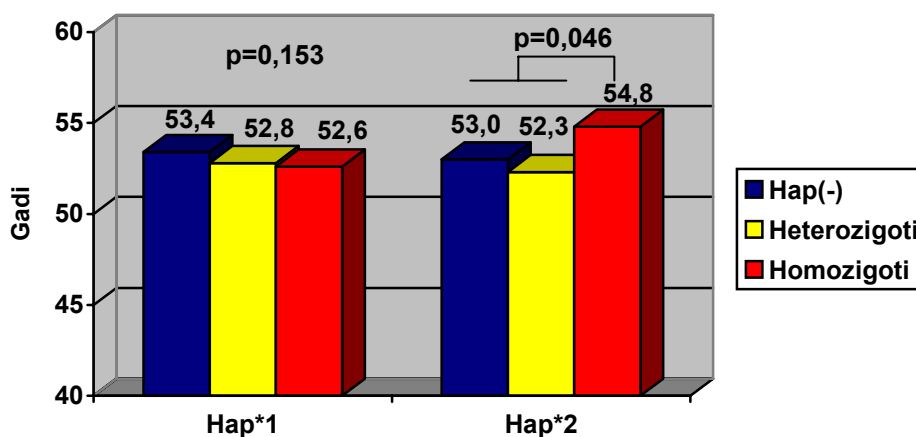
Šai analīzei tika atlasīti slimnieki (n=474), kam angiogrāfiski bija apstiprināta KAS, bija zināms vecums, kad radušies pirmie KSS simptomi. No visām analizētajām ģenētiskajām variācijām visstiprākā korelācija bija vērojama ar IL-1B (+3954) polimorfismu - T homozigotiem KSS pirmie simptomi bija attīstījušies par vidēji 3,6 gadiem vēlāk nekā C alēles nēsātājiem (56,5±7,9 vs. 52,9±8,7 gadi; t=-2,338; p=0,020). Šī atšķirība pēc MVA saglabājās tuvu statistiskai ticamībai ( $\beta=-0,040$ ; p=0,058) un atbilda 1,3 gadu starpībai (sk. 9. diagrammu).

Līdzīga sakarība tika novērota arī Hap\*2 homozigotiem. Lai gan UVA nekonstatēja statistiski ticamas atšķirības (p=0,197), pēc MVA tā kļuva ticama un atbilda divu gadu starpībai ( $\beta=0,042$ ; p=0,046; sk. 10. diagrammu). No Hap\*2 komponentiem analogiska un visizteiktākā saistība bija novērojama IL-6 (-373) A9T11 alēles homozigotiem: lai gan UVA nebija statistiski ticamas atšķirības no pārējiem slimniekiem, par spīti 3,4 gadu vecuma starpībai (t=1,666; p=0,096), toties pēc MVA šī atšķirība kļuva nozīmīga (2 gadi,  $\beta=0,045$ ; p=0,034). Savukārt IL-6 Hap\*1 bija tendence no gēna devas atkarīgā veidā korelēt ar agrāku KSS sākumu (r=-0,083; p=0,071), tomēr pēc MVA šī saistība nebija pārliecinoša ( $\beta=-0,030$ ; p=0,153; sk. 10. diagrammu).

9. diagramma. Koronārās sirds slimības pirmo simptomu vēlāka attīstīšanās slimniekiem ar IL-1B (+3954) TT genotipu (vidējais vecums gados, pēc MVA)



10. diagramma. Koronārās sirds slimības pirmo simptomu manifestācijas vecums (gados) atkarā no Hap\*1 un Hap\*2 skaita (pēc MVA)

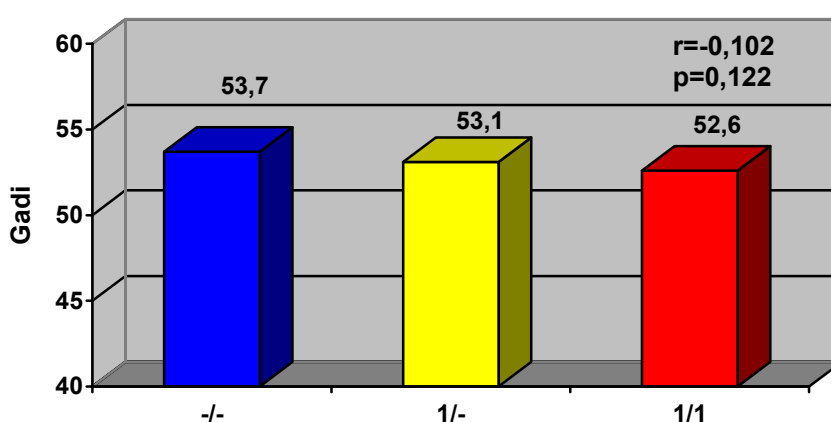


IL-6 Hap\*3 homozigotiem KSS sāka izpausties krietni (6,9 gadus) vēlāk kā pārējiem slimniekiem ( $t=2,094$ ;  $p=0,037$ ), tomēr šī starpība krietni samazinājās un nebija statistiski ticama pēc MVA (1,3 gadi;  $\beta=0,018$ ;  $p=0,400$ ).

#### ***Pirmā MI attīstības vecums***

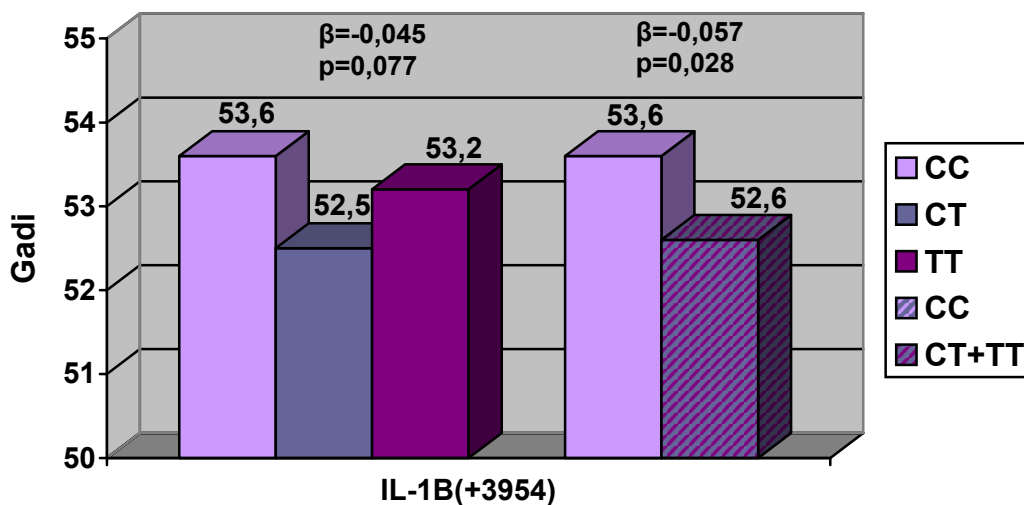
Šis kritērijs sākotnēji tika aplūkots pilotanalīzē ar mazāku slimnieku skaitu ( $n=193$ ). Par rezultātiem ziņots starptautiskā konferencē (*Latkovskis et al., 2004b*). Galīgās statistiskās analīzes atlases kritērijiem atbilda 364 cilvēki. Lai gan UV analīzē IL-6 pirmā haplotipa kopiju skaits bija statistiski gandrīz ticami lineāri saistīts ar MI attīstību agrākā vecumā ( $r=-0,102$ ;  $p=0,052$ ), MVA šī sakarība nebija statistiski ticama ( $\beta=-0,040$ ;  $p=0,122$ ; sk. 11. diagrammu).

**11. diagramma. IL-6 Hap\*1 kopiju skaits un pirmā MI attīstības vecums (MVA;  $n=364$ )**

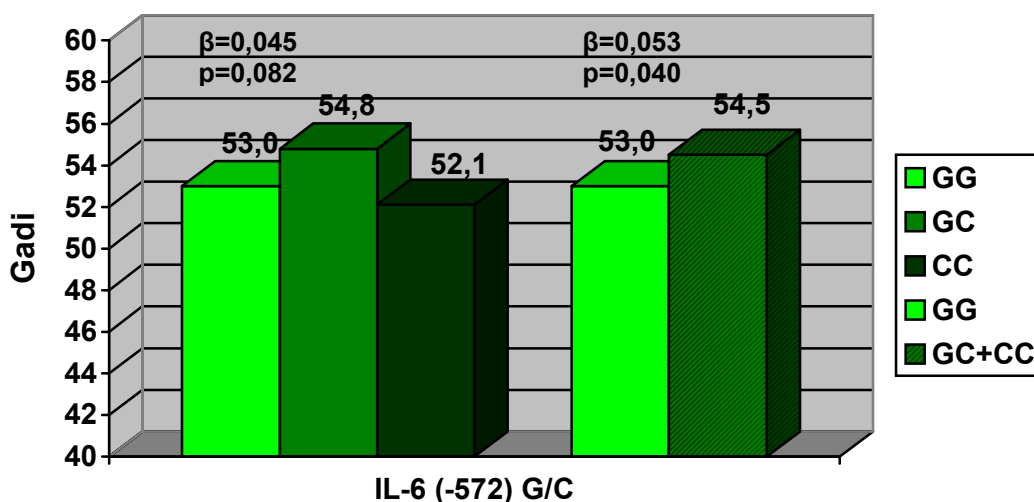


Lai gan vienmainīgajā analīzē IL-1B (+3954) un IL-6 (-572) polimorfismi nekorelēja ar pirmā MI attīstības vecumu, MV analīzē parādījās statistiski ticama saistība IL-1B (+3954) T alēles nēsātājiem ar agrāku un IL-6 (-572) C alēles nēsātājiem ar vēlāku pirmā MI attīstību (sk. 12. un 13. diagrammu). Slimniekiem ar IL-1B (+3954) T alēli (CT vai TT genotipu) pirmais MI bija attīstījies vidēji par 1 gadu agrāk kā slimniekiem ar CC genotipu: attiecīgi  $52,6\pm 0,5$  gados un  $53,6\pm 0,5$  gados ( $\beta=-0,057$ ;  $p=0,028$ ). Turpretim IL-6 (-572) C alēles (un 5. haplotipa) nēsātājiem (ar GC vai CC genotipu) pirmais MI bija attīstījies par 1,5 gadiem vēlāk nekā pārējiem slimniekiem, kam bija GG genotips: attiecīgi  $54,5\pm 0,8$  un  $53,0\pm 0,5$  gados ( $\beta=0,053$ ;  $p=0,040$ ). Jāatzīmē, ka abos gadījumos netika novērota lineāra gēna devas efekta sakarība, ko varētu skaidrot ar alēles dominantām īpašībām un/vai samērā mazām šo alēļu homozigotu grupām – 22 slimnieki ar IL-1B(+3954) TT un trīs slimnieki ar IL-6(-572) CC genotipu.

12. diagramma. IL-1B (+3954) genotipi un pirmā MI attīstības vecums (MVA; n=364)



13. diagramma. IL-6 (-572) genotipi un pirmā MI attīstības vecums (MVA; n=364)



### *Miokarda infarkts anamnēzē*

No visiem 686 slimniekiem 380 gadījumos (55,4%) anamnēzē bija MI un angiogrāfiski apstiprinājās vanagartēriju stenoze >50%. Analizējot ģenētisko variāciju saistību ar MI anamnēzi visā slimnieku grupā, neviens polimorfisms vai haplotips nebija statistiski ticami saistīts ar MI, izņemot VNTR 3. alēles nēsātājiem MI bija retāki nekā pārējiem slimniekiem UVA (attiecīgi 37,0% un 62,1%; OR=0,36; p=0,009). Šī sakarība saglabājās ticama arī MVA (Exp( $\beta$ )=0,353; p=0,012), tomēr šādu personu nebija daudz (n=27; 4%), tādēļ nevar izslēgt atrades nejaušību.

### 8.3. Interleikīnu ģenētiskās variācijas un CRP līmenis

IL ģenētisko polimorfismu saistības ar CRP līmeni analīze tika veikta divreiz. Sākumā pilotpētījums tika izdarīts, balstoties uz mazāku slimnieku skaitu (n=160) bez IL-6 haplotipu analīzes (Latkovskis *et al.*, 2004a). Tomēr, ņemot vērā sākotnējā datu analīze bija veikta ar samērā nelielu slimnieku skaitu, atrade tika pārbaudīta atkārtoti ar lielāku slimnieku skaitu (n=624; Latkovskis *et al.*, 2005a), kas ļāva mazināt potenciālo statistisko  $\alpha$  un  $\beta$  kļūdu varbūtību, analizēt haplotipu ietekmi, kā arī noskaidrot iespējamo mijiedarbību un atšķirības noteiktās slimnieku apakšgrupās.

#### *Pilotpētījuma rezultāti*

Šī analīze ietvēra 160 slimniekus (sk. 7. tabulu), kas tika atlasīti no 198 slimniekiem, lai padarītu grupu homogēniskāku un mazinātu nejaušības ietekmi uz rezultātiem, ņemot vērā samērā nelielo slimnieku parauga lielumu. Atlases un izslēgšanas kritēriji aprakstīti sadaļā *Metodes*. Visu analizēto polimorfismu genotipu sadalījums atbilda Hārdija–Veinberga līdzsvaram (sk. 8. tabulu). Vienmainīgajās analizēs par vērā ņemamiem nozīmīgiem neģenētiskiem faktoriem tika identificēti: smēķēšana (p<0,001), KMI (p=0,005), KH (p=0,018) un CD (p=0,056).

**7. tabula. Pilotpētījumā ietverto slimnieku raksturojums**

Vīrieši (%)	77,5
Smēķētāji (%)	36,3
Cukura diabēts (%)	8,1
Hipertensija (%)	56,9
Vecums, gados (vidējais $\pm$ SD)	53,2 $\pm$ 7,7
KMI, kg $\times$ m <sup>-2</sup> (vidējais $\pm$ SD)	28,47 $\pm$ 4,02
KH, mmol/l (vidējais $\pm$ SD)	5,80 $\pm$ 1,30
CRP, mg/l (mediānais, SK)	1,70 (0,16)
Log-CRP (vidējais $\pm$ SD)	0,23 $\pm$ 0,45

**8. tabula. Pilotpētījumā ietverto slimnieku ģenētisko variāciju raksturojums**

	Alēle	Prevalence (n)	Genotips	Prevalence (n)	P vērtība (H-W)*
<b>IL-1B(+3954)</b>	C	0.72 (230)	CC	0.52 (83)	0,990
	T	0.28 (90)	CT	0.40 (64)	
			TT	0.08 (13)	
<b>IL-1B(-511)</b>	C	0.65 (209)	CC	0.44 (70)	0,825
	T	0.35 (111)	CT	0.43 (69)	
			TT	0.13 (21)	
<b>IL-1RN(VNTR)</b>	1	0.72 (229)	1/1	0.51 (81)	0,998
	2	0.27 (88)	1/2	0.41 (65)	
	3	0.01 (3)	1/3	0.01 (2)	
			2/2	0.07 (11)	
			2/3	0.01 (1)	
<b>IL-6(-174)</b>	C	0.53 (170)	CC	0.27 (43)	0,790
	G	0.47 (150)	CG	0.52 (84)	
			GG	0.21 (33)	
<b>IL-6(-572)</b>	G	0.94 (301)	GG	0.88 (141)	0,598
	C	0.06 (19)	GC	0.12 (19)	

\* Salīdzinot ar sagaidāmajiem genotipiem atbilstoši Hārdija–Veinberga līdzsvaram.

### Ģenētiskie polimorfismi un CRP

Analizējot CRP atšķirības UVA starp genotipiem ar ANOVA metodi, nozīmīgas atšķirības bija vērojamas starp IL-1B (+3954) genotipiem ( $p=0,014$ ) un IL-1RN (VNTR) genotipiem ( $p=0,048$ ). Lai precizētu, vai atrastais gēnu efekts saglabājas arī pēc tam, kad ņemti vērā neģenētiskie faktori, tika veikta MV analīze ar ANCOVA metodi, kurā tika izveidoti divi modeļi (sk. 9. tabulu). Pirmajā modelī tika iekļauts tikai viens polimorfisms un četri neģenētiskie mainīgie, lai precizētu katra polimorfisma individuālo nozīmi. Turklāt tika salīdzināti arī dažādi gēna devas modeļi – recesīvais, gēna devas efekts un dominantais. Otrajā modelī tika ievadīti abi polimorfismi vienlaikus, lai precizētu, vai tiem saglabājas ticama saistība ar CRP, ja tiek ņemts vērā arī otrs polimorfisms. Pirmajā modelī (sk. 9. tabulu) IL-1B (+3954) T alēle bija pārliecinoši saistīta ar augstāku CRP līmeni un šai alēlei bija dominants efekts ( $p=0,002$ ). Savukārt IL-1RN (VNTR) 2. alēle bija saistīta ar zemāku CRP līmeni, un bija vērojama alēles devas ietekme ( $p=0,023$ ), lai gan statistiski ticamāks bija dominantais modelis ( $p=0,009$ ). Kad modelī tika iekļauti abi polimorfismi (sk. 9. tabulu, 2.A un 2.B modelis), statistiski ticama saistība ar CRP saglabājās tikai IL-1B (+3954) T alēlei ( $p<0,05$ ), bet ne IL-1RN (VNTR) 2. alēlei ( $p>0,05$ ).

**9. tabula. C-reaktīvā proteīna līmenis atkarā no IL-1B (+3954) un IL-1RN (VNTR) polimorfismiem**

Polimorfisms	Modelis*	Salīdzinātie genotipi	Log-CRP Vidējais (SK; 95% TI)	CRP <sup>†</sup> mg/L	P vērtība <sup>‡</sup>
<b>1. modelis<sup>§</sup></b>					
IL-1B (+3954)	D	CC	0.240 (0.067; 0.107-0.373)	1.74	0.002
		CT, TT	0.443 (0.067; 0.311-0.574)	2.77	
	GDE	CC	0.240 (0.068; 0.106-0.374)	1.74	0.007
		CT	0.445 (0.071; 0.304-0.585)	2.79	
		TT	0.434 (0.119; 0.198-0.670)	2.72	
	R	CC, CT	0.331 (0.062; 0.208-0.455)	2.14	0.370
TT		0.439 (0.123; 0.197-0.682)	2.75		
IL-1RN (VNTR)	D	1/1, 1/3	0.421 (0.066; 0.290-0.552)	2.64	0.009
		1/2, 2/2, 2/3	0.252 (0.069; 0.115-0.388)	1.79	
	GDE	1/1, 1/3	0.418 (0.067; 0.287-0.550)	2.62	0.023
		1/2, 2/3	0.266 (0.071; 0.126-0.406)	1.85	
		2/2	0.148 (0.135; -0.119-0.415)	1.41	
	R	1/1, 1/2, 1/3, 2/3	0.352 (0.061; 0.232-0.472)	2.25	0.119
		2/2	0.151 (0.137; -0.120-0.422)	1.42	
	<b>2.A modelis<sup>¶</sup></b>				
IL-1B (+3954)	D	CC	0.253 (0.067; 0.120-0.386)	1.79	0.012
		CT, TT	0.420 (0.067; 0.287-0.553)	2.63	
IL-1RN (VNTR)	D	1/1, 1/3	0.395 (0.066; 0.265-0.526)	2.48	0.076
		1/2, 2/2, 2/3	0.277 (0.069; 0.142-0.413)	1.89	
<b>2.B modelis<sup>¶</sup></b>					
IL-1B (+3954)	D	CC	0.216 (0.074; 0.071-0.362)	1.64	0.016
		CT, TT	0.378 (0.081; 0.219-0.538)	2.39	
IL-1RN (VNTR)	GDE	1/1, 1/3	0.395 (0.066; 0.264-0.526)	2.48	0.179
		1/2, 2/3	0.285 (0.070; 0.147-0.424)	1.93	
		2/2	0.212 (0.136; -0.056-0.480)	1.63	

\* - Retās alēles „gēna devas” modelis: D – dominants, GDE – gēna devas efekts, R – recesīvs.

<sup>†</sup> No vidējā log-CRP retransformētās CRP vērtības.

<sup>‡</sup> Balstoties uz log-CRP salīdzinājumiem.

<sup>§</sup> Faktori, kas tika iekļauti 1. modelī: smēķēšana, KMI, KH, CD, viens polimorfisms.

<sup>¶</sup> Faktori, kas tika iekļauti 2.A un 2.B modeļos: smēķēšana, KMI, KH, CD, abi polimorfismi.

### **Paplašinātā datu analīze**

Pēc lielākas personu grupas apkopošanas tika atlasīti slimnieki pēc *Metodēs* aprakstītiem kritērijiem. Šai analīzei bija derīgi 624 slimnieki (sk. 10. tabulu), no kuriem angiogrāfiski pierādīta KAS bija 513 slimniekiem (82,2%) un 80 slimniekiem (12,8%) KSS diagnoze tika izslēgta (angiogrāfiski nebija datu par ateromu, un nebija MI anamnēzes). Pārējie slimnieki nebija skaidri klasificējami vienā vai otrā grupā (n=31; 5%).

**10. tabula. Paplašinātās analīzes slimnieku kopas raksturojums (n=624)**

<b>Kardiovaskulārie riska faktori</b>	
Vīrieši (n, %)	473 (75,8)
Vecums gadi (vidējais ± SD)	55,79 ± 8,05
Smēķēšana (n, %)	183 (29,3)
Cukura diabēts (n, %)	60 (9,6)
Arteriāla hipertensija (n, %)	396 (63,5)
KH, mmol/l (vidējais ± SD)	5,55 ± 1,28
Hiperholesterinēmija* (n, %)	397 (63,3)
ĶMI, kg x m <sup>-2</sup> (vidējais ± SD)	28,40 ± 4,14
Adipozitāte† (n, %)	204 (67,3)
Agrīns MI ģimenē (n, %)	119 (19,1)
<b>KSS raksturojums</b>	
Angiogrāfiski‡	
KSS apstiprināta (n, %)	513 (82,2)
KSS neapstiprināta (n, %)	80 (12,8)
KSS šaubīga (n, %)	31 (5,0)
Pārciests MI (n, %)	378 (60,6)
<b>Prehospitālā farmakoterapija (n, %)</b>	
Aspirīns	531 (85,1)
Klopidogrels	31 (5,0)
Staīni	248 (39,7)
AKE inhibitori	344 (55,1)
Bēta blokatori	479 (76,8)
<b>Iekaisuma marķieri</b>	
CRP, mg/l (mediānais, SK)	1,70 (0,16)
FG, g/l (vidējais ± SD)	3,15 ± 0,73

\* KH >5 mmol/L

† ĶMI >30 kg x m<sup>-2</sup>

‡ Apstiprināta KSS – angiogrāfiski stenoze >50%, neapstiprināta KSS – angiogrāfiski nav pārliecinošu aterosklerozes pazīmju; šaubīga KSS – stenozes <50% vai iespējamās aterosklerotiskas pangas.

### **Neģenētisko faktoru saistība ar CRP**

Veicot atpakaļejošo (*backward*) multiplo lineāro regresiju, par statistiski ticami nozīmīgiem mainīgiem, kas bija saistīti ar CRP līmeni tika identificēti šādi faktori: fibrinogēns ( $\beta=0,424$ ;  $p<0,001$ ), ĶMI ( $\beta=0,134$ ;  $p<0,001$ ), smēķēšana ( $\beta=0,128$ ;  $p=0,001$ ), vīrieša dzimums ( $\beta=0,126$ ;  $p=0,001$ ), hipertensija ( $\beta=0,104$ ;  $p=0,004$ ) un aspirīna lietošana ( $\beta=0,085$ ;  $p=0,017$ ). Šie mainīgie tika izmantoti turpmākās MV analīzēs (multiplā lineārā un loģistiskās regresijas analīzē), izmantojot piespiedu ievadīšanas (*forced entry*) modeli.

### **Ģenētiskās variācijas un CRP**

C reaktīvā proteīna līmeņu salīdzināšana atkarā no analizētiem genotipiem un haplotipiem tika veikta, izmantojot gan logaritmiski transformētās CRP (Log-CRP) vērtības, gan kategorisko mainīgo (CRP >3 mg/l), ņemot (UVA) un ņemot (MVA) vērā neģenētiskos faktorus. Apmēram 1/3 slimnieku (n=210; 33,7%) CRP bija

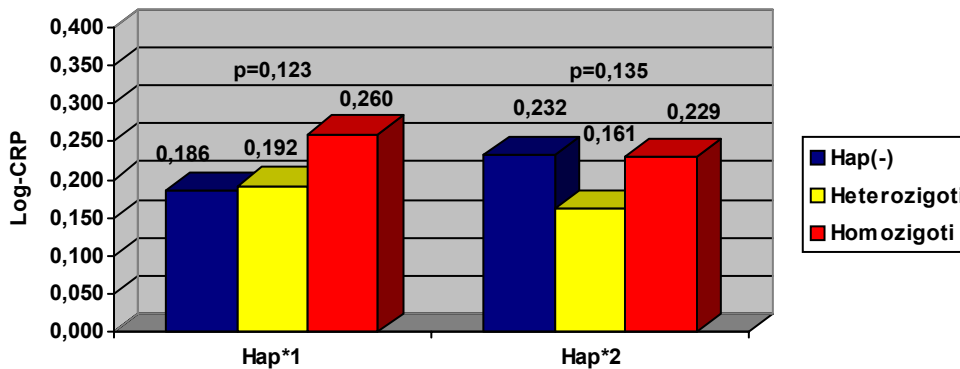


paaugstināts (>3 mg/l). Atšķirā no pilotanalīzes papildus tika noteikti arī AnTn polimorfisms un IL-6 promotora haplotipi. Par analīzes prelimināriem rezultātiem ziņots starptautiskā konferencē (Latkovskis et al., 2005a).

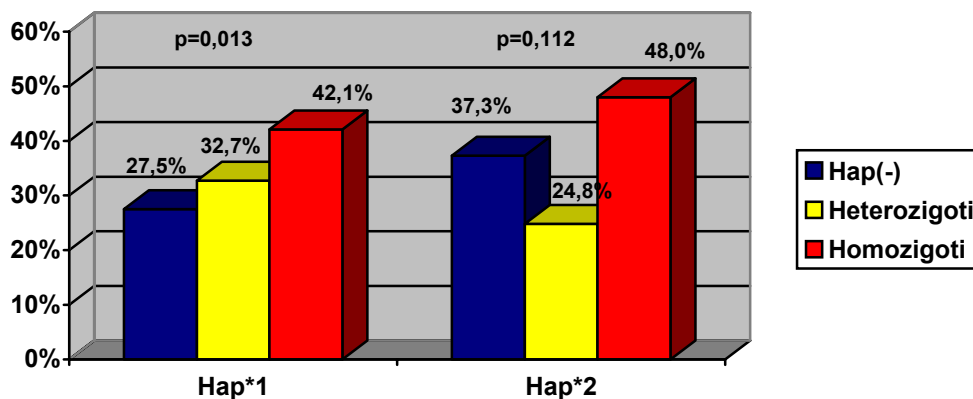
#### *Hap\*1 un Hap\*2*

No izplatītākajām variācijām statistiski ticami zemāks līmenis bija vismaz viena Hap\*2 nēsātājiem (UVA  $p=0,048$ ), tomēr MVA šīs sakarības ticamība izzuda ( $p=0,063$ ). Otrkārt, UVA tika novērota lineāra saistība starp Hap\*1 skaitu un augstāku CRP līmeni ( $p=0,061$ ), taču arī tā MVA zaudēja statistisko ticamību (retransformētās vidējās CRP vērtības attiecīgi 1,53 mg/L, 1,56 mg/L un 1,82 mg/L;  $p=0,123$ ; 14. diagramma), lai gan homozigotiem, salīdzinājumā ar pārējo slimnieku grupu, bija vērojama statistiskas ticamības tendence gan UVA ( $p=0,055$ ), gan MVA ( $p=0,073$ ). Padziļināti analizējot CRP līmeni atkarībā no šo haplotipu skaita, tika novērots, ka slimniekiem ar vismaz vienu Hap\*2 bija zemāks CRP līmenis kā slimniekiem ar nevienu vai diviem Hap\*2 (14. diagramma). Retransformētās CRP vērtības slimniekiem bez Hap\*2, ar vienu un abiem Hap\*2 attiecīgi bija 1,71 mg/L, 1,45 mg/L un 1,69 mg/L. Analógiskas, bet Hap\*1 gadījumā statistiski pārliecinošas sakarības, novēroja salīdzinot slimniekus ar paaugstinātu CRP (>3 mg/L; 15. diagramma). Hap\*1 homozigotu būtiskā atšķirība no pārējiem slimniekiem gan UV analīzē ( $p=0,019$ ), gan MV analīzē ( $p=0,016$ ), liecina par šī haplotipa recesīvo ietekmi.

**14. diagramma. Log-CRP atkarā no 1. un 2. haplotipu skaita (pēc MVA)**



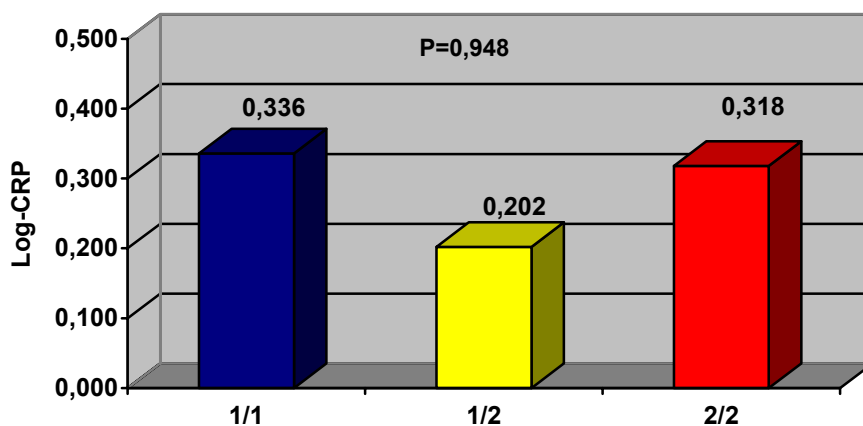
**15. diagramma. Augsts CRP (>3 mg/L) atkarā no 1. un 2. haplotipu skaita (pēc MVA)**



Lai gan Hap\*2 klātie no statistiskā viedokļa bija nozīmīgi saistīta ar zemāku CRP, tā nelineārajai saistībai ar CRP līmeni tika pieļauti vairāki iespējamie skaidrojumi (sk. diskusiju). No visiem slimniekiem, kas bija Hap\*2 heterozigoti (n=202), tikai 127 gadījumos (62,9%) otrs bija Hap\*1. Lai noskaidrotu Hap\*2 ietekmi uz CRP uz Hap\*1 fona, tika analizēti 297 slimnieki, kas bija tikai Hap\*1 vai Hap\*2 nēsātāji.

Tāpat kā visā kopā, arī šai apakšgrupā netika iegūta lineāra sakarība starp Hap\*2 skaitu un CRP līmeni (p=0,948; sk. 16. diagrammu), kas norādīja, ka Hap\*2 saistība ar zemāku CRP nav izskaidrojama ar Hap\*2 heterozigotiem, kas nav Hap\*1 nēsātāji (2/3, 2/4 u.c.). Slimnieku apakšgrupās ar KSS un bez KSS abiem haplotipiem tika novērotas līdzīgas sakarības, lai gan mazo grupu dēļ statistiskā ticamība mazinājās.

**16. diagramma. CRP līmenis (Log-CRP) slimniekiem tikai ar 1. un/vai 2. haplotipu: 1/1 (n=145), 1/2 (n=127), 2/2 (n=25)**



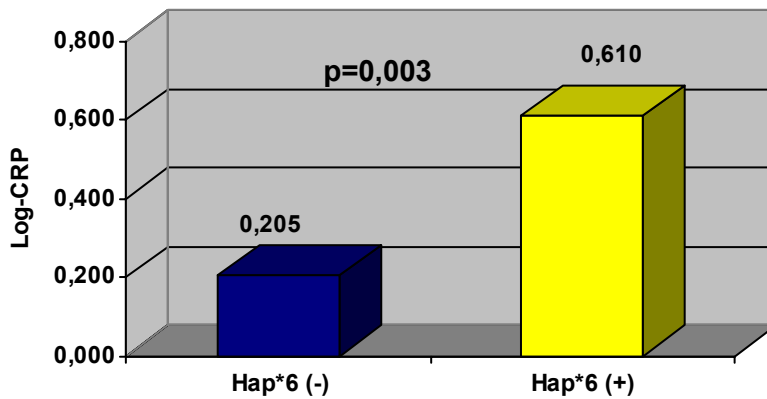
#### 6. haplotips un A9T12 alēle

No visiem polimorfismiem unifaktoriālā analizē statistiski vistīcāmākā saistība ar CRP līmeni bija vērojama slimniekiem ar 6. haplotipu (n=9), no kuriem visi bija arī vienīgie A9T12 alēles nēsātāji šai paraugā. Šīm personām (visi tikai heterozigoti), CRP līmenis bija krietni augstāks (sk. 17. diagrammu) nekā slimniekiem bez Hap\*6 (retransformētās CRP vērtības attiecīgi 4,78 mg/l un 1,86 mg/l; p=0,008). Kad tika veikta MV analīze ar multiplo lineāro regresiju, Hap\*6 saistība ar augstu CRP līmeni kļuva tikai nozīmīgāka: retransformētais CRP bija vidēji 4,07 mg/l Hap\*6 nēsātājiem, salīdzinot ar 1,60 mg/l pārējiem slimniekiem (p=0,003). Šai ģenētiskajā apakšgrupā paaugstinātu CRP (>3 mg/l) novēroja divreiz biežāk nekā pārējiem slimniekiem (attiecīgi 66,7% vs 33,2%; OR=4,03; p=0,067; sk. 18. diagrammu), kas MV analizē kļuva statistiski ticami (Exp(β)=4,631; p=0,037). Tomēr nevar izslēgt, ka Hap\*6 (A9T12) saistība ar CRP ir nejauša pārāk mazās šādu slimnieku apakšgrupas dēļ.

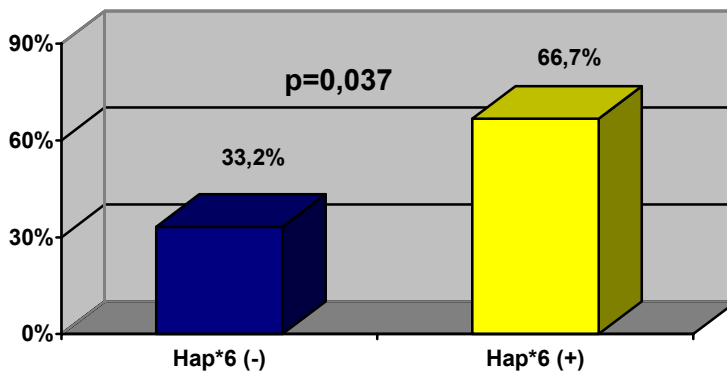
#### AnTn polimorfisma loma

Lai noskaidrotu izolētu AnTn polimorfisma ietekmi uz CRP līmeni, ja tiek ņemti vērā arī pārējie promotera haplotipu komponenti, CRP līmenis tika salīdzināts starp haplotipiem \*2, \*3, \*4 un \*6, kas visi satur G alēli -596, -572 un -174 pozīcijās, bet atšķiras tikai ar AnTn attiecīgi sekojošā veidā: 9/11, 10/11/, 10/10 un 9/12.

17. diagramma. Log-CRP atkarā no 6. haplotipa klātbūtnes (pēc MVA)



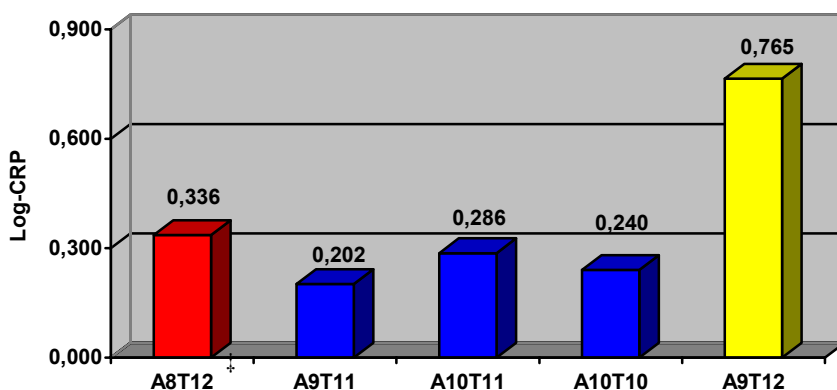
18. diagramma. Slimnieki ar CRP>3 mg/L atkarā no 6. haplotipa klātbūtnes (pēc MVA)



Pēc literatūrā aprakstītas metodes (Kelberman *et al.*, 2004a) šim nolūkam tika atlasīti 279 heterozigotiski slimnieki, kas visi bija Hap\*1 nēsātāji un attiecīgi Hap\*2 (n=127; 45,5%), Hap\*3 (n=92; 33,0%), Hap\*4 (n=53; 19,0%) vai Hap\*6 (n=7; 2,5%) nēsātāji, proti, ar haplotipu kombinācijām 1/2, 1/3, 1/4 un 1/6. Tāpēc viens haplotips visiem slimniekiem bija identisks, bet otrs atšķīrās tikai AnTn pozīcijā. Slimniekiem ar A9T12 bija statistiski ticami augstāks log-CRP (retransformētais CRP 5,82 mg/l), salīdzinot ar visiem pārējiem haplotipu variantiem (log-CRP salīdzinājumu sk. 19. diagrammā): A9T11 (1,59 mg/l; p=0,002), A10T11 (1,93 mg/l; p=0,010) un A10T10 (1,74 mg/l; p=0,006). Statistiski ticams rezultāts saglabājās arī tad, ja rezultāti tika koriģēti, ņemot vērā multiplo salīdzināšanu ar Takija HSD metodi (p vērtība attiecīgi: 0,012; 0,048 un 0,002). Starp A9T11, A10T11 un A10T10 savstarpēji statistiski ticamas CRP atšķirības netika novērotas.

Salīdzinot Hap\*1 raksturīgo A8T12 alēli (kas ir stipri nelīdzsvaroti saistīta arī ar -174C un -596A alēli) ar pārējām AnTn alēlēm, statistiski ticamas atšķirības tika konstatētas ar A9T12 (p=0,020) un A9T11 (p=0,020) alēli (sk. 19. diagrammu).

19. diagramma. Log-CRP vidējās vērtības atkarā no AnTn variantiem (UVA)<sup>\*,†</sup>



\* Visiem slimniekiem otrs bija Hap\*1 - atlasīti slimnieki ar 1/1 (n=145), 1/2 (n=127), 1/3 (n=92), 1/4 (n=53) un 1/6 (n=7) haplotipiem.

† Atbilstošās retransformētās CRP vērtības un statistiskās p vērtības sk. tekstā.

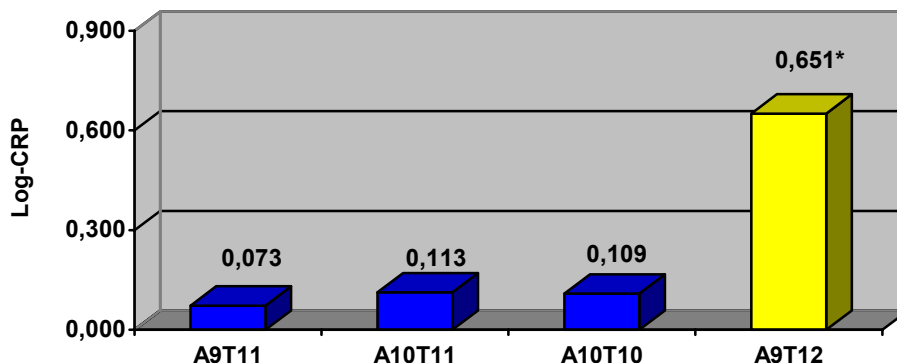
‡ Personām ar A8T12 alēli atšķiras arī SNP polimorfismi -174 un -596 pozīcijā.

MVA tika veikta, lietojot divus modeļus – iekļaujot Hap\*1 homozigotus un bez tiem – šādu apsvērumu dēļ:

1. lai salīdzinātu izolēto AnTn ietekmi starp retākajiem variantiem;
2. A8T12 ietekmi uz CRP nav iespējams nodalīt no -596A un -174C;
3. MVA koriģētās vidējās log-CRP vērtības atkarīgas no modelī ievadīto haplotipu skaita.

Veicot MVA bez Hap\*1 homozigotiem (proti, ar visiem AnTn variantiem, izņemot biežāko A8T12), AnTn četri varianti kopā ar sešiem neģenētiskajiem faktoriem ļoti nozīmīgi prognozēja CRP līmeni ( $F=5,137$ ;  $p=0,002$ ), saglabājoties līdzīgām atšķirībām starp alēlēm (sk. 20.diagrammu). Starp A9T12 un pārējiem trim variantiem starpība bija statistiski ticama (A9T11,  $p=0,0001$ ; A10T11,  $p=0,0003$ ; A10T10,  $p=0,0004$ ) (ar Bonferoni korekciju:  $p$  attiecīgi 0,001; 0,002 un 0,003). Starp pārējām alēlēm (A9T11, A10T11 un A10T10) savstarpēju nozīmīgu atšķirību nebija ( $p>0,05$ ).

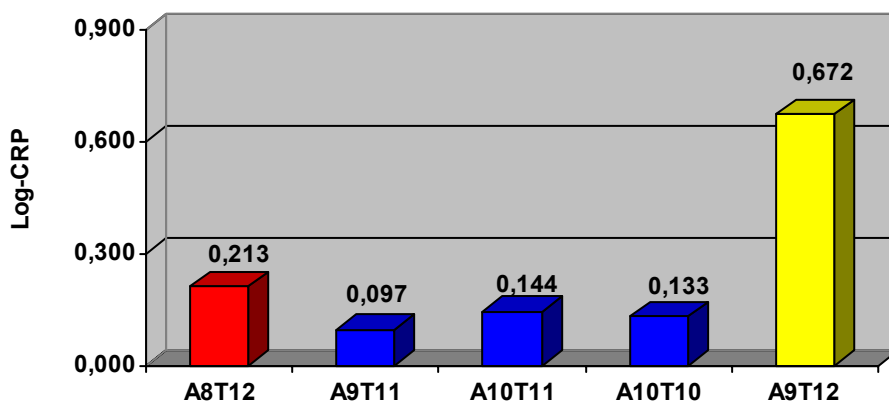
20. diagramma. Log-CRP salīdzinājums slimniekiem ar 1/2, 1/3, 1/4 un 1/6 haplotipu variantiem (MVA)



\*  $P<0,001$  - salīdzinot A9T12 ar katru no pārējām AnTn alēlēm (MVA). Atbilstošās retransformētās CRP vērtības attiecīgi: 1,18 mg/L, 1,30 mg/L, 1,28 mg/L un 4,48 mg/L.

Iekļaujot MVA arī Hap\*1 homozigotus, statistiski nozīmīgas atšķirības bija vērojamas starp A9T12 un ar katru no pārējām alēlēm: A8T12 ( $p=0,004$ ), A9T11 ( $p=0,0003$ ), A10T11 ( $p=0,001$ ) un A10T10 ( $p=0,001$ ; sk. 21. diagrammu). No citām alēlēm statistiski nozīmīga atšķirība bija tikai starp A8T12 un A9T11 ( $p=0,022$ ).

**21. diagramma. AnTn četru reto variantu Log-CRP vidējās vērtības salīdzinājums ar biežāko A8T12 alēli (MVA)<sup>\*,†</sup>**



\*  $p<0,01$  - salīdzinot A9T12 ar visām pārējām alēlēm;  $p<0,05$  – salīdzinot A8T12 ar A9T11.

† Atbilstošās retransformētās CRP vērtības attiecīgi: 1,63 mg/L, 1,25 mg/L, 1,39 mg/L, 1,36 mg/L un 4,70 mg/L.

*IL-1B (+3954) C/T un tā mijiedarbība ar KSS*

Tāpat kā pilotanalīzē (sk. iepriekš), arī visā 624 slimnieku kopā saglabājās T alēles saistība ar augstāku CRP līmeni, tomēr šī sakarība nebija statistiski ticama un norādīja uz iespējamu T alēles ietekmi recesīvā veidā (sk. 6.3.5. tabulu). Slimniekiem ar TT genotipu paaugstinātu CRP līmeni ( $>3$  mg/l) sastapa biežāk kā slimniekiem ar CT un CC genotipu (attiecīgi 46,3%, 33,8% un 32,2%), un šī atšķirība starp slimniekiem ar TT un CT/CC genotipiem bija tuvu statistiski ticamai ( $p=0,075$  UVA un  $p=0,070$  MVA).

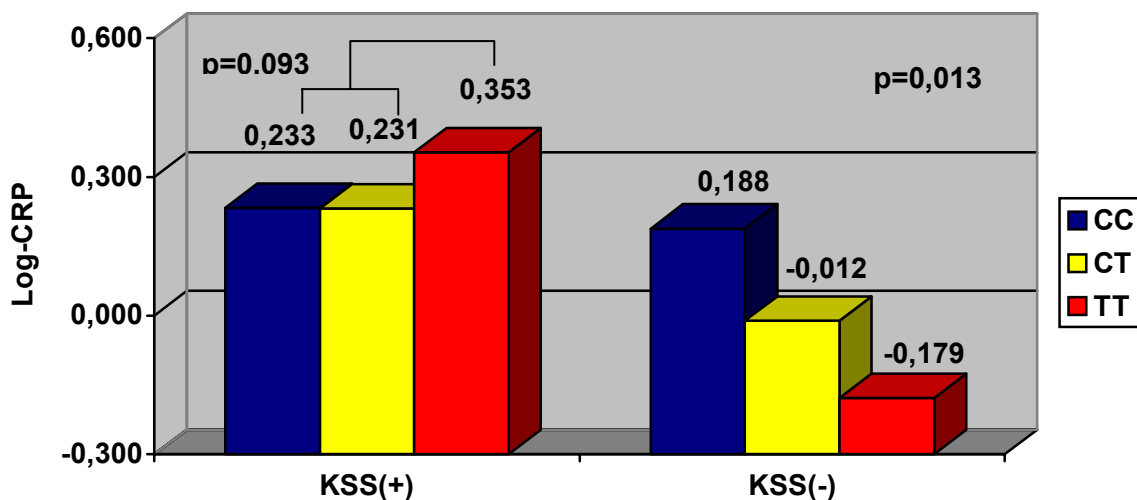
Lai noskaidrotu iespējamus cēloņus, kādēļ iepriekš atrastā T alēles saistība ar augstāku CRP līmeni nebija tik pārliecinoša paplašinātajā analīzē, tika veikti papildaprēķini, analizējot vairākus potenciālos skaidrojumus:

- (i) Atšķirā no pilotanalīzes paplašinātajā analīzē tika iekļauti slimnieki arī ar augstāku CRP līmeni ( $>15$  mg/l), bet tika izslēgti tikai slimnieki ar CRP  $>3$  SD (26,4 mg/l). Ierobežojot datu analīzi vienīgi uz slimniekiem ar CRP  $<15$  mg/l ( $n=909$ ; 97,1%), rezultāts būtiski neatšķīrās. Tātad ar CRP līmeņa atšķirību nevar izskaidrot statistiskās ticamības mazināšanos.
- (ii) Par iespējamu rezultātu neprecīzas atbilstības cēloni tika pieļauta vairāku (sešu) neģenētisko faktoru iekļaušana MVA modeļos paplašinātajā analīzē kā pilotanalīzē (četri neģenētiskie faktori). Pret to liecināja fakts, ka paplašinātajā analīzē arī UVA netika konstatēta augsta statistiskā ticamība. Turklāt, pārbaudot MVA ar sākotnējā analīzē izmantotajiem četriem mainīgajiem, rezultāti būtiski neatšķīrās.
- (iii) Pilotanalīzē tika iekļauti tikai slimnieki ar angiogrāfiski pierādītu KSS, savukārt paplašinātās analīzes kopā angiogrāfiski tā bija pierādīta 513 (82,2%) personām. Veicot atsevišķu analīzi slimniekiem ar pierādītu KSS

un personām bez KSS (n=80, 12,8%), atklājās mijiedarbība ar KSS - IL-1B (+3954) T alēles saistība ar CRP abās grupās bija pilnīgi pretēja. Slimniekiem ar KSS un TT genotipu CRP līmenis bija augstāks kā C alēles nēsātājiem (p=0,093 pēc MVA; sk. 22. diagrammu) un biežāk CRP bija >3 mg/l – 50,0% vs. 37,2% CT un 33,2% CC genotipam (p=0,054 pēc MVA; sk. 23. diagrammu). Personām bez KSS CRP līmeņa inversā korelācija ar T alēļu skaitu bija statistiski ticama (p=0,013), tomēr nebija statistiski nozīmīgu atšķirību starp genotipiem augsta CRP (>3 mg/l) ziņā, ko varētu izskaidrot ar nelielajām apakšgrupām (11. tabula). Šī atrade izskaidro, kādēļ kopējā grupā statistiski ticams rezultāts netika iegūts: abās klīniski angiogrāfiskajās apakšgrupās pretējās korelācijas savstarpēji izlīdzinājās.

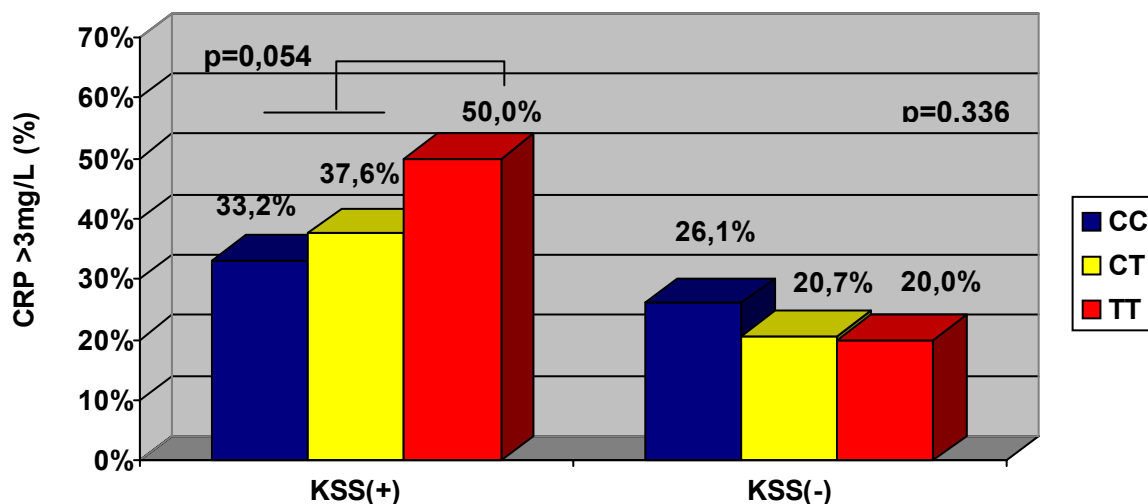
- (iv) Par vēl vienu potenciālu faktoru jāmin iespējamā haplotipu ietekme. Ir zināms, ka IL-1B (+3954) C/T polimorfisms ir nelīdzsvaroti saistīts ar IL-1B (-511) C/T un IL-1RN (VNTR) polimorfismu (*Santtila et al.*, 1998; *Hurme & Santtila*, 1998). Analizējot relatīvi nelielus paraugus, katra no attiecīgajām haplotipu alēlēm var uzrādīt saistību ar CRP. To daļēji balsta fakts, ka šai analīzē statistiski ticamāka sakarība parādās arī ar IL-1B (-511) C/T polimorfismu, kas balsta nepieciešamību analizēt šo trīs polimorfismu kooperatīvo ietekmi. Šā pētījuma ietvaros IL-1 gēnu klāstera haplotipi netika noteikti.

**22. diagramma. Log-CRP līmenis slimniekiem ar (n=513) un bez (n=80) KSS atkarā no IL-1B(+3954) genotipa (MVA)\***



\* Atbilstošās retransformētās CRP vērtības attiecīgi slimniekiem ar KSS: 1,71 mg/L, 1,70 mg/L un 2,26 mg/L. Slimniekiem bez KSS: 1,54 mg/L, 0,97 mg/L un 0,66 mg/L.

23. diagramma. Paaugstināts CRP līmenis >3 mg/L slimniekiem ar (n=513) un bez (n=80) KSS atkarā no IL-1B(+3954) genotipa (MVA)



11. tabula. IL-1B (+3954) genotipu sadalījums personām ar KSS un bez KSS.

Genotips	Slimnieki ar KSS	Personām bez KSS
CC	301 (58,7%)	46 (57,5%)
CT	178 (34,7%)	29 (36,2%)
TT	34 (6,6%)	5 (6,3%)

#### IL-1B (-511) C/T

Lai gan vidējais CRP līmenis starp genotipiem neatšķīrās, slimniekiem ar CC genotipu augsts CRP līmenis >3 mg/l bija vērojams biežāk (37,6% vs. 30,4%;  $p=0,064$  pēc MVA) un tas saglabājās statistiski ticams KSS apakšgrupā (41,1% vs. 31,6%;  $p=0,021$ ).

#### IL-1RN (VNTR)

Ne kopējā pētījuma grupā, ne klīniski angiogrāfiskās apakšgrupās statistiski ticama atšķirība starp genotipiem netika konstatēta.

## 9. Diskusija

Šā darba galvenais mērķis bija noskaidrot, vai IL ģenētiskie polimorfismi ir saistīti ar KSS stabilu vai nestabilu gaitu. Vienlaikus tika veiktas arī vairākas papildanalīzes.

Iegūtie rezultāti liecina, ka no visām analizētajām IL ģenētiskajām variācijām ar stabilu KSS sākotnējo gaitu pārliecinoši bija saistīts IL-6 promotora biežāk sastopamais Hap\*1 (AG8/12C) recesīvā veidā. Šā haplotipa homozigoti gandrīz divreiz biežāk tika konstatēti starp slimniekiem ar stabilu sākotnējo slimības gaitu (stenokardiju) bez MI pirmā gada laikā, salīdzinot ar slimniekiem, kam MI bija attīstījies agrīni jau pirmā gada laikā (attiecīgi 30% un 16%; OR=2,41; p=0,027). Būtiski, ka šī pati sakarība tika konstatēta arī papildanalīzē ar atšķirīgu pieeju, kurā atklājās, ka pirmā gada laikā Hap\*1 homozigotiem MI attīstījās retāk nekā pārējiem slimniekiem. Pēc mums pieejamās informācijas, starptautiski citējamā literatūrā pašreiz nav atrodami pētījumi, kuros būtu analizēta IL polimorfismu saistība ar KSS sākotnējo gaitu.

Darba rezultāti norāda, ka IL-6 Hap\*1 klātie saistīta ar zemāku aterosklerotiskās pangas destabilizācijas risku un attiecīgi retākiem akūtiem koronāriem notikumiem. Proti, Hap\*1 homozigotiem iekaisums aterosklerotiskā pangā retāk sasniedz kritisku iekaisuma aktivitāti, kas var izraisīt fibromuskulārās kapsulas izdīlšanu un pangas ruptūru. Tomēr, interpretējot šo atradi, nepieciešams iztirzāt arī pārējos mūsu analīžu rezultātus un literatūrā pieejamos eksperimentālo un klīnisko pētījumu datus. Divi galvenie šai darbā iegūtie papild dati ir atklātās Hap\*1 saistības ar biežāku vainagartēriju oklūziju un paaugstinātu CRP līmeni.

Kā jau sākumā tika minēts, darbs balstījās uz hipotēzi, ka IL polimorfismi var ietekmēt iekaisuma intensitāti un arī aterosklerotiskās pangas stabilitāti. Ja tā, tad būtu gaidāms, ka alēles vai haplotipi, kas pastiprinātu iekaisuma aktivitāti, veicinātu nestabilu KSS gaitu un agrāku MI attīstību. No šā viedokļa sākotnēji pretrunīga šķiet atrade, ka IL-6 pirmais haplotips bija saistīts arī ar augstāku CRP līmeni un tomēr sākotnēji stabilāku KSS gaitu. Šā haplotipa saistība ar CRP līmeni speciāli līdz šim ir minimāli pētīta. Ir tikai viens neliels darbs, kurā AG8/12C haplotipa nēsātājiem CRP līmenis bija nenozīmīgi zemāks akūta insulta grupā (n=34) un nozīmīgi zemāks kontrolgrupā (n=21) (*Acalovschi et al.*, 2003). No Hap\*1 raksturīgajām sastāvdaļām -174 C alēle citos pētījumos vai nu nav bijusi saistīta ar CRP pārmaiņām (*Burzotta et al.*, 2001; *Nauck et al.*, 2002; *Basso et al.*, 2002; *Eklund et al.*, 2003), vai arī bijusi saistīta ar paaugstinātu CRP līmeni (*Humphries et al.*, 2001; *Jenny et al.*, 2002; *Vickers et al.*, 2002), kas saskan ar šā darba novērojumiem.

Viens no ticamākajiem šās šķietami pretrunīgās atrades skaidrojumiem ir IL-6 gēna bazālās un aktivētās ekspresijas atšķirīgās pārmaiņas Hap\*1 gadījumā. Eksperimentālajā *in vitro* pētījumā ar ECV304 šūnām šis haplotips noteica augstāku bazālo IL-6 transkripciju, bet ne ar IL-1 stimulēto ekspresiju (*Terry et al.*, 2000). Savukārt citā pētījumā slimniekiem pēc insulta *in vivo* IL-6 līmenis bija zemāks nekā personām ar citiem haplotipu variantiem, turklāt *in vitro* ar adenoziņa analogu ierosinātā IL-6 transkripcija šā haplotipa klātienē arī bija reducēta (*Acalovschi et al.*, 2003). Arī citi pētījumi, kuros analizēts nevis viss haplotips, bet viens vai daži tam raksturīgie polimorfismi, norāda uz līdzīgu sakarību. Piemēram, AGC haplotipa (attiecīgi -596 A, -572 G un -174 C) klātienē LPS stimulētais IL-6 līmenis paaugstinājās mazāk nekā ar pārējiem diviem haplotipu variantiem (*Rivera-Chavez et al.*, 2003). Lai gan -174 G/C saistības ar bazālo un ierosināmo ekspresiju ir pretrunīga (sk. sadaļu literatūras aprakstā), ļoti svarīgs ir novērojums, ka -174 C alēlei piemīt vājāka afinitāte pret nukleāru proteīnu, ko producēja ar LPS stimulēti monocīti (*Rivera-Chavez et al.*, 2003).



Tāpēc, ekstrapolējot iepriekšminēto pētījumu rezultātus uz aterosklerozes modeli, var pieņemt, ka Hap\*1 labvēlīgāk ietekmē sākotnējo KSS gaitu (kas izpaužas kā stabila stenokardija), jo iekaisumu trigerējošo faktoru iespaidā, atšķirā no citiem haplotipiem tas nereaģē ar tik spilgtu IL-6 producēšanas un tai sekojošās iekaisumreakcijas amplifikāciju. Attiecīgi aterosklerotiskās pangas iekaisums retāk izraisītu ruptūru un akūtu vainagartērijas trombozi. No otras puses, ja Hap\*1 nosaka stiprāku bazālo IL-6 producēšanu, arī CRP bazālais līmenis būs augstāks, kas arī tika konstatēts šai darbā. Tāpat ar augstāku bazālo iekaisuma aktivitāti var skaidrot arī novērojumu, ka Hap\*1 nēsātājiem bija tendence uz angiogrāfiski biežāk apstiprinātu KSS, kas norāda, ka Hap\*1 varētu būt saistīts ar nedaudz paaugstinātu KSS attīstības risku, pat ja sākotnējā gaita ir labvēlīgāka.

Diskusijas vērtā ir arī novērotā Hap\*1 saistība ar biežāku vainagartēriju oklūziju angiogrammā, īpaši slimniekiem ar MI anamnēzi. Visticamākais skaidrojums ir pilnīgā saskaņā ar to pašu koncepciju: aterosklerotiskā panga Hap\*1 klātienē var ilgstošāk progresēt bez ruptūras, un brīdī, kad notiek artērijas trombozēšanās, lielāku oklūzijas daļu aizņem ateroma un relatīvi mazāku - trombs. Tāpēc spontānas vai medikamentozas fibrinolīzes efektivitāte ir mazāka un artērijas rekanalizācija notiek retāk nekā gadījumos, kad panga plīst agrīni un lielāko lūmena daļu aizņem trombs. Šo sakarību var salīdzināt ar novērojumiem, ka smēķētājiem fibrinolītiskā terapija un prognoze pēc MI ir relatīvi labāka nekā nesmēķētājiem, jo akūtās oklūzijas vietā proporcionāli lielāka ir tromba daļa (*Gottlieb et al.*, 1996).

Pētījuma dizaina dēļ izolēta MI un vainagartērijas oklūziju analīze var būt problemātiska. Pētot abu šo mainīgo savstarpējo saistību bija redzams, ka gandrīz 1/3 slimnieku bez MI anamnēzes tika konstatēta vainagartērijas oklūzija, savukārt slimniekiem ar pārciestu MI – oklūzija tika konstatēta tikai apmēram 1/2 gadījumos. Tāpēc oklūzija, lai arī slikts prognostisks raksturlielums, nevar tikt izmantota par akūta notikuma surogātmarķieri. Lai gan daļai slimnieku MI var attīstīties asimptomātiski, ne visas oklūzijas saistāmas ar akūtu notikumu, jo pakāpeniska augstas pakāpes stenozes progresēšana arī var izraisīt oklūziju bez miokarda nekrozes. Ievērojot iepriekš minēto, tika veikta papildanalīze, kurā ņemta vērā gan MI anamnēze, gan oklūzijas klātiene koronārā angiogrāfijā. Arī šai analīzei ir zināmi trūkumi, proti, slimniekiem pēc akūta MI spontāni vai terapijas gaitā notiek reperfūzija un ne visiem saglabājas hroniska pilnīga oklūzija. Tā kā vainīgās (*culprit*) artērijas oklūzija saistīta ar sliktāku ilglaika prognozi, jebkurā gadījumā konstatētā statistiski pārliecinošā Hap\*1 saistība ar biežāku oklūziju pēc MI ir klīniski potenciāli svarīga.

Darbā netika konstatēta Hap\*1 saistība ar retāku vai biežāku MI attīstību, kas norāda, ka MI kopējo risku tas neietekmē vai arī šāda ietekme ir krietni mazāka un to būtu iespējams konstatēt, tikai balstoties uz lielāku slimnieku skaitu. Viens no skaidrojumiem varētu būt tāds, ka Hap\*1 klātienē KSS attīstās ātrāk, bet, tā kā sākotnējā slimības gaita ir stabila un pirmais MI attīstās vēlāk, MI risks nav tik krasi atšķirīgs no pārējiem haplotipiem. Abās šā pētījuma analīzēs, kurās tika salīdzināts vecums, kad attīstījās pirmais MI un pirmās KSS izpausmes, Hap\*1 nēsātājiem bija statistiski nenozīmīga tendence uz KSS attīstību jaunākā vecumā, lai gan MV analīze to neapstiprināja.

#### *Hap\*1 komponentes*

No šā pētījuma nav iespējams izdarīt secinājumus, kura Hap\*1 veidojošā alēle (izņemot -572G) atbild par novērotajiem bioloģiskajiem efektiem, jo starp -596 A, -373 A8T12 un -174 C alēli pastāv stipri nelīdzsvarota saistība. No visām paraugā atrastajām šādām alēlēm gandrīz visas bija Hap\*1 sastāvā (attieciņi 99,1%, 99,9% un

98,4%). Nelielās atšķirības, kas, analizējot dažādos raksturlielumus (piemēram, KSS sākotnējo gaitu, CRP līmeni u.c.), parādījās starp šīm alēlēm, var būt pilnībā skaidrojamas ar nejausām atšķirībām kļūdas robežās. Nelielais pirmajā haplotipā neietilpstošo tam raksturīgo alēļu skaits neļauj izdarīt statistiski ticamus aprēķinus, lai precizētu šo alēļu individuālo nozīmi. Literatūrā ir dati, ka -174 C alēle, to analizējot izolēti no -596 A un A8T12 (proti, salīdzinot AG8/12C haplotipu ar AG8/12G haplotipu), bija saistīta ar stiprāku IL-1 stimulēto ekspresiju (*Terry et al.*, 2000). Tāpēc nav izslēgts, ka iepriekš minētā atrade, kurā C alēle bija saistīta ar vājāku afinitāti pret monocītu nukleāro proteīnu (*Rivera-Chavez et al.*, 2003), varētu būt skaidrojama ne tieši ar pašu -174 C alēli, bet ar kādu citu Hap\*1 sastāvdaļu. No otras puses, šo alēļu stiprā savstarpējā saistība šādu analīzi no klīniskā viedokļa padara par ne tik kritiski svarīgu. Ja Hap\*1 tiek izmantots par ģenētisku riska marķieri, tad, nosakot jebkuru no šīm alēlēm, ar aptuveni 99% varbūtību tā būs saistīta ar abām pārējām Hap\*1 raksturīgajām alēlēm, lai gan gaidāms, ka A8T12 specifitāte varētu būt augstāka. Rezumējot, Hap\*1 šā darba ietvaros ir interpretējams par vienotu veselu un nav iespējams interpretēt -596 A, -373 A8T12 un -174 C alēles atsevišķo ietekmi.

### Citi polimorfismi

Nevienam no pārējiem IL-6 haplotipiem, kā arī nevienai no analizēto pārējo IL polimorfismu alēlēm netika konstatēta saistība ar KSS sākotnējo *klīnisko gaitu*. Tomēr vairākām variācijām tika atrasta saistība ar citiem klīniskiem, angiogrāfiskiem vai laboratoriskiem raksturlielumiem.

#### *IL-6 Hap\*2 un IL-6 (-373) A9T11*

Šā haplotipa un tam raksturīgās A9T11 alēles homozigotiem bija vērojama vēlāka KSS pirmo simptomu attīstība un A9T11 nēsātājiem – tendence uz pirmā MI attīstību vēlākā vecumā. Kopumā šie rezultāti, lai gan ne pārliecinoši, norādīja uz iespējamu Hap\*2 un A9T11 vāju protektīvu efektu.

Lai gan tika novērota no statistikas viedokļa ticama *IL-6 Hap\*2* saistība ar zemāku *CRP līmeni*, ko galvenokārt varēja skaidrot ar A9T11 alēles (96,2% no visām A9T11 alēlēm bija Hap\*2 sastāvā) efektu, tomēr šī sakarība nebija pārliecinoša. Starp Hap\*2 skaitu un CRP līmeni nebija vērojama lineāra sakarība, jo Hap\*2 homozigotiem CRP līmenis bija augstāks nekā heterozigotiem un apmēram tikpat augsts kā tiem, kas nebija Hap\*2 nēsātāji. Šai atradei bija iespējami vairāki skaidrojumi:

1. Tā kā Hap\*1 un Hap\*2 ir biežākie haplotipu varianti, starp kuriem pastāv izteikta apgriezta korelācija (Spīrmena  $r=-0,358$ ;  $p<0,0001$ ), Hap\*2 klātienē varētu būt saistīta ar zemāku CRP, galvenokārt salīdzinājumā ar Hap\*1 homozigotiem (zūd Hap\*1 recesīvais efekts).
2. Slimniekiem, kam ir vismaz viens Hap\*2, iespējams, zemāku CRP līmeni nosaka to saistība ar citiem (ne Hap\*1) haplotipu variantiem (piemēram, 2/3, 2/4 u.c.).
3. Tā kā Hap\*2 homozigotu ir krietni mazāk ( $n=25$ ) nekā 1/1 un 1/2 grupā, paaugstināts CRP līmenis varētu būt gadījuma rakstura dēļ.

Tomēr papildanalīzes neapstiprināja pirmos divus skaidrojumus, tādēļ nevar izdarīt nepārprotamus secinājumus par Hap\*2 ietekmi uz iekaisuma aktivitāti.

Arī literatūras dati neliecina par šā haplotipa saistību ar vājāku bazālo iekaisuma aktivitāti, bet vairāk par spilgtāku ierosināmo ekspresiju. Nelielā pētījumā ar personām bez hroniska periodontīta ( $n=77$ ) A9T11 alēles nēsātājiem atklāts zemāks IL-6 līmenis (*Komatsu et al.*, 2005), savukārt šās alēles homozigotiem bija krietni augstāks IL-6 līmenis pēc CABG operācijas (*Kelberman et al.*, 2004a). Citā *in vitro*

pētījumā šis haplotips neatšķirās bazālās transkripcijas ziņā, bet bija saistīts ar pastiprinātu IL-1 ierosināto IL-6 ekspresiju (Terry *et al.*, 2000). Tāpat *in vitro* LPS ierosinātā IL-6 transkripcija bija spilgtāka G-G-G haplotipa (attiecīgi -596 G, -572 G un -174 G) gadījumā, lai gan tajā tikai daļa slimnieku atbilst 2. haplotipam (Rivera-Chavez *et al.*, 2003). Literatūrā nav datu par šā haplotipa saistību ar KSS klīniski angiogrāfiskiem kritērijiem.

#### *IL-6 Hap\*3 un IL-6 (-373) A10T11*

Starp Hap\*3 (GG10/11G) haplotipu un A10T11 alēli pastāvēja 100% abpusēja korelācija, un, tā kā Hap\*3 atšķirās no Hap\*2, \*4 un \*6 tikai ar AnTn alēli, visas atšķirības no šiem haplotipiem skaidrojamas tikai ar A10T11 efektu. Lai gan saistības ar klīnisko gaitu un CRP līmeni nebija, vairākās analīzēs tika iegūta norāde uz Hap\*3 iespējamām protektīvām īpašībām - retāk konstatēja angiogrāfiski apstiprinātu KSS, oklūzijas un MI kombināciju, kā arī bija tendence uz vēlāku KSS sākumu. Tomēr dažas no šīm sakarībām bija spēkā tikai homozigotiem, kuru bija nedaudz (n=16), tādēļ pastāv statistiskās alfa kļūdas risks, skaidrojot šos rezultātus. Eksperimentālo pētījumu dati literatūrā saskan ar šo novērojumu tādā aspektā, ka vienā pētījumā ierosināmā IL-6 ekspresija GG10/11G haplotipa gadījumā vieglāk pakļāvās deksametazona supresijai (Terry *et al.*, 2000) un citā pētījumā A10T11 konstatēja zemāku ekspresijas līmeni nekā A9T11 alēlei (Kelberman *et al.*, 2004a).

#### *IL-6 Hap\*4, IL-6 Hap\*5, IL-6 (-373) A10T10 un IL-6(-572) C*

Gan Hap\*4 (GG10/10G), gan Hap\*5 (GC10/10G) satur A10T10 alēli, un atšķirība starp abiem haplotipiem izpaužas tika -572 pozīcijā ar G (Hap\*4) vai C (Hap\*5) alēli. Savukārt visas -572 C alēles atradās Hap\*5 sastāvā. No šīm variācijām tikai Hap\*5 (-572 C) bija konstatējama saistība ar pirmā MI attīstību vēlākā vecumā, bet nevienā no citām analīzēm. Arī publicētajos haplotipu analīzes pētījumos nav pārliecinošas norādes uz to nozīmīgu ietekmi uz IL-6 transkripciju (Terry *et al.*, 2000; Acalovschi *et al.*, 2003; Rivera-Chavez *et al.*, 2003; Kelberman *et al.*, 2004a).

#### *IL-6 Hap\*6 un IL-6 (-373) A9T12*

Lai gan šā retā haplotipa nēsātājiem tika konstatēts krietni paaugstināts CRP līmenis, tomēr saistība ar klīniski angiogrāfiskiem kritērijiem netika atrasta. Tā kā šādu slimnieku bija ļoti maz (deviņi heterozigoti jeb 0,7% visu haplotipu) pastāv gan alfa, gan bēta kļūdas iespējamība, attiecīgi vedinot domāt par nejauši atklātu saistību ar augstu CRP līmeni vai arī neidentificētu nozīmīgu ietekmi uz KSS attīstību un slimības gaitu. Ņemot vērā šā haplotipa retumu, tā gaidāmā klīniskā nozīme, vismaz visas populācijas mērogā, ir niecīga. Vienīgi jāatzīmē, ka citējamā literatūrā līdz šim nav atrodami ziņojumi par šādas IL-6 (-373) alēles un attiecīgi arī haplotipa varianta esamību.

#### *IL-1B (+3954) C/T*

Lai gan sākumā tika konstatēta T alēles pārliecinoša saistība ar augstāku CRP līmeni (Latkovskis *et al.*, 2004a), vēlāki aprēķini ar lielāku slimnieku grupu apliecināja, ka šāda sakarība pastāv tikai slimniekiem ar KSS, savukārt personām bez KSS pastāv tendence uz zemāku CRP līmeni. Literatūrā līdz šim nav ziņots par šādu mijiedarbību, tomēr atrade ilustrē pētāmās kopas atlasē ietekmi uz rezultātiem, kas var skaidrot atšķirības starp dažādu autoru grupu ziņojumiem. Mijiedarbība starp polimorfismu un KSS un tās ietekme uz CRP nebija šā darba galvenais uzdevums. Tomēr var pieņemt, ka šis polimorfisms atšķirīgi modulē bazālo iekaisuma aktivitāti personām ar

aterosklerozi vai bez tās, kas savukārt varētu būt atkarīgs no diferencētas dažādu transkripcijas faktoru ietekmes.

Pētījumā netika atrasta sakarība starp šo polimorfismu un KSS klīnisko gaitu, tomēr bija dažas norādes par iespējamu T alēles asociāciju ar vēlāku KSS sākumu (homozigotiem) un pirmā MI attīstību agrākā vecumā (tikai MVA). Kopumā dati par šā polimorfisma ietekmi uz klīniskiem notikumiem nav pārliecinoši.

#### *IL-1B (-511) C/T*

Ar šo polimorfismu nevienā analizē neparādās statistiski pārliecinoša korelācija ne ar CRP līmeni, ne ar jekādu klīniski angiogrāfisko kritēriju.

#### *IL-1RN (VNTR)*

No visiem trim alēļu variantiem tikai retākajai trešajai alēlei tika konstatēta saistība ar vienu raksturlielumu – retāku MI anamnēzē. Tā kā šī alēle ir reta (28 heterozigoti jeb 2% visu alēļu), šai atradei visdrīzāk ir nejaušības raksturs. Arī pretējā gadījumā tās gaidāmā potenciālā klīniskā nozīme nav liela.

### ***Pētījuma novitāte un priekšrocības***

Salīdzinot ar publicētajām analizēm, šim darbam ir vairākas nozīmīgas priekšrocības.

1. Līdz šim ir tikai daži pētījumi, kuros būtu analizēta jebkāda faktora saistība ar KSS sākotnējo klīnisko gaitu. Tradicionāli pētījumos tiek salīdzinātas personas ar KSS vai bez tās, un nereti par kritēriju tiek izmantots MI, retāk arī angiogrāfiski konstatētais bojāto vainagartēriju skaits. KSS gaitas un/vai pirmās manifestācijas ignorēšana var būt viens no pētījumos atklāto pretrunu cēloņiem, jo šai aspektā slimnieki var būtiski atšķirties cits no cita. Vēl vairāk, pēc mūsu rīcībā esošās informācijas, līdz šim nav publicēts neviens pētījums, kurā būtu meklēta saikne starp ģenētiskajiem faktoriem un KSS gaitu.
2. Lai gan ir samērā daudz pētījumu, kuros aplūkota IL-6 gēna promotora atsevišķu polimorfismu ietekme uz IL-6 ekspresiju, iekaisuma aktivitāti un klīniskiem vai angiogrāfiskiem raksturlielumiem, ir tikai dažas publikācijas, kur analizēti pilni vai nepilni (tikai pēc trim SNP) IL-6 haplotipi (*Terry et al.*, 2000; *Acalovschi et al.*, 2003; *Rivera-Chavez et al.*, 2003; *Kelberman et al.*, 2004a), un literatūrā nav datu par KSS vai tās gaitas saistību ar IL-6 haplotipiem. Bez tam mūsu darbā ir vienlaikus analizētas gan IL-6, gan IL-1B un IL-1RN ģenētiskās variācijas.
3. Pētījumā tika iekļauts daudz lielāks cilvēku skaits (n=686) nekā minētajos IL-6 haplotipu analīzes pētījumos (no 49 līdz 182 personām) (*Terry et al.*, 2000; *Acalovschi et al.*, 2003; *Rivera-Chavez et al.*, 2003; *Kelberman et al.*, 2004a), kas krietni palielina statistisko spēku un rezultātu ticamību.
4. Visām 686 personām haplotipi tika noteikti tiešā veidā, sekvencējot attiecīgo promotora apvidu, nevis rekonstruēti ar datorprogrammas palīdzību, tātad informācija par haplotipiem bija ļoti kvalitatīva.
5. Ļoti būtisks ir novērojums, ka vienam un tam pašam haplotipam (Hap\*1) tika atklātas statistiski nozīmīgas saistības, analizējot dažādus kritērijus (sākotnējās klīniskās gaitas gadījumu-kontrolgrupu salīdzinājums; laiks līdz pirmajam MI; angiogrāfiski konstatēta oklūzija; CRP līmenis). Pētījumā par atskaites punktiem tika ņemti ne tikai klīniski anamnētiskie dati, bet arī objektīvā vainagartēriju bojājuma atrade. KSS diagnoze tika apstiprināta ar koronāro

angiogrāfiju, kas pašreiz klīniskā praksē un arī zinātniskos pētījumos ir visplašāk izmantotā KSS diagnozes apstiprināšanas metode. Tāpēc statistiskas nejaušības varbūtība ir praktiski izslēgta. Turklāt atrastās ģenētisko variāciju sakarības ar CRP līmeni bija īpaši pārliecinošas, kad tika salīdzināti tieši slimnieki ar paaugstinātu CRP līmeni (>3 mg/l) - tātad šī ietekme uz iekaisuma aktivitātes līmeni ir potenciāli klīniski svarīga.

6. Tika veiktas arī rūpīgas daudzmainīgo analīzes, modeļos ievadot virkni neģenētisko faktoru, lai pēc iespējas mazinātu asociāciju kļūdas un noskaidrotu ģenētisko faktoru ietekmi arī papildus tradicionāliem KSS riska faktoriem.
7. Pētījumam tika atlasīti tikai slimnieki, kam līdz šim nav veikta nekāda veida revaskularizācija, kas būtu varējusi ietekmēt slimības dabisko klīniskās manifestācijas gaitu.

### ***Pētījuma iespējamie trūkumi***

Viens no iespējamajiem trūkumiem ir datu par KSS sākotnējo gaitu retrospektīvais iegūšanas ceļš – tāpēc slimnieku sniegtā informācija par sākotnējo gaitu, it īpaši par pirmo stenokardijas simptomu manifestācijas laiku, var nebūt absolūti precīza. Slimnieku sniegto ziņu kļūdu mazināšanas nolūkā anketās speciāli tika atzīmēti, vai slimnieki ir noteikti pārliecināti par savu pirmo simptomu izpausmju hronoloģiju. Šī informācija tika ņemta vērā, analizējot slimības sākotnējo gaitu, jo no šiem aprēķiniem tika izslēgti to slimnieku dati, par kuru pirmajiem simptomiem informācija bija šaubīga vai nezināma. Jāpiebilst, ka vairumam slimnieku KSS anamnēze nebija ilga (50% ne vairāk kā viens gads un 82% ne vairāk kā pieci gadi), kas papildus liecina par anamnētisko datu ticamību.

Kā tas ir raksturīgi visiem retrospektīviem pētījumiem, arī šai gadījumā jāapzinās, ka notikusi zināma slimnieku selekcija, jo slimniekus pēc fatāla iznākuma nav iespējams iekļaut. Tāpat jāņem vērā, ka bez pangas evolūcijas pastāv arī citi faktori, kas var ietekmēt klīnisko manifestāciju, piemēram, sāpju sliekšnis un kolaterālās asinsrites veidošanās. Tomēr par KSS klīnisko ainu ir iespējams spriest tikai pēc anamnēzes, kas iegūta no slimniekiem, bet prospektīvs KSS gaitu novērojošs pētījums mūsu dienās būtu ļoti problemātisks tieši ētisku apsvērumu dēļ. Slimniekiem ar stabilu stenokardiju nebūtu pieļaujama ilgstoša novērošana, neveicot koronāro angiogrāfiju, kam ar lielu varbūtību sekotu revaskularizācija (PTCA vai CABG), kas var modificēt turpmāko slimības klīnisko gaitu.

Lai gan pētījuma rezultātiem mazsvarīga, tomēr veselo cilvēku kontrolgrupa, kas tika definēta kā personas, kam angiogrāfiski netika atrasta nozīmīga koronāro artēriju slimība, jāinterpretē ar lielu piesardzību. Pirmkārt, šie cilvēki ir samērā selektīva kopa, kam klīniski ir bijušas aizdomas par KSS un kas var atšķirties no vidusmēra veselām personām gan ģenētiski, gan fenotipiski. Piemēram, starp šiem slimniekiem ar lielāku varbūtību var būt mikrovaskulāras stenokardijas gadījumi, kuras etioloģija nav pilnībā skaidra. Otrkārt, ar angiogrāfiju nav iespējams pilnībā izslēgt koronāro aterosklerozi arī šiem slimniekiem. Precīzākā metode – intravaskulārā ultrasonoskopija – savukārt netiek izmantota klīniskā praksē par rutīnas izmeklējumu augsto izmaksu un, mazākā mērā, arī nedaudz paaugstināta komplikāciju riska dēļ. Mēģinot pēc iespējas padarīt tīrāku šo kontrolgrupu, no tās tika izslēgti slimnieki ar norādi uz aterosklerotiskām pangām bez nozīmīgi kompromitēta lūmena. Treškārt, šī grupa bija samērā neliela, kas paaugstina statistisku kļūdu varbūtību. Nobeigumā vēlreiz jāuzsver, ka darba galvenie rezultāti nebalstās uz šā grupas analīzes datiem.

### ***Darba un pētījuma rezultātu nozīme***

Darba rezultāti apliecina divus būtiskus KSS dabiskās gaitas ietekmējošus patoģenēzes faktoros – gan iekaisuma nozīmi, gan arī tā ģenētiskās regulācijas ietekmi. Būtiski, ka neviens tiem pašreiz netiek ņemts vērā klīniskā praksē, vērtējot slimnieku risku. Novērojumi, ka starp slimniekiem ar stabilu un nestabilu KSS gaitu pastāvēja atšķirības IL-6 ģenētisko variāciju ziņā, papildus uzsver iekaisuma un tā ģenētiskās regulācijas īpašo nozīmi. Šie novērojumi palīdz labāk izprast koronārās aterosmas destabilizācijas patoģenētiskos un biomolekulāros mehānismus, kas savukārt var kļūt par atbilstošas ārstnieciskas iejaukšanās mērķi. Lai gan multifaktoriālām slimībām jebkura atsevišķa inovatīva riska faktora potenciālā ietekme uz absolūto slimības risku ir relatīvi maza, mūsu pētījums apliecina, ka IL-6 promotora haplotipi pieder pie perspektīvām kardiovaskulārā riska ģenētiskā skrīninga sastāvdaļām. Katrā ziņā IL-6 ir svarīgs kandidātgēns, kura promotora haplotipu analīzes klīniskā lietderība ir jāpārbauda arī citos pētījumos dažādās grupās.

Ne mazsvarīgs ir fakts, ka šās darba (un Latvijas Genoma pilotprojekta) ietvaros pirmo reizi Latvijā izveidota no fenotipiskā viedokļa ļoti detalizēta liela KSS slimnieku kopa, kuras dati varēs tikt izmantoti gan šo, gan citu slimības ģenētisko faktoru izpētē. Katras kopas ģenētiskās izpētes nozīmi raksturo arī novērojums, ka IL-6 Hap\*1 sastopamība mūsu slimnieku kopā (49,3%) bija krietni biežāka nekā citās populācijās (33-43%; *Terry et al., 2000; Acalovschi et al., 2003; Kelberman et al., 2004a*). Arī Hap\*1 raksturīgā IL-6 (-174) C alēle šai pētījumā bija biežāka (50,1%) par G alēli, kas ir pretstatā vairumam citu datu (35%-41%) (*Brull et al., 2001; Basso et al., 2002; Kelberman et al., 2004*). Kā liecina IL-6 (-174) SNP analīzes aptuveni 100 etnisko latviešu paraugos, C alēles relatīvi augstā frekvence ir Latvijas iedzīvotāju īpatnība (mūsu nepublicētie dati).

Šai kontekstā izkristalizējas darba papildu aktualitāte, proti, nozīmīga sakarība tika atrasta *bieži sastopamam* haplotipam. No visiem pētāmās kopas personām 22,4% bija Hap\*1 homozigoti. Kā zināms, multifaktoriālo slimību ģenētiskos faktoros par klīniski svarīgiem var uzskatīt tikai gadījumos, ja tie ir bieži sastopami vai arī tiem piemīt liela ietekme uz fenotipu. Runājot par IL-6 Hap\*1 ietekmes spēku, arī tas bija nozīmīgs. Piemēram, daudzmainīgo analīzē IL-6 Hap\*1 homozigotiskās formas saistība ar stabilu sākotnējo gaitu (OR=2,41; p=0,027) bija *trešā spēcīgākā* no visiem modeļa faktoriem aiz arteriālās hipertensijas (OR=3,52; p=0,006) un sieviešu dzimuma (OR=2,47; p=0,44), atstājot aiz sevis tādus riska faktoros kā smēķēšana, holesterīna līmenis un cukura diabēts. Tāpat, salīdzinot Hap\*1 homozigotiskās formas relatīvo ietekmi uz kombinēto MI un vainagartērijas oklūzijas kritēriju (OR=1,57; p=0,023) ar neģenētiskajiem faktoriem, tā bija otra spilgtākā aiz smēķēšanas (OR=1,61; p=0,034), bet neviens no pārējiem riska faktoriem statistiski ticami ar šo kritēriju nekorelēja. Tāpēc ir atklāta sakarība ar ģenētisko faktoru, kas ir gan bieži izplatīts, gan ar nozīmīgu ietekmi uz klīnisko gaitu.

### ***Rezultātu iespējamais praktiskais lietojums***

*Pirmkārt*, iegūtie rezultāti apstiprina pieņēmumu, ka IL-6 ir svarīgs KSS patoģenēzē iesaistīts citokīns, un izvirza IL-6 gēnu par svarīgu kandidātgēnu koronārās aterosmas trombozes ģenētikas turpmākajā izpētē.

*Otrkārt*, tiek uzsvērtā nepieciešamība padziļināti analizēt šā gēna ekspresiju ietekmējošos faktoros. Ja tiktu noskaidroti gēna ekspresiju regulējošie mehānismi, kas savukārt var ietekmēt promotora haplotipu apvidus variācijas, tiktu iegūta teorētiskā bāze, lai varētu uz šiem faktoriem iedarboties ar farmakoloģiskiem līdzekļiem.

Jāuzsver, ka atklātā sakarība ar CRP līmeni var būt nozīmīgas ne tikai KSS, bet arī citu iekaisīgo slimību patoģenēzes izpētei.

*Treškārt*, jāanalizē IL-6 haplotipu izmantošana kā viens no ģenētiskiem kardiovaskulārā riska marķieriem gan primārās, gan sekundārās profilakses aspektā. Teorētiski IL-6 haplotipus, tāpat kā citas ģenētiskās variācijas, būtu iespējams izmantot par marķieriem papildus tradicionālajiem riska faktoriem, kad tiek vērtēts slimnieku risks un lemtas indikācijas savlaicīgas farmakoterapijas sākšanai. Zinot, ka dzīvībai bīstamas ir tieši KSS nestabilās izpausmes, marķieris, kas saistīts ar augstāku agrīnas nestabilas gaitas risku, mudinātu izvēlēties ātrāku farmakoterapijas sākšanu. Lietojumu šāds marķieris noteikti iegūtu arī sekundārā profilaksē, izvēloties preventīvās terapijas intensitāti.

Diemžēl līdzšinējie mēģinājumi atrast klīniski lietojamus ģenētiskos KSS marķierus pagaidām vēl nav snieguši gaidītos rezultātus, jo 1) to absolūtā ietekme uz kopējo risku parasti bijusi maza un/vai 2) nav bijuši veikti pietiekami lieli prospektīvi pētījumi, kas apstiprinātu izvirzīto marķieru nozīmi dažādās populācijās. Šai kontekstā arī attiecīgi jāvērtē pašreizējie dati. Tādēļ nevar neatzīmēt, ka, pēc mūsu darba aprēķiniem, Hap\*1 gaidāmā absolūtā ietekme uz klīnisko gaitu joprojām nav pietiekami liela, lai pašreiz to varētu ieteikt par rutīnu izmeklējumu kardiovaskulārā riska vērtēšanā. Loģistiskās regresijas analīzes modelis ar neģenētiskajiem faktoriem un Hap\*1 homozigotu statusu izskaidroja ne vairāk kā 20% sākotnējās klīniskās gaitas variāciju (pēc atšķirīgām metodēm rēķinot,  $R^2=0,125$  un  $R^2=0,198$ ), kas multifaktoriālas patoloģijas gadījumā ir samērā labs raksturlielums. Tā kā starptautiski citējamā literatūrā nav atrodamas līdzīgi dati, ļoti svarīgi ir atrasto saistību reproducēt arī citos, vēlams vēl plašākos pētījumos dažādās populācijās.

### ***Nākotnes plāni***

Izveidotā datubāze tiks izmantota turpmākas pētniecības nolūkā, turpinot analizēt gan IL, gan citu ģenētisko variāciju saistību un mijiedarbību ar riska faktoriem un farmakoterapiju. Tiek plānots noskaidrot arī to ietekmi uz klīniskiem notikumiem prospektīvā slimnieku novērojumā („follow-up”). No pirmām iestrādēm šais virziena minami pētījumi, kuros analizēta IL polimorfismu mijiedarbība ar tradicionālajiem riska faktoriem (*Latkovskis et al.*, 2004c) un farmakoterapiju (*Latkovskis et al.*, 2006), kā arī to saistība ar insulīnrezistenci (*Latkovskis et al.*, 2005b). Pašreizējā datubāzes informācija tiks izmantota arī dažādos sadarbības projektos ar citām zinātnieku grupām Latvijas Genoma pilotprojekta ietvaros.

## **10. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes**

1. IL-6 promotera rajona izplatītākais haplotips AG8/12C (Hap\*1) veicina stabilāku KSS sākotnējo klīnisko gaitu.
2. Ir konstatēta IL-1B (3954) C/T un IL-6 ģenētisko variāciju saistība ar vairākiem klīniskajiem KSS kritērijiem.
3. Pastāv asociācija starp IL-6 haplotipiem un angiogrāfiski diagnosticētām koronāro artēriju oklūzijām.
4. IL-1B un IL-6 ģenētiskās variācijas ietekmē iekaisuma marķiera hs-CRP līmeni.

## 11. Secinājumi

1. IL-6 promotera rajona haplotipi ietekmē KSS sākotnējo klīnisko gaitu. Izplatītākais haplotips Hap\*1 (AG8/12C) recesīvā veidā veicina stabilāku sākotnējo KSS gaitu un zemāku MI attīstīšanās risku pirmā slimības gada laikā.
2. IL-6 Hap\*1 piemīt neitrāla vai vāja veicinoša ietekme uz kopējo KSS attīstīšanās risku, neatkarīgi no sākotnējās klīniskās gaitas.
3. Ir iegūtas norādes par pārējo ģenētisko variāciju asociācijām ar citiem klīniskajiem KSS kritērijiem:
  - a. IL-6 Hap\*3 (GG10/11G) ar retāku angiogrāfiski konstatētu KSS (homozigotiem).
  - b. IL-6 Hap\*2 un IL-1B (+3954) T alēlei ar vēlāku KSS sākumu (homozigotiem).
  - c. IL-1B (+3954) T un IL-6 (-572) C alēlēm ar attiecīgi agrāku un vēlāku pirmā MI attīstīšanos.
4. IL-6 promotera rajona Hap\*1 homozigotiem biežāk saglabājas hroniskas oklūzijas pēc MI, ko varētu izskaidrot ar koronārās artērijas trombozes attīstīšanos uz augstākas pakāpes stenozes fona. Hap\*3 skaita korelācija ar oklūzijām savukārt ir apgriezti proporcionāla.
5. Interleikīnu polimorfismi ietekmē bazālo iekaisuma aktivitāti, par ko liecina to asociācija ar hsCRP līmeni:
  - a. Visspilgtākā saistība ir vērojama IL-6 promotera haplotipiem - biežākajam Hap\*1 ar paaugstinātu CRP līmeni kodominantā veidā un Hap\*6 (GG9/12G) ar ievērojami paaugstinātu CRP līmeni dominantā veidā.
  - b. Slimniekiem ar KSS IL-1B (+3954) T alēle recesīvā veidā ir saistīta ar augstāku, bet slimniekiem bez KSS – kodominantā veidā ar zemāku hsCRP līmeni.
6. Konstatētā Hap\*1 asociācija ar augstāku bazālo iekaisuma līmeni un stabilu sākotnējo klīnisko gaitu atbalsta hipotēzi par haplotipa ambivalentu ietekmi uz bazālo un inducēto iekaisuma aktivitāti.
7. Darba rezultāti parāda, ka iekaisuma reakciju regulējošā citokīna IL-6 gēna promotera rajona variācijas ietekmē iekaisuma aktivitāti, koronārās aterosklerozes evolūciju un KSS klīnisko gaitu.



## 12. Vēres

- Acalovschi, D., Wiest, T., Hartmann, M., Farahmi, M., Mansmann, U., Auffarth, G.U., Grau, A.J., Green, F.R., Grond-Ginsbach, C. & Schwaninger, M. (2003) Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke*, **34**, 8, 1864-9.
- De Backer, G., Ambrosioni, E., Borch-Johnsen, K., Brotons, C., Cifkova, R., Dallongeville, J., Ebrahim, S., Faergeman, O., Graham, I., Mancina, G., Cats, V.M., Orth-Gomer, K., Perk, J., Pyorala, K., Rodicio, J.L., Sans, S., Sansoy, V., Sechtem, U., Silber, S., Thomsen, T. & Wood, D.; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, **10**, 4, S1-S10.
- Basso, F., Lowe, G.D., Rumley, A., McMahon, A.D. & Humphries, S.E. (2002) Interleukin-6 -174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **22**, 4, 599-604.
- Bennet, A.M., Prince, J.A., Fei, G.Z., Lyrenas, L., Huang, Y., Wiman, B., Frostegard, J. & Faire, U. (2003) Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*, **171**, 2, 359-67.
- Brull, D.J., Montgomery, H.E., Sanders, J., Dhamrait, S., Luong, L., Rumley, A., Lowe, G.D. & Humphries, S.E. (2001) Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **21**, 9, 1458-63.
- Burzotta, F., Iacoviello, L., Di Castelnuovo, A., Gliuca, F., Luciani, N., Zamparelli, R., Schiavello, R., Donati, M.B., Maseri, A., Possati, G. & Andreotti, F. (2001) Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *American Journal of Cardiology*, **88**, 10, 1125-8.
- Chapman, C.M., Beilby, J.P., Humphries, S.E., Palmer, L.J., Thompson, P.L. & Hung, J. (2003) Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *European Heart Journal*, **24**, 16, 1494-9.
- Daly, L.E., Bourke, G.J. & McGilvray, J. (1991) *Interpretation and Uses of Medical Statistics*, 4th edition. Blackwell Science, Oxford.
- Eklund, C., Jahan, F., Pessi, T., Lehtimäki, T. & Hurme, M. (2003) Interleukin 1B gene polymorphism is associated with baseline C-reactive protein levels in healthy individuals. *European Cytokine Network*, **14**, 3, 168-71.
- Field, A. (2000) *Discovering Statistics Using SPSS for Windows*. SAGE Publications Ltd., London.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S. & Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1369-1376.
- Gibbons, R.J., Abrams, J., Chatterjee, K., Daley, J., Deedwania, P.C., Douglas, J.S., Ferguson, T.B. Jr, Fihn, S.D., Fraker, T.D. Jr, Gardin, J.M., O'Rourke, R.A., Pasternak, R.C., Williams, S.V., Gibbons, R.J., Alpert, J.S., Antman, E.M., Hiratzka, L.F., Fuster, V., Faxon, D.P., Gregoratos, G., Jacobs, A.K. & Smith, S.C. Jr. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina. (2003) ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Chronic Stable Angina—Summary Article: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina). *Circulation*, **107**, 149-158.
- Gottlieb, S., Boyko, V., Zahger, D., Balkin, J., Hod, H., Pelled, B., Stern, S. & Behar S. (1996) Smoking and prognosis after acute myocardial infarction in the thrombolytic era (Israeli Thrombolytic National Survey). *Journal of the American College of Cardiology*, **28**, 6, 1506-13.
- GraphPad Software. (2005). [Online]. Available from: <<http://www.graphpad.com/quickcalcs/chisquared1.cfm>> [July 2005]
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe, E. & Miller GJ. (2001) The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *European heart journal*, **22**, 24, 2219-20.
- Hurme, M. & Santtila S. (1998) IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *European Journal of immunology*, **28**, 8, 2598-602.

- Jones, K.G, Brull, D.J., Brown, L.C., Sian, M., Greenhalgh, R.M., Humphries, S.E. & Powell, J.T. (2001) Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, **103**, 18, 2260-5.
- Kelberman, D., Fife, M., Rockman, M.V., Brull, D.J., Woo, P. & Humphries, S.E. (2004a) Analysis of common IL-6 promoter SNP variants and the AnTn tract in humans and primates and effects on plasma IL-6 levels following coronary artery bypass graft surgery. *Biochimica et biophysica acta*, **1688**, 2, 160-7.
- Kelberman, D., Hawe, E., Luong LA, Mohamed-Ali, V., Lundman, P., Tornvall, P., Aillaud, M.F., Juhan-Vague, I., Yudkin JS, Margaglione, M., di Minno, G., Tremoli, E. & Humphries SE; HIFMECH study group. (2004b) Effect of Interleukin-6 promoter polymorphisms in survivors of myocardial infarction and matched controls in the North and South of Europe. The HIFMECH Study. *Thrombosis and haemostasis*, **92**, 5, 1122-8.
- Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*, **74**, 1-10.
- Komatsu, Y., Tai, H., Galicia, J.C., Shimada, Y., Endo, M., Akazawa, K., Yamazaki, K. & Yoshie H. (2005) Interleukin-6 (IL-6)--373 A9T11 allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue Antigens*, **65**, 1, 110-4.
- Latkovskis, G., Licis, N. & Kalnins U. (2004a) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European journal of immunogenetics*, **31**, 5, 207-13.
- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Berzina, L. & Kalnins, U. (2004b) Association of IL-1 beta (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 1, 85.
- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Kreicburga, L. & Kalnins, U. (2004c) Association of IL-1B (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age interacts with hypercholesterolemia and family history of myocardial infarction [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 17-18.
- Latkovskis, G., Licis, N., Juhneveica, D., Berzina, M., Zabunova, M., Erglis, A. & Kalnins, U. (2005a) Haplotypes of promoter region in interleukin-6 gene and levels of C-reactive protein and fibrinogen [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 137.
- Latkovskis, G., Tretjakovs, P., Licis, N., Jurka, D., Juhneveica, D., Berzina, M., Kreicburga, L., Zabunova, M. & Kalnins, U. (2005b) Interleukin-6 (-174) G/C polymorphism and insulin resistance in patients with coronary heart disease [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **6**, 1, 58.
- Latkovskis, G., Licis, N., Zabunova, M., Berzina, M. & Erglis, A. (2006) Haplotypes of interleukin-6 promoter correlate with cholesterol levels in patients treated with statins [abstract]. *Atherosclerosis Supplements* [in print].
- Margaglione, M., Bossone A., Cappucci, G., Colaizzo, D., Grandone, E. & Di Minno, G. (2001) The effect of the interleukin-6 c/g-174 polymorphism and circulating interleukin-6 on fibrinogen plasma levels. *Haematologica*, **86**, 2, 199-204.
- Nauck, M., Winkelmann, B.R., Hoffmann, M.M., Bohm, B.O., Wieland, H. & Marz, W. (2002) The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *Journal of molecular medicine*, **80**, 8, 507-13.
- Pallant, J. (2001) *SPSS Survival Manual: A Step by Step Guide to Data Analysis Using SPSS for Windows (Version 10)* p.304. Open University Press, Buckingham.
- Petrie A. & Sabin C. (2000) *Medical statistics at a glance*. Blackwell Science, Oxford.
- Ridker, P.M. (2001) High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, **103**, 13, 1813-8.
- Rivera-Chavez, F.A., Peters-Hybki, D.L., Barber, R.C. & O'Keefe, G.E. (2003) Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock*, **20**, 3, 218-23.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, **340**, 115-126.
- Sans, S., Kesteloot, H. & Kromhout D. (1997) The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *European Heart Journal*, **18**, 1231-1248
- Santtila, S., Savinainen, K. & Hurme, M. (1998) Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scandinavian journal of immunology*, **47**, 3, 195-8.
- Terry, C.F., Loukaci, V. & Green FR. (2000) Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 24, 18138-44.

- Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howard, V.J., Rumsfeld, J., Manolio, T., Zheng, Z.J., Flegal, K., O'Donnell, C., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., Goff, D.C. Jr, Hong, Y., Adams, R., Friday, G., Furie, K., Gorelick, P., Kissela, B., Marler, J., Meigs, J., Roger, V., Sidney, S., Sorlie, P., Steinberger, J., Wasserthiel-Smoller, S., Wilson, M. & Wolf, P.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. **113**, 6, e85-151.
- von der Thusen, J.H., Kuiper, J., van Berkel, T.J. & Biessen, E.A. (2003) Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacological reviews*, **55**, 133-166.

### 13. Publikāciju un ziņojumu saraksts par darba tēmu

#### *Starptautiski citējamās pilnas publikācijas*

- Latkovskis, G., Licis, N. & Kalnins, U.** (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European Journal of Immunogenetics*, **31**, 5, 207-213.

#### *Starptautiski citējamās žurnālos publicētie abstrakti*

- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Berzina, L. & Kalnins, U.** (2004) Association of IL-1 beta (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 1, 85.
- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Kreicburga, L. & Kalnins, U.** (2004) Association of IL-1B (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age interacts with hypercholesterolemia and family history of myocardial infarction [abstract]. (2004) *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 17-18.
- Erglis, A., Kalnins, U., Licis, N., Narbute, I., Jegere, S. & **Latkovskis, G.** (2004) Interleukin-1 receptor gene polymorphism and neointimal proliferation in patients who underwent PCI with reduced barotraumas [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 12.
- Latkovskis, G., & Kalnins, U.** (2004) Inflammation and atherosclerosis [abstract of the lecture]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 34-35.
- Latkovskis, G., Tretjakovs, P., Licis, N., Jurka, D., Juhnevica, D., Berzina, M., Kreicburga, L., Zabunova, M. & Kalnins, U.** (2005) Interleukin-6 (-174) G/C polymorphism and insulin resistance in patients with coronary heart disease [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **6**, 1, 58.
- Latkovskis, G., Licis, N., Juhnevica, D., Berzina, M., Zabunova, M., Erglis, A. & Kalnins, U.** (2005) Haplotypes of promoter region in interleukin-6 gene and levels of C-reactive protein and fibrinogen [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 137.
- Erglis, A., Licis, N., Narbute, I., Jegere, S. & **Latkovskis, G.** (2005) Interleukin-1 genes cluster polymorphisms and the degree of neointimal proliferation after percutaneous coronary intervention [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 153.
- Latkovskis, G., Licis, N., Zabunova, M., Berzina, M. & Erglis, A.** (2006) Haplotypes of interleukin-6 promoter correlate with cholesterol levels in patients treated with statins [abstract]. *Atherosclerosis Supplements* [in print].

### ***Latvijas un citos izdevumos publicēto vai konferencēs ziņoto referātu abstrakti***

- Latkovskis G.,** Līcis N., Kalnins U. Association of common polymorphisms of interleukin-1 genes with C-reactive protein levels in patients with coronary heart disease. 1<sup>st</sup> Baltic Cardiology Conference, Parnu, Estonia, September 18-19.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Kalnins U. C-reactive protein levels in relation to common polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-6 genes in patients with coronary heart disease. XIX Nordic Congress of Cardiology, Odense, Denmark. 04-06.06.2003.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Juhnēviča D., Berzina M., Kreicburga L., Zabunova M., Ērglis A., Kalnins U. Interleikīna-6 promotera haplotipu saistība ar C-reaktīvā proteīna un fibrinogēna līmeni. Latvijas Universitātes 63. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 11.02.2005.
- Latkovskis G.,** Tretjakovs P., Līcis N., Jurka D., Juhnēviča D., Berzina M., Kreicburga L., Zabunova M., Kalnins U. Interleikīna-6 (-174) G/C polimorfisms un insulīna rezistence adipoziem slimniekiem ar koronāro sirds slimību. Latvijas Universitātes 63. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 11.02.2005.
- Latkovskis, G.,** Līcis, N., Zabunova, M., Berzina, M., Juhneviča D. & Erglis, A. (2006) Association of interleukin-6 promoter haplotype with coronary artery occlusions [submitted abstract]. Transcatheter Cardiovascular Therapeutics, Washington, USA, October 22-27, 2006.

### ***Latvijas konferencēs ziņotie referāti***

- Latkovskis G.,** Kalnins U., Līcis N. C-reaktīvā proteīna līmeņa saistība ar IL-1B un IL-1RA ģenētisko polimorfismu 160 slimniekiem ar koronāro sirds slimību. Latvijas Universitātes 61. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 07.02.2003.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Mača A., Kamzola G., Berzina M., Kalnins U. Ģenētisko un fenotipisko faktoru saistība ar miokarda infarkta attīstīšanos jaunākā vecumā. Latvijas Universitātes 62. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 06.02.2004.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhneviča D., Ērglis A. Interleikīna-6 promotera polimorfisma saistība ar koronāro artēriju oklūziju. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhneviča D., Ērglis A. Interleikīna-6 promotera polimorfismi un koronārās sirds slimības gaita. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.
- Latkovskis G.,** Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhneviča D., Ērglis A. Statīnu interakcija ar interleikīna-6 promotera rajona polimorfismiem: ietekme uz lipīdu līmeni. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.

**Summary of Thesis**  
**in English**

## Content

1. Introduction	56
2. Actuality and novelty of the research	56
3. Aims	57
4. Objectives	57
5. Structure and extent of the work	57
6. Approval of the work	57
7. Materials and methods	57
Design and selection criteria for the total sample	58
Phenotype data	58
Inclusion and exclusion criteria for analyzed patient subgroups	58
Biomolecular analyses	59
Statistical methods	60
8. Results	61
8.1. Phenotype and genetic characterization of the study sample	61
8.2. Association of interleukin genetic variations with clinical and angiographic CHD criteria	63
Patients with stable and unstable initial course of CHD	63
Time from the first symptoms of CHD to the first MI	70
Coronary artery occlusion	70
Patients with MI and coronary artery occlusion	71
Patients with and without CHD	72
Age of onset of CHD	72
Age of onset of the first MI	74
History of MI	75
8.3. Interleukin genetic variations and CRP level	76
Pilot study	76
Extended analysis	78
9. Discussion	83
10. Thesis to defend	86
11. Conclusions	86
12. Literature	87
13. Publications on the subject of the thesis	89

## Abbreviations

ACEI	- Angiotensin converting enzyme inhibitor(s)
ACS	- Acute coronary syndrome
ANOVA	- Analysis of variance
BB	- Beta blocker(s)
CI	- Confidence interval
CRP	- C-reactive proetin
DM	- Diabetes mellitus
DNA	- Deoxiribonucleic acid
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic
FG	- Fibrinogen
HDL-C	- High density lipoprotein cholesterol
HZ	- Homozygot(s)
IL	- Interleukin
IL-1B	- Interleukin-1 $\beta$ gene
IL-1 $\beta$	- Interleukin-1 $\beta$
IL-1Ra	- Interleukin-1 receptor antagonist
IL-1RN	- Interleukin-1 receptor antagonist gene
IL-6	- Interleukin-6
IVUS	- Intravascular ultrasonoscopy
CABG	- Coronary artery bypass grafting
CHD	- Coronary heart disease
LD	- Linkage disequilibrium
LDL-C	- Low density lipoprotein cholesterol
MI	- Myocardial infarction
mRNA	- Matrix ribonucleic acid
MV	- Multivariate
MVA	- Multivariate analysis
NS	- [Statistically] non-significant
NSTE	- Non-ST elevation [ACS]
UA	- Unstable angina
OR	- Odds ratio
PCR	- Polimerase chain reaction
PTCA	- Percutaneous transluminal coronary angioplasty
RF	- Risk factor
SA	- Stable angina
SD	- Standard deviation
SE	- Standard error
SNP	- Single nucleotide polymorphism
TC	- Total cholesterol
TG	- Triglycerides
UV	- Univariate
UVA	- Univariate analysis
VNTR	- Variable number tandem repeat
vs.	- Versus ( <i>Latin</i> - compared with)

## 1. Introduction

Atherosclerosis is the most common cardiovascular disease, and its location in coronary arteries (leading to coronary heart disease, CHD), is particularly dangerous because of high risk of cardiac death. Cardiovascular mortality in Latvia is among highest in Europe (*Sans et al.*, 1997) and has become both medical and economic problem.

The underlying pathology of coronary atherosclerosis is chronic subintimal inflammation accompanied by deposition of cholesterol and formation of atherosclerotic plaque. Depending on evolution of plaque, CHD manifestation may be entirely different. Gradual progression to critical coronary artery stenosis leads to myocardial ischemia under circumstances of increased oxygen demand such as exertion or emotional stress, and clinical manifestation will be *stable effort angina*. Alternatively, fibromuscular cap of the plaque may rupture early and exposure of lipid core to blood initiates thrombus formation and development of *acute coronary syndrome* (ACS): total coronary artery occlusion leads to *myocardial infarction* (MI) while transient or subtotal occlusion will manifest as *unstable angina*. In contrast to stable angina, mortality in case of MI is very high (around 30% at one year compared with 2% in stable angina patients) (*Gibbons et al.*, 2003; *Thom et al.*, 2006). Prevention and treatment of MI therefore is one of the top-priorities in contemporary cardiology.

Inflammatory reaction within atherosclerotic plaque is a key process leading to plaque rupture and unstable course of CHD (*Ross*, 1999). Interleukins (IL) are cytokines that maintain and/or regulate inflammation. IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-6 are involved in pathogenesis of atherosclerosis (*von der Thusen et al.*, 2003). Considering that predisposition to CHD is frequently genetically determined and inflammation plays a major role in development of MI, we tested hypothesis that IL genetic variations may affect clinical course of CHD.

## 2. Actuality and novelty of the research

Currently it is not clearly known, why initial clinical course of CHD may vary considerably among patients. The first manifestation can range from stable angina lasting for several years (with relatively benign prognosis) in some individuals to MI without any preceding symptoms and high mortality rates in others. Identification of factors and mechanisms responsible for development of stable or unstable course would have several practical implications. First of all, new treatment and prevention strategies could be developed for ACS. Secondly, risk factors for unstable initial course could be incorporated in risk stratification models in order to identify high-risk individuals both in primary and secondary prevention. The potential relevance of such novel markers is underlined by the fact that conventional risk factors weakly correlate with initial clinical course of CHD.

In previous studies reported in indexed literature individual polymorphisms typically were analyzed in relation to presence or absence of CHD or MI, with no information on initial presentation and clinical course of CHD. Failure to take into account also initial clinical course may potentially lead to biased findings. *The main novelty* of the work therefore is *comparison of genetic variations between patient subgroups having completely different initial manifestation*.

*Secondly*, in this study not only individual polymorphisms, but also IL-6 promoter haplotypes were analyzed, which so far have been described in smaller samples of patients or healthy controls and, to best of our knowledge, never reported in association with clinical course of CHD.



### **3. Aims**

To determine whether IL genetic variations affect initial clinical course of CHD.

### **4. Objectives**

5. To compare prevalence of genetic variations of IL-1 $\beta$ , IL-1Ra and IL-6 in patients with stable and unstable initial course of CHD.
6. To search for potential associations with other clinical criteria such as risk of MI and age when first symptoms of CHD or MI developed.
7. To analyze correlation of IL genetic variations with angiographic evidence for CHD – atherosclerotic coronary artery disease and total coronary artery occlusion.
8. To clarify effect of IL genetic variations on inflammatory activity by analyzing their association with levels of highly sensitive inflammatory marker C-reactive protein (CRP).

### **5. Structure and extent of the work**

Theses are written in Latvian, total volume is 138 pages. It consists of the following 10 chapters: introduction, literature review, aims, objectives, materials and methods, results, discussion, thesis to defend, conclusions and list of cited literature. There are 29 subchapters, 24 tables, 27 charts and 3 figures as well as 145 citations.

### **6. Approval of the work**

The results are published in one internationally index journal and reported in 18 abstracts in international and local scientific conferences. Eight abstracts are published in supplements of internationally indexed journals and five abstracts are published in other publications.

Findings of this work were nominated by Latvian Academy of Sciences as one of the ten most important scientific achievements in Latvia in 2005

### **7. Materials and methods**

The work was accomplished in the Latvian Centre of Cardiology at Paula Stradina Clinical University Hospital in collaboration with the Latvian Biomedical Research and Study Centre (Dr. Biol. Normunds Līcis). In total 970 patients were included in the database from year 2000 to 2004, and in 686 patients the following genetic variations were analyzed: IL-1B (+3954) C/T, IL-1B (-511) C/T, IL-1RN (VNTR), IL-6 (-596) G/A, IL-6 (-572) G/C, IL-6 (-373) AnTn and IL-6 (-174) G/C polymorphisms as well as IL-6 haplotypes. The results of this work are based only on analyses of these 686 patients and their subgroups.

### **Design and selection criteria for the total sample**

We selected patients among those who were referred to the Latvian Centre of Cardiology for scheduled coronary angiography. The study design was cross-sectional which allowed also for retrospective case-control analysis. The study was approved by Ethics committee. Inclusion criteria were as follows: (i) age  $\leq 70$  years, (ii) clinical symptoms typical for CHD, (iii) coronary angiography scheduled and performed during hospitalization, and (iv) written informed consent by patient. Exclusion criteria: (i) previous coronary revascularization (PTCA and/or CABG) and/or (ii) patient's refusal to participate in the study.

### **Phenotype data**

For all patients detailed information was gathered and it included conventional risk factors (age, gender, smoking status, diabetes, arterial hypertension, lipid levels, family history), data on the initial course of CHD, type of the first manifestation, time from the first symptoms to first MI, history and number of previous myocardial infarctions, age when first MI or first CHD symptoms developed, time of the last MI or unstable angina. When initial clinical course was evaluated, any uncertain data were marked and excluded from analyses. Pre-hospital and in-hospital treatment was recorded as well. Other measurements included height, weight, body mass index, serum lipids and glucose, plasma CRP, fibrinogen and full blood count.

Blood samples for CRP and DNA analysis were collected in EDTA containing tubes by standard venipuncture on the day of angiography. Plasma was separated within 60 minutes after collection and immediately stored frozen at  $-20^{\circ}$  C until analyzed. C-reactive protein was measured within 14 days in thawed EDTA-plasma using validated *N High Sensitivity CRP* assay based on immunonephelometry (Dade Behring, Marburg, Germany) and Behring Nephelometer BNA/BN 100. The overall measuring range of the assay was 0.20-220 mg/L and inter-assay coefficient of variation was 5.2%.

### **Inclusion and exclusion criteria for analyzed patient subgroups**

Different selection criteria as defined below were applied for patients' subgroup analyses depending on objective in each particular case:

#### Clinical and angiographic criteria.

- Stable and unstable initial course of CHD (only patients with definitely clear history):
  - *Stable group* – patients with stable angina without MI for at least one year, with significant stenosis ( $>75\%$ ) and no occlusion in a coronary artery;
  - *Unstable group* – patients, in whom MI developed within first year after the first manifestations of CHD or MI was the first manifestation of CHD, and at least 50% stenosis present in a coronary artery;
  - *Healthy control group* – patients with no angiographic evidence of atherosclerotic coronary artery disease and no history of previous or suspected MI.
- Time from the first symptoms of CHD to first MI:
  - Coronary artery stenosis  $>50\%$ ;
  - Clearly known initial course of CHD – time from the first symptoms (angina) to first MI ( $<1$  day,  $<1$  week,  $<1$  month,  $<1$  year or  $\geq 1$  year) or no MI.
- Coronary artery occlusion

- All patients;
- Subgroup analysis according to positive or negative history of MI.
- Patients with and without CHD
  - CHD group defined as those with coronary artery stenosis >50% in at least one coronary artery;
  - Healthy controls – patients with no evidence of coronary atherosclerosis;
  - Patients with plaques or stenoses <50% were excluded.
- Age when first CHD manifestation occurred:
  - Patients with coronary artery stenosis >50%;
  - Clearly known age, when first CHD symptoms developed;
  - Total history of CHD <20 years.
- Age when first MI developed:
  - Patients with coronary artery stenosis >50%;
  - Definite history of MI and clearly known age, when first MI developed.
- Patients with MI:
  - All patients;
  - MI criteria:
    - Angiographic stenosis >50%;
    - Definite previous MI.

#### Inflammatory markers

- Initial pilot analysis:
  - Patients with CHD confirmed by angiography (stenosis >50%);
  - Exclusion criteria:
    - CRP levels >15 mg/L (n=6), as high levels may indicate latent chronic inflammatory condition (Ridker, 2001);
    - Recent MI or unstable angina (within previous 3 weeks; n=16);
    - Known chronic inflammatory condition (one patient with Hodgkin's disease).
- Extended analysis:
  - Out of all patients with known CRP levels (n=671), 624 patients were selected.
  - Exclusion criteria for 47 patients:
    - Recent MI within previous 3 weeks (n=33);
    - Active inflammatory disorder (n=4);
    - Outlying CRP values (outlier defined as >3SD or 26.4 mg/L; n=10).

#### **Biomolecular analyses**

Genomic DNA was obtained from blood samples and genotyping was performed at the Latvian Biomedical Research and Study Centre (Dr. Biol. Normunds Līcis). Personal conducting DNA analysis was blinded to phenotype data. DNA was genotyped by PCR-based methods, and negative controls (reaction mixture with no DNA) were included in all reactions. PCR results were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide. Products were purified with DNA extraction kit (Fermentas, Lithuania) in all cases except for IL-1RN VNTR polymorphism, which was determined directly based on length of PCR products. IL-1RN (VNTR) alleles were coded in accordance with existing nomenclature: allele 1 (\*1) = 4 repeats (410 bp PCR product), allele 2 (\*2) = 2 repeats (240 bp), allele 3 = 5 repeats (500 bp); allele 4 = 3 repeats (325 bp). Other IL-1 cluster polymorphisms were

determined through digestion with specific restriction endonucleases followed by end-product electrophoresis in 2% agarose. Genetic variations of IL-6 were screened with sequencing.

#### *IL-6 haplotyping methodology*

(i) Initially, to obtain experimentally justified information on the allelic associations of IL-6 promoter polymorphisms in Latvia, we directly determined haplotypes among more than 100 individuals. This pilot step was accomplished as follows. First, sequences of the genomic PCR products were determined. Then, for heterozygotes, these PCR products were cloned and individual clones were sequenced to resolve haplotype composition of each ambiguous sample. Alternatively, individual haplotypes were determined using allele-specific PCR followed by sequencing. (ii) Haplotypes in population of the present study were mostly deduced from sequence of the genomic PCR products. If, however, a DNA sequence could not be interpreted basing on the data of the initial screening, either cloning or allele-specific PCR approach to determine individual haplotypes was undertaken. (iii) Finally, after collecting all haplotype data, their accuracy was checked for 45 randomly chosen individuals through allele specific PCR and sequencing.

#### **Statistical methods**

All statistical calculations (*Daly, Bourke & McGilvray, 1991; Field, 2000; Petrie & Sabin, 2000; Pallant, 2001*) were performed with SPSS software (version 12.0), with exception of  $\chi^2$  goodness-of-fit test for two polymorphisms when on-line calculator was used (GraphPad Software, 2005). Two-sided p value <0.05 was regarded as statistically significant result. CRP values were transformed with logarithm in order to normalize the distribution (log-CRP).

*Univariate analyses (UA)* for continuous variables were performed with Student's t-test (for two groups) or ANOVA (for >2 groups). Statistical significance was adjusted with Bonferroni or Tukey methods when multiple comparisons in post-hoc analyses were done. Associations between two continuous variables as well as between genetic subgroups and a continuous variable were tested with linear regression analysis. Categorical variables were compared with Pearson  $\chi^2$  test or Fisher exact test as appropriate. When gene dose effect was analyzed, Spearman correlation and r coefficient was calculated. Dominant and recessive models were analyzed with Pearson  $\chi^2$  test (with Yates continuity correction for 2x2 tables) or Fisher exact test, and odds ratio (OR) was calculated.

*In multivariate analyses (MVA)* adjustment for non-genetic covariates was performed with multiple linear regression analysis and ANCOVA method for continuous dependent variables. Categorical variables were adjusted with logistic regression analysis in which  $\text{Exp}(\beta)$  value characterized adjusted OR of genetic factor. Models were tested with backward selection approach in order to identify significant covariates. When covariates were already known from the literature, forced entry approach was used. Adjusted mean values of continuous variables were obtained with ANCOVA method (General Linear Model option in SPSS).

Correspondence of genotype distribution to *Hardy-Weinberg equilibrium* was tested with Chi-Square Goodness of Fit test. Since some rare genotypes of polymorphisms with more than 2 alleles (IL-1RN (VNTR) and IL-6 (-373) AnTn) were not present in the sample, SPSS software was not suitable for these variations, and an online-calculator was used instead (GraphPad Software, 2005).

## 8. Results

### 8.1. Phenotype and genetic characterization of the study sample

Summary of the phenotype data and treatment is given in Table 1. It should be noted that definite CHD (defined as coronary stenosis >50%), which was used as a selection criterion for several subanalyses, was present in 83.2% (n=571) of patients.

**Table 1. Non-genetic characteristics of the study population (n=686).**

---

<b>Risk factors</b>	
Age (mean, SD)	55.8±8.2
Men (n, %)	519 (75.7%)
TC, mmol/L (mean, SD)	5.5±1.3
<5.0 mmol/L (n, %)	228 (33.2%)
5.0-7.0 mmol/L (n, %)	376 (54.8%)
>7.0 mmol/L (n, %)	82 (12.0%)
HDL-C, mmol/L (mean, SD)	1.4±0.7
TG, mmol/L (mean, SD)	2.2±1.5
LDL-C, mmol/L (mean, SD)	3.2±1.1
Hypertension (n, %)	431 (62.8%)
Diabetes (n, %)	66 (9.6%)
BMI, kg x m <sup>-2</sup> (mean, SD)	28.4±4.3
Obesity (BMI >30 kg x m <sup>-2</sup> ) (n, %)	208 (30.3%)
Smoking status	
Active (n, %)	203 (29.6%)
Ex-smoker (n, %)	242 (35.3%)
Non-smoker (n, %)	241 (35.1%)
Premature MI in family (n, %)	134 (19.5%)
<b>Inflammatory markers</b>	
CRP, mg/L (median, SE)	1.8 (0.3)
CRP >3 mg/L (n, %)	65 (9.5%)
FG, g/L (mean, SD)	3.3±1.0
<b>Characterization of CHD</b>	
Confirmed on angiography (n, %)	571 (83.2%)
Mean duration of CHD (years)	
<1 year (n, %)	287 (50.3%)
1-5 years (n, %)	179 (31.3%)
6-10 years (n, %)	64 (11.2%)
>10 years (n, %)	41 (7.2%)
History of MI	421 (61.4%)
<b>Pre-hospital therapy</b>	
Aspirin (n, %)	600 (87.5%)
Clopidogrel (n, %)	53 (7.7%)
Statins (n, %)	286 (41.7%)
ACEI (n, %)	387 (56.4%)
BB (n, %)	541 (78.9%)
Calcium channel blockers (n, %)	186 (27.1%)
Nitrates (n, %)	438 (63.9%)

---

**Table 2. Characterization of genetic variations of the patient sample.**

Polymorphism	Allele	Frequency (n)	Genotype	Frequency (n)	P value*
IL-1B (-511)	C	0.673 (923)	CC	0.448 (307)	0.830
	T	0.327 (449)	CT	0.450 (309)	
			TT	0.102 (70)	
IL-1B (+3954)	C	0.758 (1040)	CC	0.583 (400)	0.501
	T	0.242 (332)	CT	0.350 (240)	
			TT	0.067 (46)	
IL-1RN (VNTR)	1	0.691 (948)	11	0.474 (325)	0.527
	2	0.288 (395)	12	0.413 (283)	
	3	0.020 (28)	13	0.020 (14)	
	4	0.001 (1)	14	0.002 (1)	
			22	0.071 (49)	
			23	0.020 (14)	
IL-6 (-596)	G	0.502 (689)	GG	0.233 (160)	0.139
	A	0.498 (683)	AG	0.538 (369)	
			AA	0.229 (157)	
IL-6 (-373)	8/12	0.494 (678)	11	0.226 (155)	0.605
	9/11	0.209 (287)	12	0.212 (145)	
	10/11	0.152 (209)	13	0.152 (104)	
	10/10	0.138 (189)	14	0.163 (112)	
	9/12	0.007 (9)	15	0.010 (7)	
			22	0.045 (31)	
			23	0.071 (49)	
			24	0.044 (30)	
			25	0.002 (1)	
			33	0.023 (16)	
			34	0.035 (24)	
			44	0.016 (11)	
			45	0.001 (1)	
IL-6 (-572)	G	0.939 (1288)	GG	0.882 (605)	0.983
	C	0.061 (84)	GC	0.114 (78)	
			CC	0.004 (3)	
IL-6 (-174)	G	0.499 (684)	GG	0.230 (158)	0.162
	C	0.501 (688)	GC	0.537 (368)	
			CC	0.233 (160)	

\* Compared to expected distribution predicted by Hardy-Weinberg equilibrium.

All analyzed polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2). In contrast to majority of other populations, in which IL-6 (-174) G allele was wild-type allele, (*Humphries et al.*, 2001; *Jones et al.*, 2001; *Margaglione et al.*, 2001; *Vickers et al.*, 2002; *Bennet et al.*, 2003; *Chapman et al.*, 2003 and others), in our sample IL-6 (-174) C allele was more common (50.1%). When IL-6 gene promoter region was sequenced, nine haplotypes were identified (Table 3), and five of these were common (>1%), while the other four haplotypes were found only in 21 patients. Overall haplotype prevalence was similar to that reported in literature (*Terry et al.*, 2000; *Acalovshi et al.*, 2003; *Kelberman et al.*, 2004a). The most common haplotype containing IL-6 (-174) C allele, however, was more frequent in our sample. In addition, we found new haplotype (Hap\*6, Table 3) previously not reported in literature, which was the most common among rare haplotypes.

**Table 3. IL-6 promoter region haplotypes found in the study population.**

No	Haplotype*	Frequency (n)	Haplotype combinations	Frequency (n)
1	AG8/12C	0.493 (677)	11	0.224 (154)
2	GG9/11G	0.201 (276)	12	0.203 (139)
3	GG10/11G	0.152 (209)	13	0.152 (104)
4	GG10/10G	0.077 (105)	14	0.089 (61)
5	GC10/10G	0.061 (84)	15	0.074 (51)
6	GG9/12G	0.007 (9)	16	0.010 (7)
7	GG9/11C	0.004 (6)	17	0.006 (4)
8	AG9/11C	0.004 (5)	18	0.003 (2)
9	AG8/12G	0.001 (1)	19	0.001 (1)
			22	0.041 (28)
			23	0.069 (47)
			24	0.031 (21)
			25	0.013 (9)
			26	0.001 (1)
			27	0.001 (1)
			28	0.003 (2)
			33	0.023 (16)
			34	0.013 (9)
			35	0.022 (15)
			37	0.001 (1)
			38	0.001 (1)
			44	0.007 (5)
			45	0.004 (3)
			46	0.001 (1)
			55	0.004 (3)

\* Sequence of polymorphisms: (-596) G/A, (-572) G/C, (-373) AnTn, (-174) G/C

## 8.2. Association of interleukin genetic variations with clinical and angiographic CHD criteria

### *Patients with stable and unstable initial course of CHD*

Among all patients meeting criteria for this analysis (n=334; 48.7% of the total sample) 50 patients (15.0%) had stable initial course of CHD and 201 (60.2%) patients had unstable initial clinical course, while 83 (24.9%) patients had no evidence of CHD (Table 4). In MVA only three non-genetic variables were associated with stable initial course of CHD: hypertension, female gender and TC (Table 5).

### *Comparison of genetic variations between patient subgroups*

No significant genetic differences from control group were observed for either CHD groups. When stable angina group was compared with unstable group (Table 6), significantly different prevalence of Hap\*1 homozygotes was found (Chart 1). Among patients with unstable initial course of CHD, Hap\*1 homozygotes were almost twice less frequently found compared with stable angina group (16.4% and 30.0%, respectively; OR=0.458; p=0.029; Yates corrected p=0.047). In MV analysis different proportions of Hap\*1 homozygotes in the two clinical groups remained statistically significant after adjustment for non-genetic factors (Exp( $\beta$ )= 0.41 for unstable course or 2.41 for stable course; p=0.027; Table 6).

**Table 4. Comparison of non-genetic factors and drug therapy in the three clinically-angiographic patient groups.**

	Controls without CHD (n=83)	Stable angina group (n=50)	Unstable Group (n=201)	P value (among all groups)
Age (mean±SD)	55.3±9.1	58.3±6.9	55.0±8.7*	0.052
Duration of CHD (years, mean±SD)	-	4.2±3.2	2.6±5.4*	0.131
Age, when first CHD symptoms developed (years, mean±SD)	-	54.2±7.5	52.2±9.1	0.142
Number of RF <sup>‡</sup> (mean±SD)	2.3±1.2	2.7±1.1	2.8±1.2 <sup>†</sup>	0.016
TC (mmol/L, mean±SD)	5.4±1.2	5.8±1.5	5.3±1.3*	0.025
BMI (kg x m <sup>-2</sup> , mean±SD)	28.2±4.1	28.2±4.3	28.3±4.5	0.975
CRP (mg/L, median±SE)	1.3±0.5	2.2±0.9 <sup>†</sup>	2.4±0.7 <sup>†</sup>	0.003
FG (mean±SD)	3.2±1.7	3.3±1.2	3.2±0.9	0.858
Men (%)	60.2%	64.0%	85.1%*, <sup>†</sup>	<0.001
DM (%)	8.4%	12.0%	9.0%	0.765
Hypertension (%)	66.3%	84.0% <sup>†</sup>	59.2%*	0.004
Smokers (%)	45.8%	64.0% <sup>†</sup>	76.1% <sup>†</sup>	<0.001
Premature MI in family (%)	18.1%	20.0%	18.9%	0.963
Pre-hospital therapy				
Aspirin (%)	75.9%	80.0%	89.1% <sup>†</sup>	0.014
Statins (%)	21.7%	30.0%	51.2%*, <sup>†</sup>	<0.001
ACEI (%)	53.0%	58.0%	58.2%	0.713
BB (%)	53.0%	76.0% <sup>†</sup>	82.1% <sup>†</sup>	<0.001

\* p<0.05 compared with stable angina group

<sup>†</sup> p<0.05 compared with control group

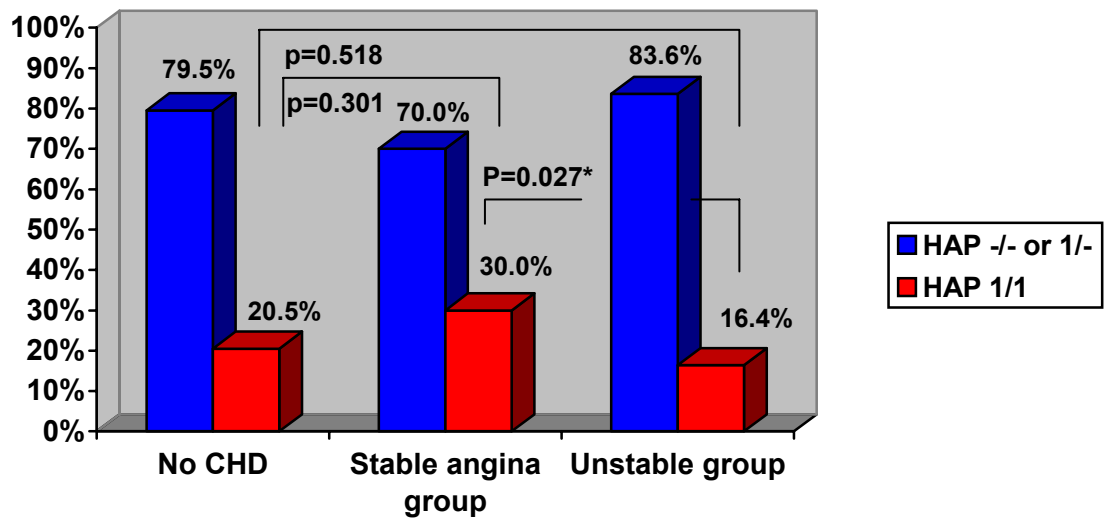
<sup>‡</sup> Risk factors: age (>55 for women or >45 for men) at the time of CHD onset, hypertension, TC >5 mmol/L, DM, smoking, BMI >30 kg/m<sup>2</sup>, premature MI in family.

**Table 5. Association of non-genetic risk factors with stable versus unstable course of CHD (multivariate analysis).**

Variable	Exp(β)	P value
Constant	1.35	0.091
Age	1.04	0.121
TC level	1.35	0.019
BMI	0.93	0.105
Female gender	0.38	0.031
DM	1.24	0.690
Hypertension	3.06	0.011
Smoking	1.10	0.835
Premature MI in family	0.80	0.614



**Chart 1. Prevalence of IL-6 promoter Hap\*1 homozygotes among patients with no CHD on angiography and patients with stable or unstable course of CHD.**



\* After adjustment for non-genetic factors in MVA: age, TC, BMI, gender, DM, hypertension, smoking and family history of premature MI.

**Table 6. Comparison of genetic variations in patients with stable (n=50) and unstable (n=201) initial course of CHD.**

	Model*	N <sup>†</sup>	% <sup>†</sup>	Univariate analysis			Multivariate analysis <sup>‡</sup>	
				R (Spearman)	OR	P value	Exp(β)	P value
<b>IL-1B (-511) C/T</b>								
CC	GDE	91/112	81.3%	-0.014	-	0.820	0.833	0.505
CT		90/115	78.3%					
TT		20/24	83.3%					
CC+CT (vs. TT)	D (C)	181/227	79.7%	-	0.787	0.794	1.317	0.653
CT+TT (vs. CC)	D (T)	110/139	79.1%	-	0.875	0.797	0.812	0.551
<b>IL-1B (+3954) C/T</b>								
CC	GDE	125/157	79.6%	0.018	-	0.771	1.224	0.500
CT		65/81	80.2%					
TT		11/13	84.6%					
CC+CT (vs. TT)	D (C)	190/238	79.8%	-	0.720	1.000	0.646	0.609
CT+TT (vs. CC)	D (T)	76/94	80.9%	-	1.081	0.941	1.236	0.556
<b>IL-1RN (VNTR)</b>								
<i>IL-1RN(VNTR)*1</i>								
-/-	GDE	20/26	76.9%	0.065	-	0.307	1.405	0.185
1/-		80/103	77.7%					
1/1		101/122	82.8%					
At least one *1 (vs. -/-)	D	181/225	80.4%	-	1.234	0.868	1.365	0.562
No 1/1 (vs. 1/1)	R	100/129	77.5%	-	1.395 <sup>§</sup>	0.375	1.649 <sup>§</sup>	0.159
<i>IL-1RN(VNTR)*2</i>								
-/-	GDE	105/130	80.8%	-0.313	-	0.626	0.745	0.265
2/-		80/99	80.8%					
2/2		16/22	72.7%					
At least one *2 (vs. -/-)	D	96/121	79.3%	-	0.914	0.900	0.772	0.461
No 2/2 (vs. 2/2)	R	185/229	80.8%	-	0.634 <sup>§</sup>	0.402	0.508 <sup>§</sup>	0.217
<i>IL-1RN(VNTR)*3</i>								
-/-	D	194/240	80.8%	-	0.415	0.237	0.531	0.368
3/-		7/11	63.6%					

**Table 6 (continued).**

<b>IL-6 (-596) G/A</b>									
AA	GDE	33/49	67.3%	0.098	-	0.120	1.480	0.129	
AG		117/139	84.2%						
GG		51/63	81.0%						
AA+AG (vs. GG)	D (A)	150/188	79.8%	-	0.929	0.986	0.992	0.985	
AG+GG (vs. AA)	D (G)	168/202	83.2%	-	<b>2.396<sup>†</sup></b>	<b>0.022</b>	<b>2.638</b>	<b>0.014</b>	
<b>IL-6 (-572) G/C</b>									
GG	GDE	177/224	79.0%	0.077	-	0.222	2.050	0.244	
GC		22/25	88.0%						
CC		2/2	100.0%						
GG+GC (vs. CC)	D (G)	199/249	79.9%	-	-	1.000	-	0.999	
GC+CC (vs. GG)	D (C)	24/27	88.9%	-	2.124	0.338	2.003	0.298	
<b>IL-6 (-373) AnTn</b>									
<i>A8T12 (*1)</i>									
-/-	GDE	51/64	79.7%	-0.085	-	0.178	0.708	0.175	
1/-		117/138	84.8%						
1/1		33/49	67.3%						
At least one *1 (vs. -/-)	D	150/187	80.2%	-	1.033	1.000	1.088	0.829	
No 1/1 (vs. 1/1)	R	168/202	83.2%	-	<b>0.417<sup>§</sup></b>	<b>0.022</b>	<b>0.379<sup>§</sup></b>	<b>0.014</b>	
<i>A9T11 (*2)</i>									
-/-	GDE	123/155	79.4%	0.025	-	0.697	1.259	0.454	
2/-		68/84	81.0%						
2/2		10/12	83.3%						
At least one *2 (vs. -/-)	D	78/96	81.3%	-	1.127	0.839	1.349	0.410	
No 2/2 (vs. 2/2)	R	191/239	79.9%	-	1.257 <sup>§</sup>	1.000	1.159 <sup>§</sup>	0.859	
<i>A10T11 (*3)</i>									
-/-	GDE	139/177	78.5%	0.064	-	0.313	1.506	0.274	
3/-		58/70	82.9%						
3/3		4/4	100.0%						
At least one *3 (vs. -/-)	D	62/74	83.8%	-	1.412	0.437	1.441	0.355	
No 3/3 (vs. 3/3)	R	197/247	79.8%	-	-	0.587	-	0.999	

**Table 6 (continued).**

<i>A10T10</i> (*4)									
-/-	GDE	142/180	78.9%	0.036	-	0.571	0.945	0.861	
4/-		55/64	85.9%						
4/4		4/7	57.1%						
At least one *4 (vs. -/-)	D	59/71	83.1%	-	1.316	0.564	1.104	0.805	
No 4/4 (vs. 4/4)	R	197/244	80.7%	-	0.318 <sup>§</sup>	0.144	0.407 <sup>§</sup>	0.288	
<i>A9T12</i> (*5)									
-/-	GDE	199/249	79.9%	-	-	-	-	0.999	
5/-		2/2	100%						
5/5		0/0	0%						
At least one *5 (vs. -/-)	D	2/2	100%	-	-	1.000	-	0.999	
No 5/5 (vs. 5/5)	R	251/251	100%	-	-	-	-	-	
<b>IL-6 (-174) G/C</b>									
GG	GDE	50/62	80.6%	-0.090	-	0.156	0.694	0.155	
GC		116/138	84.1%						
CC		35/51	68.6%						
GG+GC (vs. CC)	D (G)	166/200	83.0%	-	<b>2.232</b>	<b>0.036</b>	<b>2.503</b>	<b>0.019</b>	
GC+CC (vs. GG)	D (C)	151/189	79.9%	-	0.954	1.000	1.010	0.981	
<b>IL-6 haplotypes</b>									
<i>Hap*1</i>									
-/-	GDE	51/64	79.7%	-0.074	-	0.243	0.737	0.233	
1/-		117/139	84.2%						
1/1		33/48	68.8%						
At least one *1 (vs. -/-)	D	150/187	80.2%	-	1.033	1.000	1.088	0.829	
No 1/1 (vs. 1/1)	R	168/203	82.8%	-	<b>0.458<sup>§</sup></b>	<b>0.047</b>	<b>0.414<sup>§</sup></b>	<b>0.027</b>	
<i>Hap*2</i>									
-/-	GDE	125/158	79.1%	0.037	-	0.555	1.407	0.292	
2/-		67/83	80.7%						
2/2		9/10	90.0%						
At least one *2 (vs. -/-)	D	76/93	81.7%	-	1.180	0.737	1.436	0.325	
No 2/2 (vs. 2/2)	R	192/241	79.7%	-	2.297 <sup>§</sup>	0.692	1.991 <sup>§</sup>	0.531	

**Table 6 (continued).**

<i>Hap*3</i>									
-/-	GDE	139/177	78.5%	0.059	-	0.313	1.506	0.274	
3/-		58/70	82.9%						
3/3		4/4	100%						
At least one *3 (vs. -/-)	D	62/74	83.8%	-	1.412	0.437	1.441	0.355	
No 3/3 (vs. 3/3)	R	197/247	79.8%	-	-	0.587	-	0.999	
<i>Hap*4</i>									
-/-	GDE	166/206	80.6%	-0.032	-	0.613	1.276	0.244	
4/-		33/41	80.5%						
4/4		2/4	50.0%						
At least one *4 (vs. -/-)	D	35/45	77.8%	-	0.843	0.825	0.679	0.379	
No 4/4 (vs. 4/4)	R	199/247	80.6%	-	0.241 <sup>§</sup>	0.178	0.235 <sup>§</sup>	0.197	
<i>Hap*5</i>									
-/-	GDE	177/224	79.0%	0.077	-	0.222	2.050	0.244	
5/-		22/25	88.0%						
5/5		2/2	100%						
At least one *5 (vs. -/-)	D	24/27	88.9%	-	2.124	0.338	2.003	0.298	
No 5/5 (vs. 5/5)	R	199/249	79.9%	-	-	1.000	-	0.999	
<i>Hap*6</i>									
-/-	D	199/249	79.9%	-	-	1.000	-	0.999	
6/-		2/2	100%						
<i>Hap*7</i>									
-/-	D	198/247	80.2%	-	0.742	1.000	0.569	0.649	
7/-		3/4	75.0%						
<i>Hap*8</i>									
-/-	D	201/250	80.4%	-	-	0.199	-	1.000	
8/-		0/1	0%						
<i>Hap*9</i>									
-/-	D	201/250	80.4%	-	-	0.199	-	1.000	
9/-		0/1	0%						

\* Model: GDE - gene dose effect, D – dominant, R – recessive.

† Patients with unstable course out of all patients with genotype.

‡ Variables included in the Model: age, gender, TC, BMI, DM, hypertension, smoking, family history of premature MI and genetic variation.

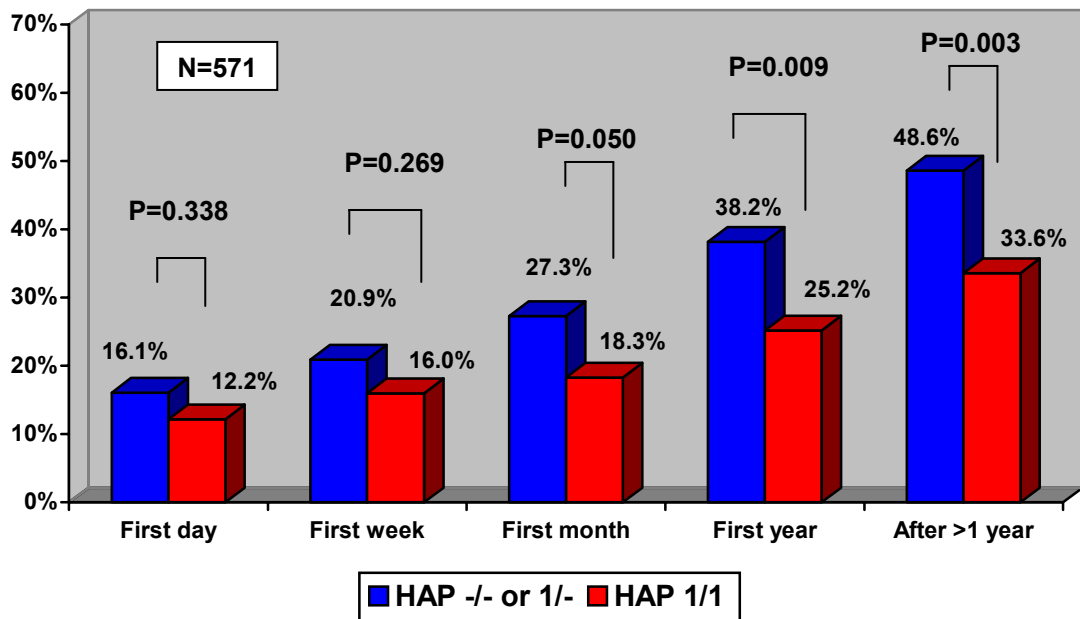
§ OR or Exp(β) for homozygotes compared with the other patients.

¶ Statistically significant results (p<0.05) are given in bold.

### ***Time from the first symptoms of CHD to the first MI***

This analysis was performed for 571 patients with CHD confirmed by angiography. Among 381 patients (66.7%) with history of MI, only for 259 patients (45.4% of all patients or 68.0% of patients with MI) time from the first CHD symptoms to the first MI was known precisely. When the time interval elapsing from the initial symptoms to the first MI was compared in Hap\*1 homozygotes with the other patients, there was a trend of lower MI incidence, which was borderline significant at one month ( $p=0.05$ ) and became highly significant ( $p<0.01$ ) after the first month since the first symptoms (Chart 2).

**Chart 2. Time from the first symptoms of CHD to occurrence of the first MI in Hap\*1 homozygotes compared with others. Cumulative incidence.**

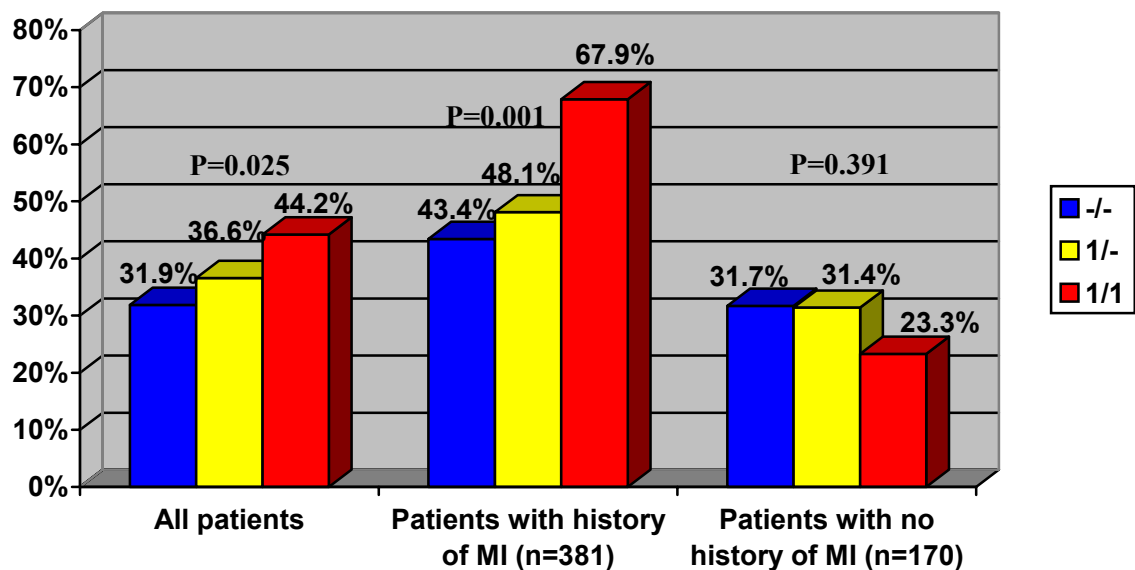


### ***Coronary artery occlusion***

In 255 patients (37.2% of all 686 patients) occlusion of at least one coronary artery was found. Number of Hap\*1 correlated directly with presence of coronary artery occlusion: it was present in 31.9%, 36.6% and 44.2% of patients with none, one and two Hap\*1, respectively ( $r=0.086$ ,  $p=0.025$ ; Chart 3). Homozygotes had OR=1.46 ( $p=0.052$ ) to have coronary artery occlusion in UV analysis and  $\text{Exp}(\beta)=1.22$  ( $p=0.097$ ) in MV analysis.

In 246 patients (96.5%) history of MI was clearly known: 196 patients (79.7%) had previous MI and 50 patients (19.6%) had no history of MI. At least one coronary occlusion was present in 51.4% (196/381) and 29.4% (50/170) of patients with and without history of MI, respectively. In patients with history of MI, Hap\*1 correlated with more common occlusions ( $r=0.163$ ;  $p=0.001$ ), while opposite though non-significant trend was seen in subgroups without history of MI (Chart 3).

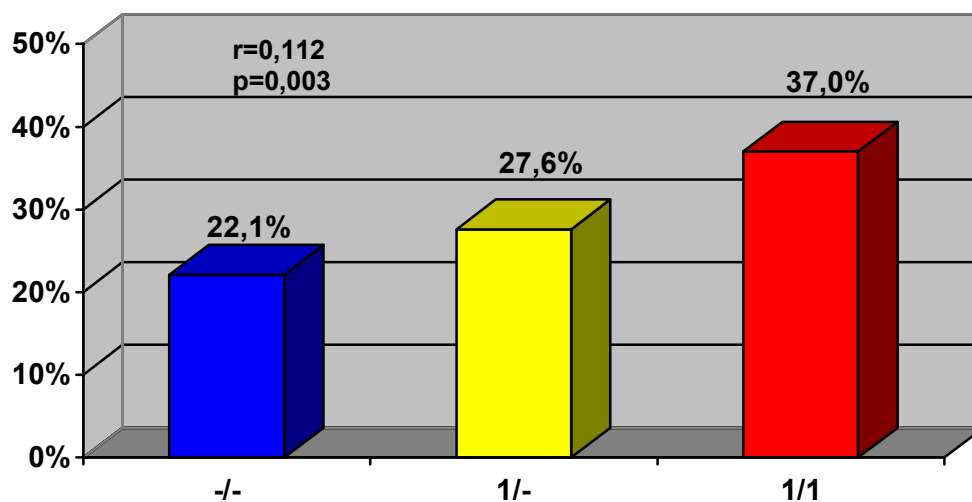
**Chart 3. Coronary artery occlusions according to number of IL-6 Hap\*1 in the total sample and subgroups of patients with and without history of MI.**



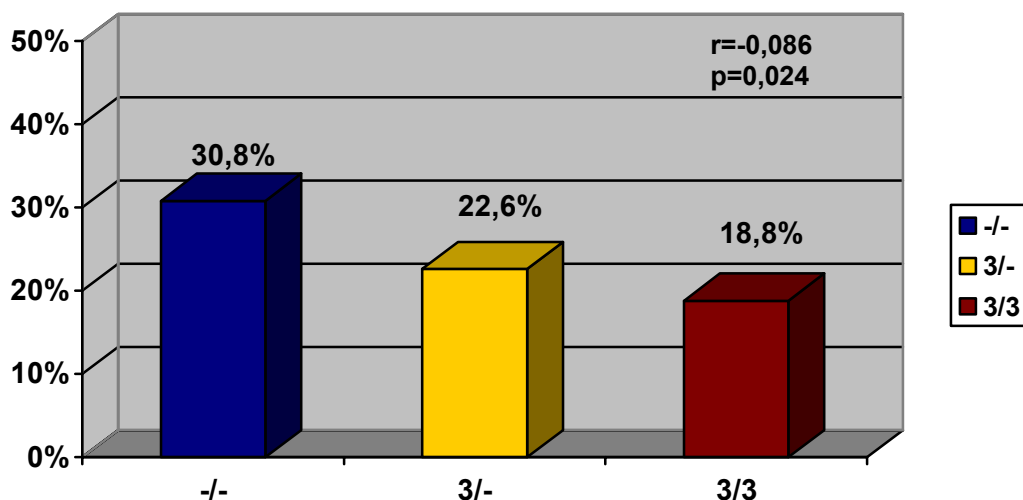
***Patients with MI and coronary artery occlusion***

When combined criterion of MI and coronary occlusion was analyzed in the total sample, IL-6 Hap\*1 strongly correlated with it in a gene-dose dependent way (Chart 4) in UV ( $r=0.112$ ;  $p=0.003$ ) and MV ( $\text{Exp}(\beta)=1.391$ ;  $p=0.011$ ) analyses. In MV model only smoking was stronger predictor ( $\text{Exp}(\beta)=1.576$ ) than Hap\*1. Opposite association was found for Hap\*3 or A10T11 (Chart 5) in UV ( $r=-0.086$ ;  $p=0.024$ ) and MV analyses ( $\text{Exp}(\beta)=0.664$ ;  $p=0.024$ ).

**Chart 4. Prevalence of combined criterion (coronary artery occlusion and history of myocardial infarction) according to number of Hap\*1 (n=686).**



**Chart 5. Prevalence of combined criterion (coronary artery occlusion and history of myocardial infarction) according to number of Hap\*3 (n=686).**



### **Other clinical criteria**

In addition to previous analysis several other criteria were investigated for two reasons:

3. To exclude possibility, that associations found for clinical course are indirectly associated with other CHD characteristics (such as risk of CHD in general irrespective to initial clinical course).
4. To search for other potential influences of IL genetic variations on CHD manifestations.

### **Patients with and without CHD**

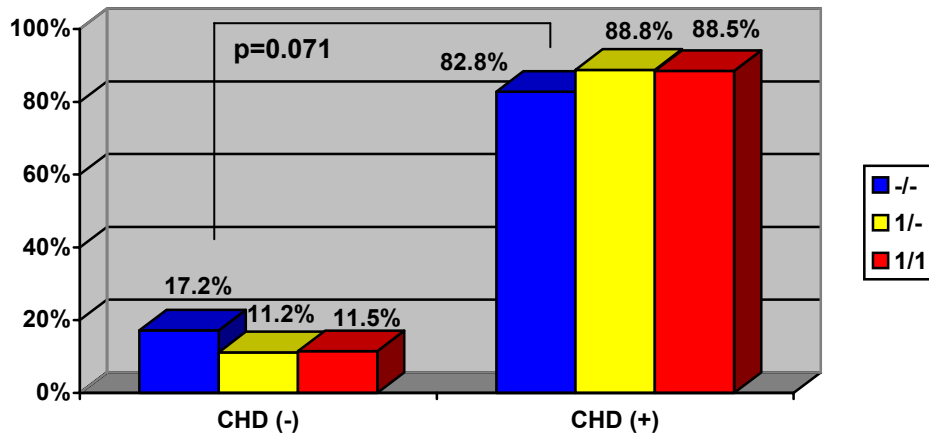
In carriers of at least one Hap\*1, CHD was found on angiography more often than in non-carriers (88.7% vs. 82.8%, respectively; Chart 6), although it was not statistically significant difference neither in UVA (OR=1.636;  $p=0.071$ ) nor in MVA (Exp( $\beta$ )=1.575;  $p=0.086$ ). Homozygotes of Hap\*3 had opposite association (66.7% vs. 87.8%; OR=0.28;  $p=0.031$ ; Chart 7), which remained significant in MVA (Exp( $\beta$ )=0.234;  $p=0.015$ ). All Hap\*3 carriers were the only IL-6 (-373) A10T11 carriers, and number of homozygotes was relatively small ( $n=15$ ).

### **Age of onset of CHD**

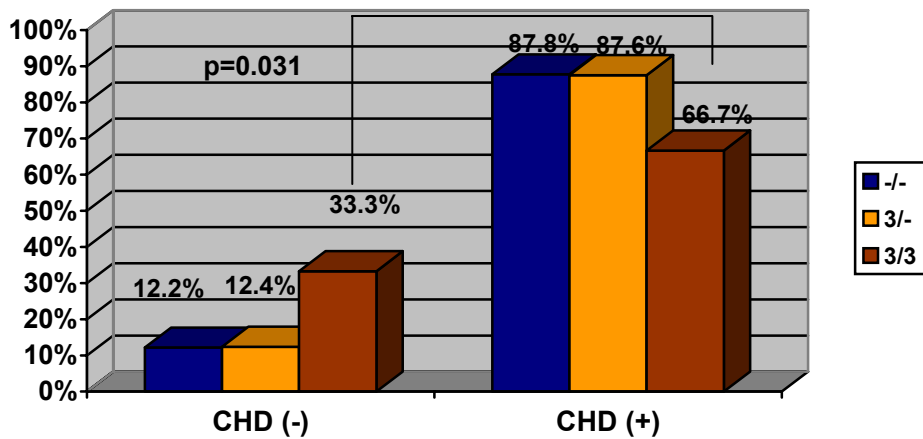
Homozygotes of IL-1B (+3954) T allele correlated with approximately 3.6 years later onset of first CHD symptoms than in carriers of C allele (56.5 $\pm$ 7.9 vs. 52.9 $\pm$ 8.7 years, respectively;  $t=-2.338$ ;  $p=0.020$ ). This difference was almost close to statistical significance in MVA ( $\beta=-0.040$ ;  $p=0.058$ ) and corresponded to 1.3 years difference (Chart 8). Similar association was found also for Hap\*2 homozygotes. Although UVA did not show statistically significant difference ( $p=0.197$ ), in MVA it became significant and corresponded 2 years ( $\beta=0.042$ ;  $p=0.046$ ; Chart 9). In contrary, Hap\*1 had a trend to be linearly associated with earlier onset of CHD ( $r=-0.083$ ;  $p=0.071$ ), which was more non-significant in MVA ( $\beta=-0.030$ ;  $p=0.153$ ; Chart 9). For Hap\*3 homozygotes first manifestations of CHD developed substantially earlier (6.9 years;  $t=2.094$ ;  $p=0.037$ ), but this difference was not significant in MVA (1.3 years;  $\beta=0.018$ ;  $p=0.400$ ).



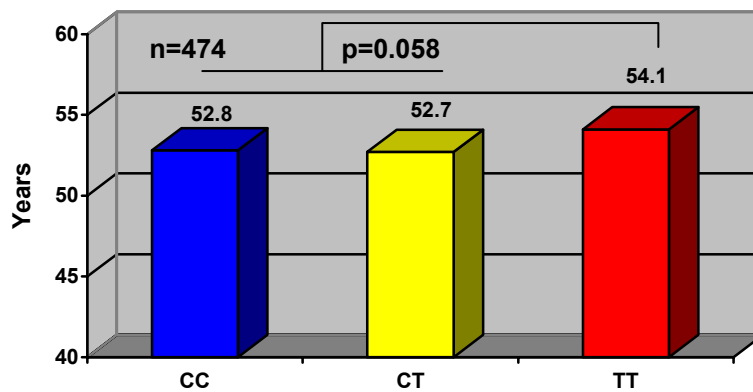
**Chart 6. Prevalence of CHD confirmed on angiography according to number of Hap\*1 (n=654).**



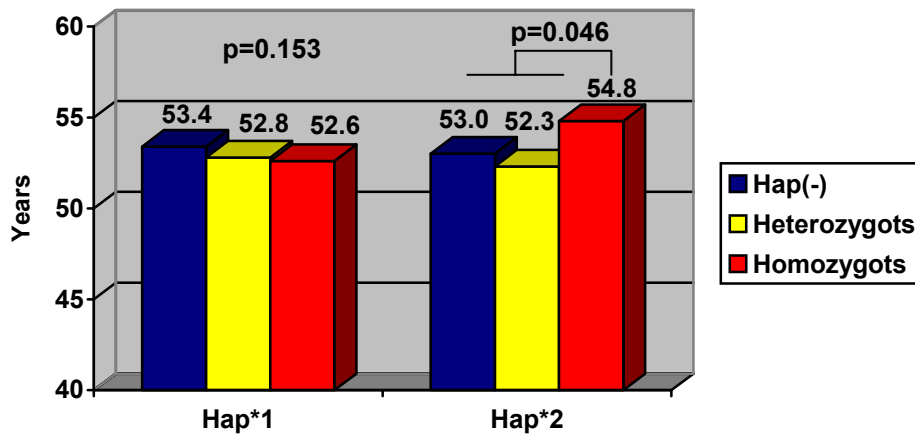
**Chart 7. Prevalence of CHD confirmed on angiography according to number of Hap\*3 (n=654).**



**Chart 8. Development of first CHD symptoms at later age in patients with IL-1B (+3954) TT genotype (mean age, MVA).**



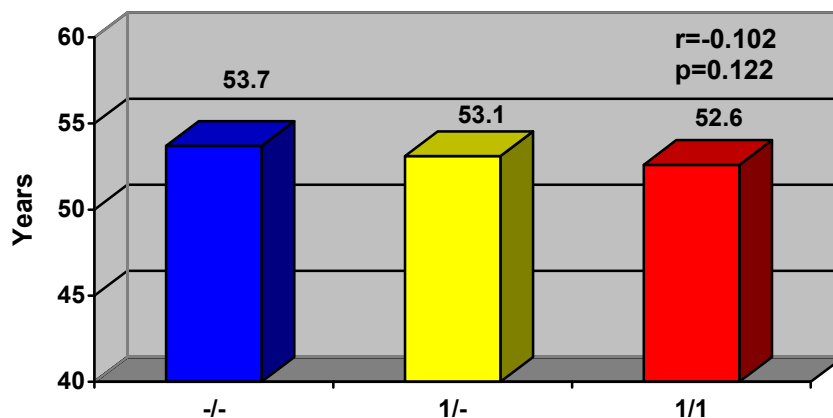
**Chart 9. Age of development of first CHD symptoms according to number of Hap\*1 and Hap\*2 (MVA).**



***Age of onset of first MI***

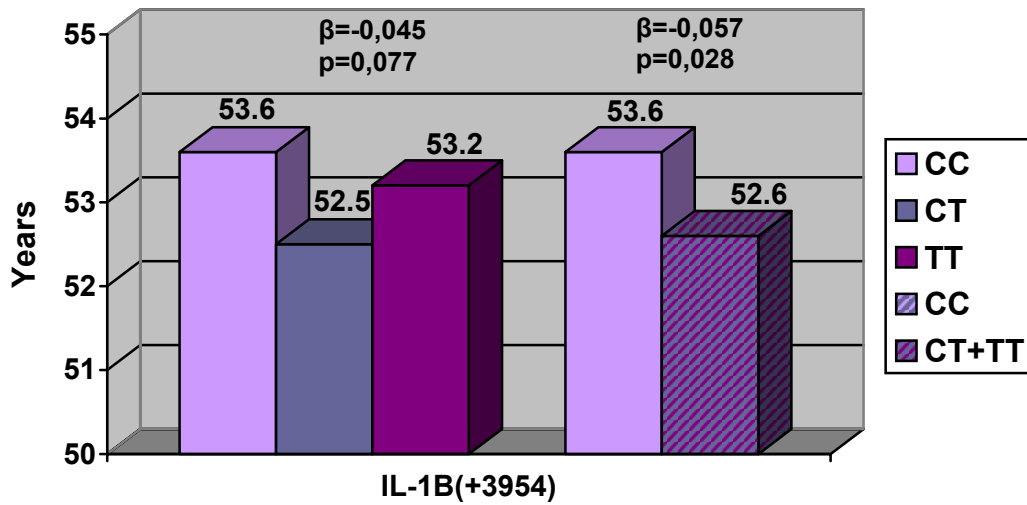
This parameter was first analyzed in a pilot study on smaller sample (n=193) of patients (Latkovskis et al., 2004b). The final analysis (n=364) showed near-significant correlation between Hap\*1 and development of first MI in earlier age in UVA ( $r=-0.102$ ;  $p=0.052$ ), which was non-significant in MVA ( $\beta=-0.040$ ;  $p=0.122$ ; Chart 10).

**Chart 10. Number of IL-6 Hap\*1 and age when first MI developed (MVA; n=364).**

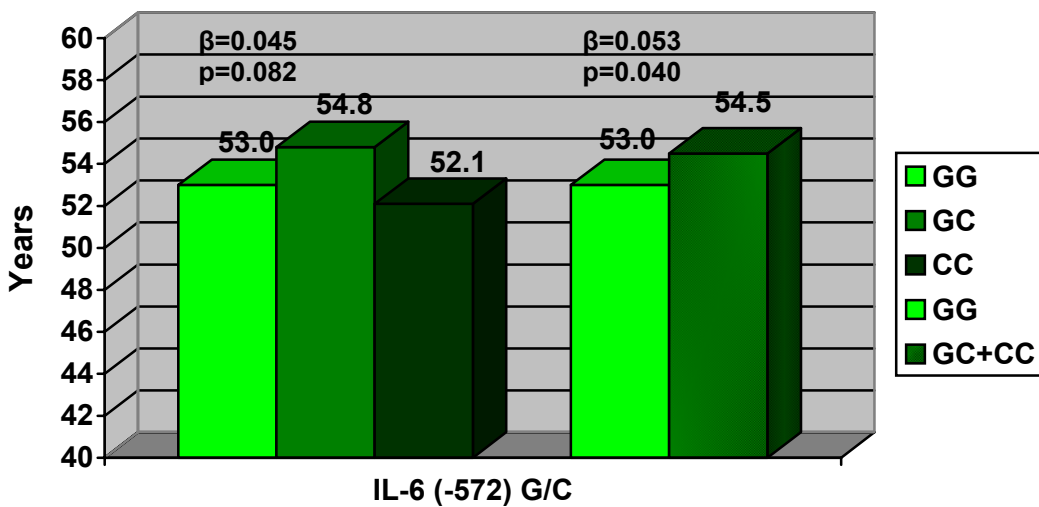


This criterion did not correlate with IL-1B (+3954) and IL-6 (-572) polymorphisms in UV analysis. In MV analysis, however, carriers of IL-1B (+3954) T allele and carriers of IL -6 (-572) C allele (or Hap\*5) had earlier ( $\beta=-0.057$ ;  $p=0.028$ ) and later ( $\beta=0.053$ ;  $p=0.040$ ) onset of first MI, respectively (Charts 11 and 12).

**Chart 11. Genotypes of IL-1B (+3954) and age when first MI developed (MVA; n=364).**



**Chart 12. IL-6 (-572) genotypes and age when first MI developed (MVA; n=364).**



**History of MI**

No significant associations for any of the studied genetic variations were found, except for carriers of IL-1RN (VNTR) allele 3, in whom history of MI was positive in fewer cases in UVA (37.0% vs. 62.1%; OR=0.36; p=0.009). This association remained significant after MVA (Exp( $\beta$ )=0.353; p=0.012), but it should be noted that number of such patients was small (n=27; 4%).

### 8.3. Interleukin genetic variations and CRP level

Analysis was performed twice: (i) initial pilot analysis was performed only with polymorphisms in a smaller sample (n=160) without IL-6 haplotypes (Latkovskis et al., 2004a), and (ii) extended analysis repeated on larger sample (n=624) in which IL-6 haplotypes were considered as well (Latkovskis et al., 2005a).

#### *Results of pilot analysis*

Characteristics of patients are summarized in Table 7. None of the genotype frequencies (Table 8) deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. In univariate analysis, smoking (p<0.001), BMI (0.005), TC (p=0.018) and diabetes (0.056) showed significant or near-significant association with CRP levels.

**Table 7. Characterization of patients included in the pilot study.**

Men, %	77.5
Smokers, %	36.3
Diabetes, %	8.1
Hypertension, %	56.9
Age, years (mean ± SD)	53.2 ± 7.7
BMI*, mean ± SD	28.47 ± 4.02
TC†, mean ± SD	5.80 ± 1.30
CRP, mg/L (median, SE)	1.70 (0.16)
Log-CRP (mean ± SD)	0.23 ± 0.45

**Table 8. Genetic variations of patients included in the pilot study.**

	Allele	Frequency (n)	Genotype	Frequency (n)	P value*
<b>IL-1B(+3954)</b>	C	0.72 (230)	CC	0.52 (83)	0.990
	T	0.28 (90)	CT	0.40 (64)	
			TT	0.08 (13)	
<b>IL-1B(-511)</b>	C	0.65 (209)	CC	0.44 (70)	0.825
	T	0.35 (111)	CT	0.43 (69)	
			TT	0.13 (21)	
<b>IL-1RN(VNTR)</b>	1	0.72 (229)	1/1	0.51 (81)	0.998
	2	0.27 (88)	1/2	0.41 (65)	
	3	0.01 (3)	1/3	0.01 (2)	
			2/2	0.07 (11)	
			2/3	0.01 (1)	
<b>IL-6(-174)</b>	C	0.53 (170)	CC	0.27 (43)	0.790
	G	0.47 (150)	CG	0.52 (84)	
			GG	0.21 (33)	
<b>IL-6(-572)</b>	G	0.94 (301)	GG	0.88 (141)	0.598
	C	0.06 (19)	GC	0.12 (19)	

\* Compared to expected distribution predicted by Hardy-Weinberg equilibrium.

### *Genetic variations and CRP*

Two variations, IL-1B(+3954)C/T and IL-1RN(VNTR), exerted significant association with CRP levels in univariate analysis ( $p=0.014$  and  $0.048$ , respectively). The influences of IL-1B(+3954)T and IL-1RN(VNTR)\*2 alleles on CRP levels were adjusted with ANCOVA for confounding variables (smoking, BMI, TC and diabetes). The adjustment was performed to test whether the true associations of the two genetic variations with CRP levels were still significant after effects of the known confounders were statistically eliminated. The adjusted CRP levels according to genotype with assumption of different effects of minor alleles (recessive, gene dose effect or dominant) are summarized in Table 9. Each genetic variation was adjusted only for non-genetic confounders in Model 1 and for non-genetic confounders as well as for the other polymorphism in Model 2 (Table 9). Model 2 was created to test significance of each polymorphism when the other polymorphism is considered in addition to nongenetic factors.

After adjusting for nongenetic confounders in the Model 1, IL-1B(+3954)T remained strongly associated with higher CRP levels when dominant ( $p=0.002$ ) or gene dose effect patterns ( $p=0.007$ ) of gene-dose effects were assumed (Model 1, Table 9). Post-hoc comparisons using the Bonferroni test indicated that mean CRP levels in patients with CT genotype were significantly different from those with CC genotype ( $p=0.008$ ), but not for CT versus TT genotype ( $p=1.00$ ), suggesting dominant effect of the T allele. The difference of CRP levels between CC and TT genotypes did not reach statistical significance ( $p=0.327$ ) in the post-hoc analysis, which may be attributed to small number of patients with TT genotype. Conversely, CRP levels were significantly lower in carriers of IL-1RN(VNTR)\*2 ( $p=0.009$ ) and tended to correlate with number of IL-1RN(VNTR)\*2, suggesting a gene-dose effect. No significant differences, however, were found among the three IL-1RN(VNTR) genotypes in the post-hoc analysis.

In the Model 2, both polymorphisms were entered with assumption of the most relevant patterns - dominant pattern for IL-1B(+3954)T and dominant (Model 2A, Table 9) or gene-dose effect (Model 2B, Table 9) patterns for IL-1RN(VNTR)\*2. IL-1B(+3954)T remained significantly associated with higher CRP levels ( $p<0.05$ ) irrespective to the entered IL-1RN(VNTR)\*2 patterns. The association of IL-1RN(VNTR)\*2 with lower CRP levels did not reach statistical significance in either dominant ( $p=0.076$ ) or gene-dose ( $p=0.179$ ) pattern after adjustment for IL-1B(+3954)T.

**Table 9. Levels of C-reactive protein according to polymorphisms of IL-1B (+3954) and IL-1RN (VNTR).**

Polymorphism	Pattern*	Genotypes compared	Log-CRP Mean (SE; 95% CI)	CRP <sup>†</sup> mg/L	P value <sup>‡</sup>
<b>Model 1<sup>§</sup></b>					
IL-1B (+3954)	D	CC	0.240 (0.067; 0.107-0.373)	1.74	0.002
		CT, TT	0.443 (0.067; 0.311-0.574)	2.77	
	GDE	CC	0.240 (0.068; 0.106-0.374)	1.74	0.007
		CT	0.445 (0.071; 0.304-0.585)	2.79	
		TT	0.434 (0.119; 0.198-0.670)	2.72	
R	CC, CT	0.331 (0.062; 0.208-0.455)	2.14	0.370	
	TT	0.439 (0.123; 0.197-0.682)	2.75		
IL-1RN (VNTR)	D	1/1, 1/3	0.421 (0.066; 0.290-0.552)	2.64	0.009
		1/2, 2/2, 2/3	0.252 (0.069; 0.115-0.388)	1.79	
	GDE	1/1, 1/3	0.418 (0.067; 0.287-0.550)	2.62	0.023
		1/2, 2/3	0.266 (0.071; 0.126-0.406)	1.85	
		2/2	0.148 (0.135; -0.119-0.415)	1.41	
	R	1/1, 1/2, 1/3, 2/3	0.352 (0.061; 0.232-0.472)	2.25	0.119
		2/2	0.151 (0.137; -0.120-0.422)	1.42	
<b>Model 2A<sup>¶</sup></b>					
IL-1B (+3954)	D	CC	0.253 (0.067; 0.120-0.386)	1.79	0.012
		CT, TT	0.420 (0.067; 0.287-0.553)	2.63	
IL-1RN (VNTR)	D	1/1, 1/3	0.395 (0.066; 0.265-0.526)	2.48	0.076
		1/2, 2/2, 2/3	0.277 (0.069; 0.142-0.413)	1.89	
<b>Model 2B<sup>¶</sup></b>					
IL-1B (+3954)	D	CC	0.216 (0.074; 0.071-0.362)	1.64	0.016
		CT, TT	0.378 (0.081; 0.219-0.538)	2.39	
IL-1RN (VNTR)	GDE	1/1, 1/3	0.395 (0.066; 0.264-0.526)	2.48	0.179
		1/2, 2/3	0.285 (0.070; 0.147-0.424)	1.93	
		2/2	0.212 (0.136; -0.056-0.480)	1.63	

\* Effect of minor allele: D – dominant, GDE – gene dose effect, R – recessive.

<sup>†</sup> CRP values back-transformed from mean log-CRP.

<sup>‡</sup> Based on comparison of log-CRP.

<sup>§</sup> Factors included in Model 1: smoking, BMI, TC, diabetes, one polymorphism

<sup>¶</sup> Factors included in Model 2A and 2B: smoking, BMI, TC, diabetes, both polymorphisms.

### Extended analysis

For this analysis 624 individuals were selected (Table 10). CHD was confirmed by angiography in 513 patients (82.2%) and it was ruled out in 80 individuals (12.8%). Other patients were not clearly classified in any of the two groups (n=31; 5%).

### Non-genetic factors and CRP

The following variables significantly associated with CRP levels were identified with backward multiple linear regression analysis: fibrinogen ( $\beta=0.424$ ;  $p<0.001$ ), BMI ( $\beta=0.134$ ;  $p<0.001$ ), smoking ( $\beta=0.128$ ;  $p=0.001$ ), male gender ( $\beta=0.126$ ;  $p=0.001$ ), hypertension ( $\beta=0.104$ ;  $p=0.004$ ) and aspirin usage ( $\beta=0.085$ ;  $p=0.017$ ). These variables were included in further multivariate analyses with forced entry models.

### Genetic variations and CRP

Comparison of CRP levels was performed both for transformed CRP (Log-CRP) values as continuous variable and for elevated CRP ( $>3$  mg/L, present in 210 or 33.7% of patients) as categorical variable. In contrast to pilot study, in this analysis also IL-6 (-373) AnTn polymorphism and promoter haplotypes were evaluated (Latkovskis et al., 2005a).

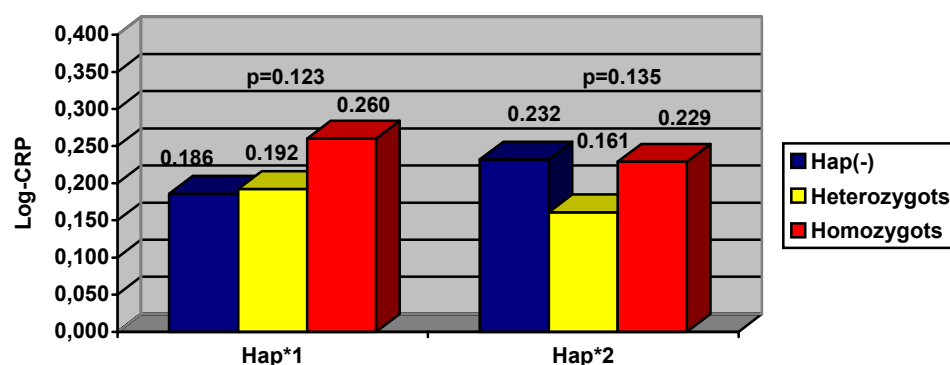
**Table 10. Characterization of patient sample included in the final analysis (n=624).**

<b>Cardiovascular risk factors</b>	
Men, (n, %)	473 (75.8%)
Age, years (mean ± SD)	55.79 ± 8.05
Smoking, (n, %)	183 (29.3%)
Diabetes, (n, %)	60 (9.6%)
Hypertension, (n, %)	396 (63.5%)
TC, mmol/L (mean ± SD)	5.55 ± 1.28
Hypercholesterolemia,* (n, %)	397 (63.3%)
BMI, kg x m <sup>-2</sup> (mean ± SD)	28.40 ± 4.14
Obesity† (n, %)	204 (67.3%)
Premature MI in family (n, %)	119 (19.1%)
<b>Characterization of CHD</b>	
Angiographic	
CHD confirmed (n, %)	513 (82.2%)
CHD ruled out (n, %)	80 (12.8%)
CHD uncertain (n, %)	31 (5.0%)
Previous MI (n, %)	378 (60.6%)
<b>Pre-hospital pharmacotherapy (n, %)</b>	
Aspirin	531 (85.1%)
Clopidogrel	31 (5.0%)
Statin	248 (39.7%)
ACEI	344 (55.1%)
BB	479 (76.8%)
<b>Inflammatory markers</b>	
CRP, mg/L (median, SE)	1.70 (0.16)
FG, g/L (mean ± SD)	3.15 ± 0.73

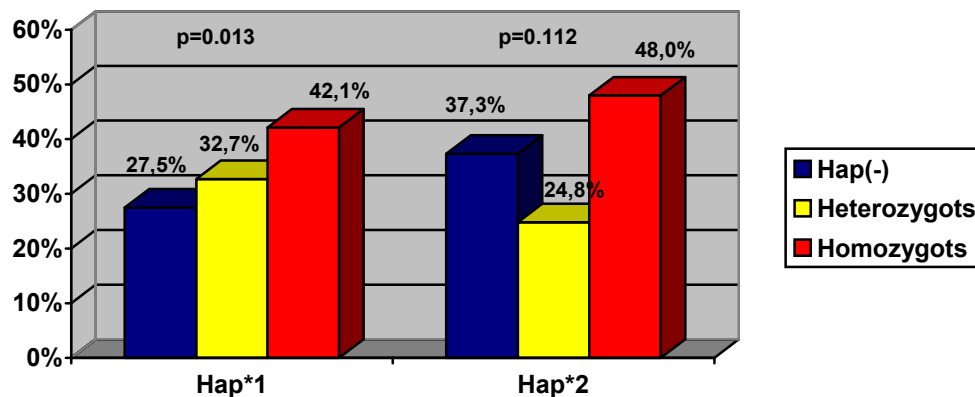
\* TC &gt;5 mmol/L

† BMI >30 kg x m<sup>-2</sup>**Hap\*1 and Hap\*2**

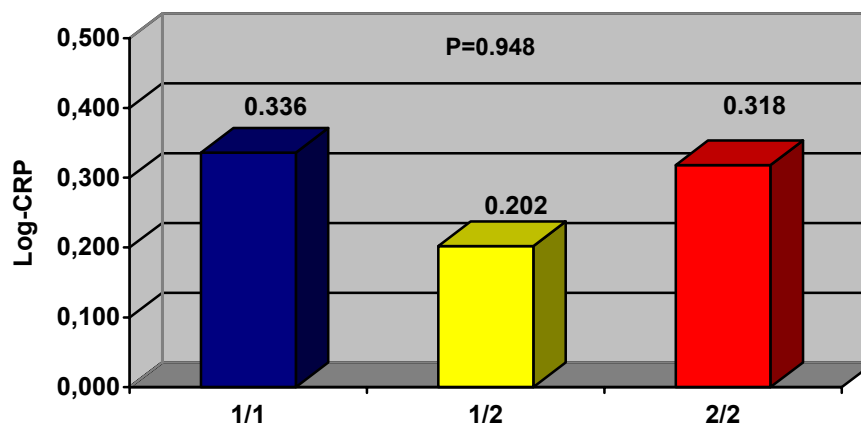
Among the most common variations Hap\*2 carriers had lower CRP levels in UV analysis (p=0,048), but this association was not significant after adjustment in MVA (p=0,063). In UV analysis, there was a trend of direct linear association between number of Hap\*1 and CRP levels (p=0.061 and p=0.123 in UVA and MVA, respectively) (Chart 13). Hap\*1 was significantly associated with more frequently increased CRP levels (p=0.019 and p=0.016 in UVA and MVA, respectively; Chart 14). No linear relationship was observed for number of copies of Hap\*2 and CRP levels or increased CRP >3 mg/L (Chart 13 and 14). No linear association was seen either when analysis was limited to carriers of Hap\*1 or Hap\*2 (Chart 15).

**Chart 13. Log-CRP according to Hap\*1 and Hap\*2 (MVA).**

**Chart 14. Increased CRP levels (>3 mg/L) according to Hap\*1 and Hap\*2 (MVA).**



**Chart 15. Levels of CRP (log-CRP) in carriers of haplotype 1 and/or haplotype 2: 1/1 (n=145), 1/2 (n=127), 2/2 (n=25).**



#### *Haplotype 6 and A9T12 allele*

Carrier status of IL-6 Hap\*6 (n=9) showed the strongest association with high CRP levels (p=0.008 and p=0.003 in UVA and MVA, respectively; Chart 16). All these patients were also carriers of all IL-6 (-373) A9T12 alleles. Increased CRP levels were approximately two times more common in presence of Hap\*6 (66.7% vs. 33.2%; OR=4,03; p=0,067; Chart 17), which was significant in MVA (Exp( $\beta$ )=4,631; p=0,037).

#### *Role of AnTn polymorphism*

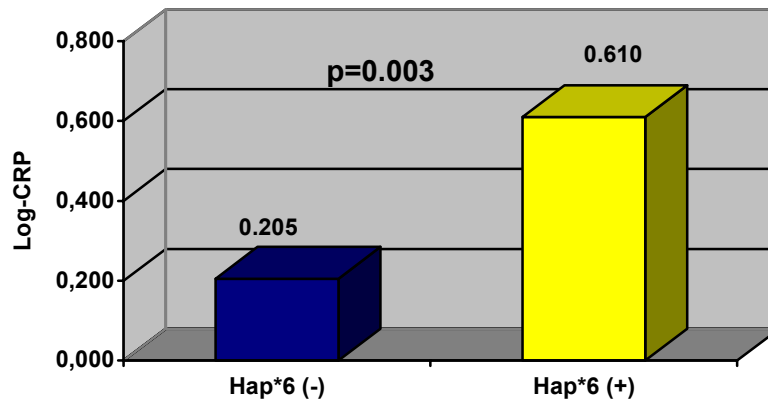
In order to clarify isolated effect of AnTn polymorphism on CRP levels, we compared CRP levels in patients with Hap\*2, Hap\*3, Hap\*4 and Hap\*6. All of these haplotypes have the same G allele in positions -596, -572 and -174, hence the only difference among them is AnTn polymorphism: 9/11, 10/11/, 10/10 and 9/12, respectively.

According to a method described in literature (Kelberman et al., 2004a) we selected 279 Hap\*1 heterozygotes who also had one of the following other haplotypes: Hap\*2 (n=127; 45.5%), Hap\*3 (n=92; 33.0%), Hap\*4 (n=53; 19.0%) or Hap\*6 (n=7; 2.5%). Patients with A9T12 allele (Hap\*6) had significantly higher Log-CRP (re-transformed CRP value 5.82 mg/L), compared with all other AnTn alleles (Chart 18):

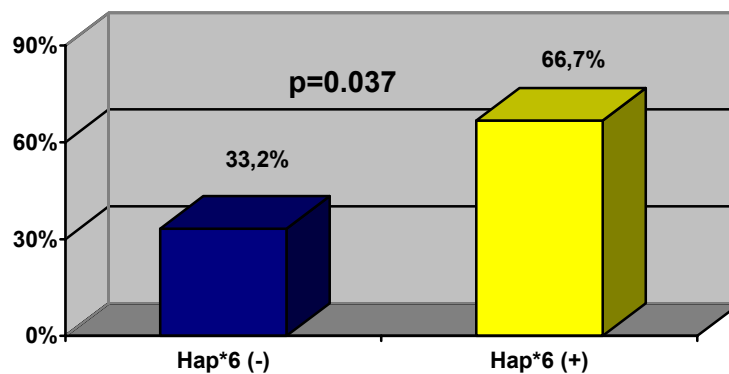


A9T11 (1.59 mg/L;  $p=0.002$ ), A10T11 (1.93 mg/L;  $p=0.010$ ) un A10T10 (1.74 mg/L;  $p=0.006$ ). No significant mutual differences were found among A9T11, A10T11 and A10T10 alleles. When A8T12 allele of Hap\*1 was compared with other alleles, significant differences were found only with A9T12 ( $p=0.020$ ) and A9T11 ( $p=0.020$ ) alleles (Chart 18). Similar results were obtained in MV analysis.

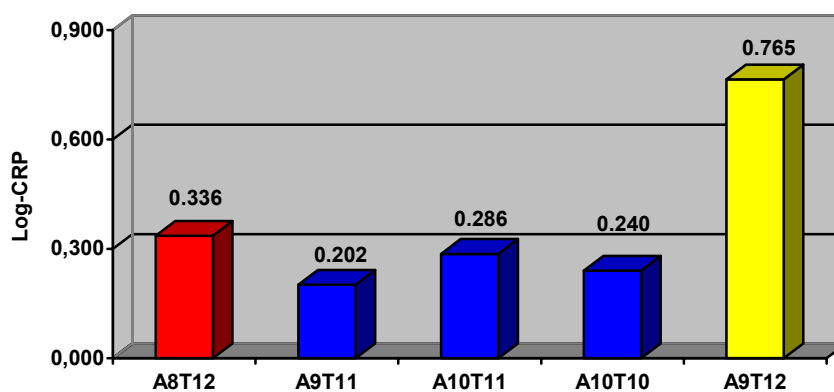
**Chart 16. Log-CRP according presence of haplotype 6 (MVA).**



**Chart 17. Patients with CRP >3 mg/L according to presence of haplotype 6 (MVA).**



**Chart 18. Log-CRP according to AnTn variations (UVA).\***

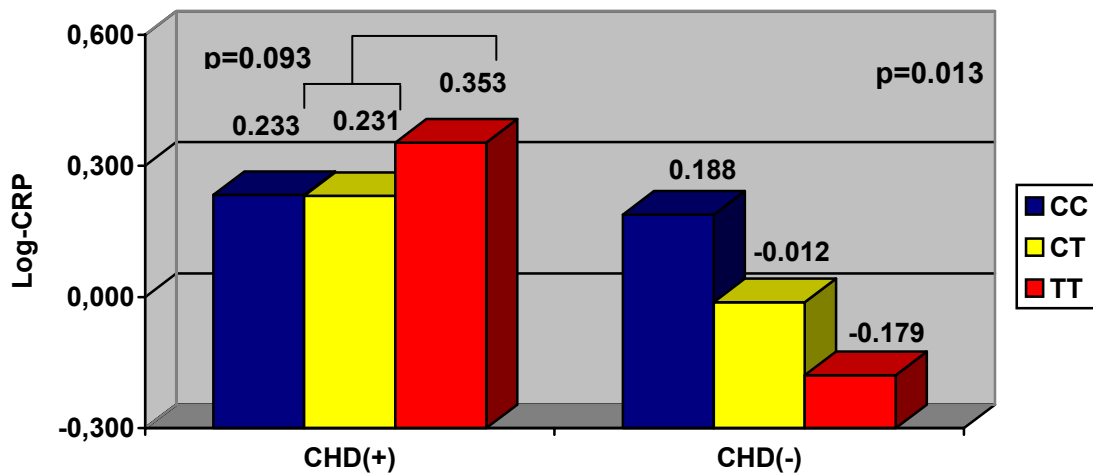


\* Patients had the following haplotype combinations, respectively: 1/1 (n=145), 1/2 (n=127), 1/3 (n=92), 1/4 (n=53) and 1/6 (n=7). See text for statistical significance.

*IL-1B (+3954) C/T, and interaction with CHD.*

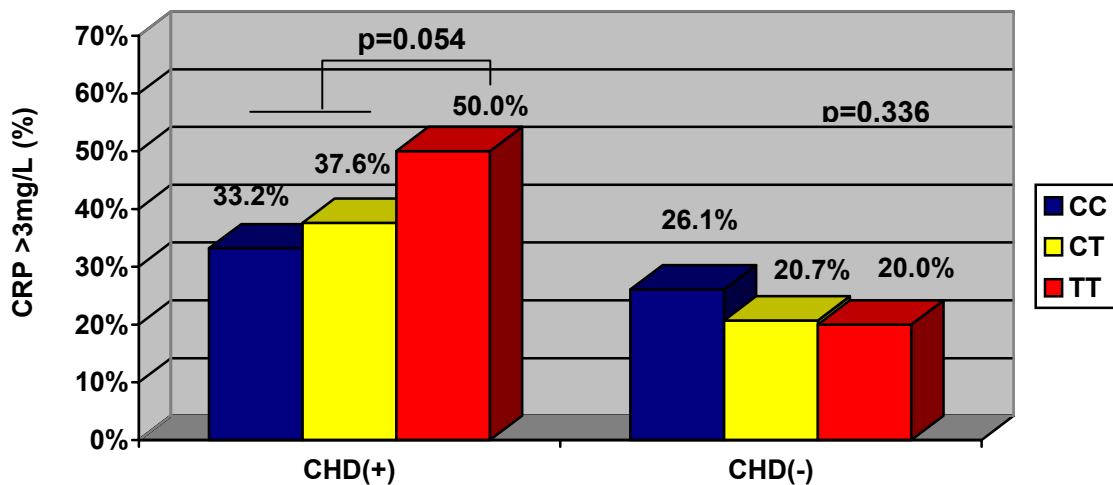
Extended analysis showed similar, but non-significant association of T allele with higher CRP levels as observed in pilot study, and supported recessive effect of the allele. Increased CRP levels (>3 mg/L) were more frequently found for TT genotype (46.3%) compared with CT (33.8%) and CC (32.2%) genotypes (p=0,075 in UVA and p=0,070 in MVA, respectively). When analysis was performed separately in patients with (n=513, 82.2%) and without (n=80, 12.8%) CHD, interaction of the SNP with CHD was found. In presence of CHD, TT genotype was associated with higher and more frequently increased (>3 mg/L) CRP levels, while inverse correlation of number of T alleles and CRP levels was seen in individuals without CHD (Chart 19 and 20). Distribution of genotypes in both groups is given in Table 11.

**Chart 19. Log-CRP in patients with (n=513) and without (n=80) CHD depending on IL-1B (+3954) genotype (MVA).\***



\* Corresponding re-transformed CRP values in patients with and without CHD, respectively: 1.71 mg/L, 1.70 mg/L, 2.26 mg/L and 1.54 mg/L, 0.97 mg/L, 0.66 mg/L.

**Chart 20. High CRP levels (>3 mg/L) in patients with (n=513) and without (n=80) CHD depending on IL-1B(+3954) genotype (MVA).**



**Table 11. Distribution of IL-1B (+3954) genotypes in patients with and without CHD.**

Genotype	Patients with CHD	Patients without CHD
CC	301 (58.7%)	46 (57.5%)
CT	178 (34.7%)	29 (36.2%)
TT	34 (6.6%)	5 (6.3%)

## 9. Discussion

The aim of the study was to determine whether IL genetic variations were associated with stable or unstable clinical course of CHD. Several additional analyses were performed as well.

As it can be concluded from the findings, among genetic variations analyzed in the study, IL-6 promoter region Hap\*1 (AG8/12C) was significantly associated with stable initial clinical course of CHD with recessive pattern. Homozygotes of Hap\*1 were almost two times more frequently found among patients with stable initial course without MI as opposed to those who developed MI within first year (30% and 16%, respectively; OR=2.41; p=0.027). Importantly, the same association was confirmed with other analysis that demonstrated less frequent cumulative incidence of myocardial infarctions during the first year in Hap\*1 homozygotes. To the best of our knowledge no such findings have been previously reported in the indexed literature.

The results indicate that in presence of IL-6 Hap\*1 inflammatory activity less frequently attains critical levels and therefore is associated with lower probability of atherosclerotic plaque destabilization and rupture, hence later development of acute coronary events. Interpretation of the main findings, however, merits more detailed discussion in the context of other results of this and other studies. Two major other findings of the study are associations of Hap\*1 with coronary artery occlusions and elevated CRP levels.

As the work was based on hypothesis that IL genetic variations are able to influence inflammatory activity and stability of atherosclerotic plaque, it would be expected that variations associated with higher CRP levels and coronary occlusions are associated also with unstable initial course of CHD. Yet, in case of Hap\*1 there were significant associations with higher CRP levels and more frequent coronary occlusions, but stable initial clinical course.

Effect of this haplotype on CRP levels has been minimally studied. There is only one small study in which haplotype AG8/12C was associated with non-significantly lower CRP levels in patients with acute stroke (n=34) and significantly lower in controls (n=21) (*Acalovschi et al.*, 2003). In other studies -174C allele has been found to have no association (*Burzotta et al.*, 2001; *Nauck et al.*, 2002; *Basso et al.*, 2002; *Eklund et al.*, 2003) or association with higher CRP levels (*Humphries et al.*, 2001; *Jenny et al.*, 2002; *Vickers et al.*, 2002), which consists with our data.

The likely explanation for increased CRP levels and lower risk of unstable course is the different effects of Hap\*1 on basal and induced expression of IL-6. It has been previously found *in vitro* that this haplotype determined higher basal transcription of IL-6 in ECV304 cells, but after stimulation with IL-1 expression increased to a lesser degree than with other haplotypes (*Terry et al.*, 2000). In another study, levels of IL-6 *in vivo* were lower for carriers of Hap\*1 among patients with stroke, and IL-6 transcription activity was reduced also after stimulation with adenosine analogue *in vitro* (*Acalovschi et al.*, 2003). Other studies in which only individual IL-6 polymorphisms or incomplete haplotypes were analyzed also have found similar associations. For instance, haplotype AGC (-596A, -572G and -174C) has been less

responsive to stimulation with LPS than other two haplotypes found in the study (Rivera-Chavez *et al.*, 2003). Although associations of IL-6 (-174) G/C with basal and stimulated expression have been contradictory, important observation further supporting weaker response to stimulation for this variation was finding that C allele has less affinity to a nuclear protein produced by monocytes stimulated by LPS (Rivera-Chavez *et al.*, 2003).

If extrapolated to atherosclerosis model, these data suggest that mechanism why Hap\*1 has beneficial effect on stable course of CHD is due to its lower responsiveness to factors that trigger IL-6 transcription compared to other common haplotypes. As a result, inflammatory reaction is less amplified and atherosclerotic plaque less prone to rupture. Since non-stimulated expression of IL-6 is higher with Hap\*1, increased basal levels of CRP can be expected, which was observed in our study. Likewise, such constantly elevated inflammatory activity may be a possible explanation for the non-significant trend of more frequent CHD in carriers of Hap\*1.

The significant association of Hap\*1 with coronary artery occlusions after MI goes in line with the same mechanism. As plaque rupture in presence of Hap\*1 occurs later, it is more likely to develop on the background of higher-degree stenosis. As demonstrated with smokers, effectiveness of spontaneous or drug-induced reperfusion is inversely related to non-thrombotic part of occlusion (Gottlieb *et al.*, 1996), hence persistent total occlusion is more frequently found after MI.

We did not find significant associations with MI risk in general, although mild effect cannot be excluded taking into account sample size. It is also possible that Hap\*1 slightly promotes CHD development, but as the first manifestation is more stable, effect on total risk of MI risk is relatively small.

#### Other variations

None of the other haplotypes or alleles was associated with initial clinical course. Several variations, however, were found to correlate with other clinical, angiographic or laboratory parameters as summarized in *Results* section.

#### ***Novelty and advantages of the study***

Compared to other published data, this work has several advantages.

1. So far there have been very few studies in which initial clinical course of CHD has been analyzed. Traditionally patients were compared for presence or absence of CHD, MI or coronary stenoses on angiography. Failure to take into account initial course of CHD may be one of the potential reasons for inconsistent findings. Moreover, to our knowledge there are no published studies in which genetic factors were analyzed in association with clinical course of CHD.
2. In spite of substantial number of studies performed on individual polymorphisms of IL-6, there are very few reports in which complete or incomplete haplotypes were analyzed as well (Terry *et al.*, 2000; Acalovschi *et al.*, 2003; Rivera-Chavez *et al.*, 2003; Kelberman *et al.*, 2004a). There are no published studies focusing on IL-6 haplotypes and risk or course of CHD. In addition, we analyzed genetic variations of three IL genes – IL-6, IL-1B and IL-1RN.
3. The study sample was larger (n=686) than in other IL-6 haplotype studies in which sample sizes ranged from 49 to 182 individuals (Terry *et al.*, 2000; Acalovschi *et al.*, 2003; Rivera-Chavez *et al.*, 2003; Kelberman *et al.*, 2004a).
4. Haplotypes were determined directly with sequencing in all 686 patients, and not reconstructed by software, which means that information on haplotypes in this study was highly accurate.

5. Very important is the observation that several significant associations (clinical course, coronary occlusion and CRP levels) were found for the same Hap\*1, and therefore possibility that statistically significant results were found by chance is very low. In addition, coronary angiography data were available for all patients, which allowed confirming CHD status objectively.
6. Results were adjusted for several non-genetic factors with multivariate analyses, which allowed minimizing potential bias of covariates.
7. Only patients with no previous revascularization were included in the study, as such interventions may interfere with the natural history of the disease.

#### ***Potential disadvantages of the study***

One of the potential caveats of the study is retrospective collection of information from the patients about their initial symptoms and timing until the first MI. In order to perform as accurate analysis as possible, only data of patients with clearly known initial course of CHD were included. It should be noted that in majority of patients history of CHD was not long (no more than 1 and 5 years for 50% and 85%, respectively). As for all retrospective and case-control studies, selection bias may occur, as patients cannot be included after a fatal event. Other factors affecting clinical course cannot be dismissed, such as threshold of pain perception or development of collaterals. Nevertheless, patients' history is the most important tool to judge about clinical course of CHD. It should also be recognized that prospective study could not be possible due to ethical reasons, because patients with first symptoms of CHD are typically referred for coronary angiography and revascularization that may influence course of CHD.

Control group of patients without CHD on angiography, is rather selective sample and should be interpreted cautiously as for some reason all of them had some symptoms resembling CHD. It should be stressed, however, that none of the main results are based on this subgroup.

#### ***Relevance and implications of the results***

The findings reinforce importance of two factors involved in pathogenesis and clinical course of CHD – inflammation and genetic predisposition. They will also help to understand pathogenetic and biomolecular mechanisms regulating inflammatory activity in atherosclerotic plaque, which may become targets for pharmaceutical agents.

Although for multifactorial disease such as CHD any novel genetic marker is likely to have little additive effect in risk estimation, these results indicate that IL-6 haplotypes are potentially perspective candidates for such implications. IL-6 is an important candidate gene that merits further investigations in other studies, which should include also other and larger populations.

It is also important that during this work (as a part of the Latvian Genome Pilot Project) for the first time large database with well-characterized CHD patients has been created in Latvia. The importance to take into account each population characteristics is underlined by an example of IL-6. In our sample Hap\*1 was more common (49.3%) than in any other study (33-43%; *Terry et al.*, 2000; *Acalovschi et al.*, 2003; *Kelberman et al.*, 2004a). IL-6 (-174) C allele was even more common (50.1%) than G allele in our population, while it was clearly the minor allele in all other studies (35%-41%; *Brull et al.*, 2001; *Basso et al.*, 2002; *Kelberman et al.*, 2004a). Unpublished data on 100 native Latvians suggest that it is a peculiarity of the Latvian population and not a selection bias.

In this context, another very important aspect is that significant associations are found for a very common genetic variation. In fact, 22.5% or every fifth individual of our sample were Hap\*1 homozygotes. It is known that genetic variations should be common or have strong effect in order to have substantial effect on multifactorial disease. As to the strength of associations, IL-6 Hap\*1 was the third strongest predictor of stable course of CHD (OR=2.41; p=0.027) after hypertension (OR=3.52; p=0.006) and female gender (OR=2.47; p=0.044). For combined MI and coronary artery occlusion criterion Hap\*1 was the second strongest predictor (OR=1.57; p=0.023) after smoking (OR=1.61; p=0.034). Hence, we have found an association for a variation that is both common and has also substantial effect on the clinical course.

### ***Future plans***

The database will be used for further research that will include genetic variations of IL and other candidate genes, as well as their interaction with risk factors and drug therapy. It is planned to perform a prospective follow-up study to test long-term effects on clinical endpoints. Some of other associations and interactions have been already reported (*Latkovskis et al., 2004c; Latkovskis et al., 2006; Latkovskis et al., 2005b*). The database will be used also for collaboration with other research groups within Latvian Genome Pilot Project.

## **10. Theses to defend.**

1. The most common haplotype AG8/12C (Hap\*1) of IL-6 promotes stable initial clinical course of CHD.
2. There are associations of IL-1B (+3954) C/T and IL-6 genetic variations with several clinical criteria.
3. There is a strong association between IL-6 haplotypes and coronary artery occlusions on angiography.
4. Genetic variations of IL-1B un IL-6 have effect on high sensitivity CRP levels.

## **11. Conclusions**

1. Haplotypes of IL-6 promoter influence initial clinical course of CHD. The most common haplotype Hap\*1 (AG8/12C) recessively promotes more stable initial clinical course of CHD and lower risk of MI within first year since onset of CHD symptoms.
2. IL-6 Hap\*1 has a neutral or mild enhancing effect on the total risk of CHD irrespective of the initial clinical course.
3. There are indications about association of other genetic variations with several clinical criteria:
  - i. IL-6 Hap\*3 (GG10/11G) is associated with less frequently found CHD on angiography (homozygotes).
  - ii. IL-6 Hap\*2 and IL-1B (+3954) T allele are associated with later first manifestation of CHD (homozygotes).
  - iii. IL-1B (+3954) T and IL-6 (-572) C alleles are associated with development of first MI at earlier and later age, respectively.
4. In homozygotes of IL-6 promoter Hap\*1 there are more common persistent total coronary artery occlusions after MI. It can be explained with development of coronary thrombosis on the background of higher-degree stenosis. There is also inverse correlation of Hap\*3 with coronary artery occlusions.
5. IL genetic variations have an effect on basal inflammatory activity as shown by association with CRP levels:

- i. The most prominent association is seen for IL-6 haplotypes – with higher CRP levels for Hap\*1 (with gene dose effect) and Hap\*6 (GG9/12G) in dominant way.
  - ii. IL-1B (+3954) T allele is associated with higher and lower CRP levels in patients with and without CHD, respectively.
6. Observations, that IL-6 Hap\*1 is associated with stable initial course of CHD and higher basal CRP levels, support previously postulated hypothesis of ambivalent effect of the haplotype on basal and induced inflammatory activity.
7. Results indicate that IL-6 promoter genetic variations affect inflammatory activity and are able to modulate evolution of coronary atherosclerosis and clinical course of CHD.

## 12. Literature

- Acalovschi, D., Wiest, T., Hartmann, M., Farahmi, M., Mansmann, U., Auffarth, G.U., Grau, A.J., Green, F.R., Grond-Ginsbach, C. & Schwaninger, M. (2003) Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke*, **34**, 8, 1864-9.
- De Backer, G., Ambrosioni, E., Borch-Johnsen, K., Brotons, C., Cifkova, R., Dallongeville, J., Ebrahim, S., Faergeman, O., Graham, I., Mancia, G., Cats, V.M., Orth-Gomer, K., Perk, J., Pyorala, K., Rodicio, J.L., Sans, S., Sansoy, V., Sechtem, U., Silber, S., Thomsen, T. & Wood, D.; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, **10**, 4, S1-S10.
- Basso, F., Lowe, G.D., Rumley, A., McMahon, A.D. & Humphries, S.E. (2002) Interleukin-6 -174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **22**, 4, 599-604.
- Bennet, A.M., Prince, J.A., Fei, G.Z., Lyrenas, L., Huang, Y., Wiman, B., Frostegard, J. & Faire, U. (2003) Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*, **171**, 2, 359-67.
- Brull, D.J., Montgomery, H.E., Sanders, J., Dhamrait, S., Luong, L., Rumley, A., Lowe, G.D. & Humphries, S.E. (2001) Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **21**, 9, 1458-63.
- Burzotta, F., Iacoviello, L., Di Castelnuovo, A., Gliuca, F., Luciani, N., Zamparelli, R., Schiavello, R., Donati, M.B., Maseri, A., Possati, G. & Andreotti, F. (2001) Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *American Journal of Cardiology*, **88**, 10, 1125-8.
- Chapman, C.M., Beilby, J.P., Humphries, S.E., Palmer, L.J., Thompson, P.L. & Hung, J. (2003) Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *European Heart Journal*, **24**, 16, 1494-9.
- Daly, L.E., Bourke, G.J. & McGilvray, J. (1991) *Interpretation and Uses of Medical Statistics*, 4th edition. Blackwell Science, Oxford.
- Eklund, C., Jahan, F., Pessi, T., Lehtimaki, T. & Hurme, M. (2003) Interleukin 1B gene polymorphism is associated with baseline C-reactive protein levels in healthy individuals. *European Cytokine Network*, **14**, 3, 168-71.
- Field, A. (2000) *Discovering Statistics Using SPSS for Windows*. SAGE Publications Ltd., London.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S. & Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1369-1376.
- Gibbons, R.J., Abrams, J., Chatterjee, K., Daley, J., Deedwania, P.C., Douglas, J.S., Ferguson, T.B. Jr, Fihn, S.D., Fraker, T.D. Jr, Gardin, J.M., O'Rourke, R.A., Pasternak, R.C., Williams, S.V., Gibbons, R.J., Alpert, J.S., Antman, E.M., Hiratzka, L.F., Fuster, V., Faxon, D.P., Gregoratos, G., Jacobs, A.K. & Smith, S.C. Jr. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina. (2003)

- ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Chronic Stable Angina—Summary Article: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina). *Circulation*, **107**, 149-158.
- Gottlieb, S., Boyko, V., Zahger, D., Balkin, J., Hod, H., Pelled, B., Stern, S. & Behar S. (1996) Smoking and prognosis after acute myocardial infarction in the thrombolytic era (Israeli Thrombolytic National Survey). *Journal of the American College of Cardiology*, **28**, 6, 1506-13.
- GraphPad Software. (2005). [Online]. Available from: <<http://www.graphpad.com/quickcalcs/chisquared1.cfm>> [July 2005]
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe, E. & Miller GJ. (2001) The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *European heart journal*, **22**, 24, 2219-20.
- Hurme, M. & Santtila S. (1998) IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *European Journal of immunology*, **28**, 8, 2598-602.
- Jones, K.G, Brull, D.J., Brown, L.C., Sian, M., Greenhalgh, R.M., Humphries, S.E. & Powell, J.T. (2001) Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, **103**, 18, 2260-5.
- Kelberman, D., Fife, M., Rockman, M.V., Brull, D.J., Woo, P. & Humphries, S.E. (2004a) Analysis of common IL-6 promoter SNP variants and the AnTn tract in humans and primates and effects on plasma IL-6 levels following coronary artery bypass graft surgery. *Biochimica et biophysica acta*, **1688**, 2, 160-7.
- Kelberman, D., Hawe, E., Luong LA, Mohamed-Ali, V., Lundman, P., Tornvall, P., Aillaud, M.F., Juhan-Vague, I., Yudkin JS, Margaglione, M., di Minno, G., Tremoli, E. & Humphries SE; HIFMECH study group. (2004b) Effect of Interleukin-6 promoter polymorphisms in survivors of myocardial infarction and matched controls in the North and South of Europe. The HIFMECH Study. *Thrombosis and haemostasis*, **92**, 5, 1122-8.
- Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*, **74**, 1–10.
- Komatsu, Y., Tai, H., Galicia, J.C., Shimada, Y., Endo, M., Akazawa, K., Yamazaki, K. & Yoshie H. (2005) Interleukin-6 (IL-6)--373 A9T11 allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue Antigens*, **65**, 1, 110-4.
- Latkovskis, G., Licis, N. & Kalnins U. (2004a) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European journal of immunogenetics*, **31**, 5, 207-13.
- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Berzina, L. & Kalnins, U. (2004b) Association of IL-1 beta (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 1, 85.
- Latkovskis, G., Licis, N., Berzina, M., Kreicburga, L. & Kalnins, U. (2004c) Association of IL-1B (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age interacts with hypercholesterolemia and family history of myocardial infarction [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 17-18.
- Latkovskis, G., Licis, N., Juhnevica, D., Berzina, M., Zabunova, M., Erglis, A. & Kalnins, U. (2005a) Haplotypes of promoter region in interleukin-6 gene and levels of C-reactive protein and fibrinogen [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 137.
- Latkovskis, G., Tretjakovs, P., Licis, N., Jurka, D., Juhnevica, D., Berzina, M., Kreicburga, L., Zabunova, M. & Kalnins, U. (2005b) Interleukin-6 (-174) G/C polymorphism and insulin resistance in patients with coronary heart disease [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **6**, 1, 58.
- Latkovskis, G., Licis, N., Zabunova, M., Berzina, M. & Erglis, A. (2006) Haplotypes of interleukin-6 promoter correlate with cholesterol levels in patients treated with statins [abstract]. *Atherosclerosis Supplements* [in print].
- Margaglione, M., Bossone A., Cappucci, G., Colaizzo, D., Grandone, E. & Di Minno, G. (2001) The effect of the interleukin-6 c/g-174 polymorphism and circulating interleukin-6 on fibrinogen plasma levels. *Haematologica*, **86**, 2, 199-204.
- Nauck, M., Winkelmann, B.R., Hoffmann, M.M., Bohm, B.O., Wieland, H. & Marz, W. (2002) The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *Journal of molecular medicine*, **80**, 8, 507-13.
- Pallant, J. (2001) *SPSS Survival Manual: A Step by Step Guide to Data Analysis Using SPSS for Windows (Version 10)* p.304. Open University Press, Buckingham.
- Petrie A. & Sabin C. (2000) *Medical statistics at a glance*. Blackwell Science, Oxford.



- Ridker, P.M. (2001) High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, **103**, 13, 1813-8.
- Rivera-Chavez, F.A., Peters-Hybki, D.L., Barber, R.C. & O'Keefe, G.E. (2003) Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock*, **20**, 3, 218-23.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, **340**, 115-126.
- Sans, S., Kesteloot, H. & Kromhout D. (1997) The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *European Heart Journal*, **18**, 1231-1248
- Santtila, S., Savinainen, K. & Hurme, M. (1998) Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scandinavian journal of immunology*, **47**, 3, 195-8.
- Terry, C.F., Loukaci, V. & Green FR. (2000) Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 24, 18138-44.
- Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howard, V.J., Rumsfeld, J., Manolio, T., Zheng, Z.J., Flegal, K., O'Donnell, C., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., Goff, D.C. Jr, Hong, Y., Adams, R., Friday, G., Furie, K., Gorelick, P., Kissela, B., Marler, J., Meigs, J., Roger, V., Sidney, S., Sorlie, P., Steinberger, J., Wasserthiel-Smoller, S., Wilson, M. & Wolf, P.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. **113**, 6, e85-151.
- von der Thusen, J.H., Kuiper, J., van Berkel, T.J. & Biessen, E.A. (2003) Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacological reviews*, **55**, 133-166.

### 13. Publications on the subject of the thesis

#### *Full publications in internationally indexed journals*

- Latkovskis, G.**, Licis, N. & Kalnins, U. (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European Journal of Immunogenetics*, **31**, 5, 207-213.

#### *Abstracts published in internationally indexed journals*

- Latkovskis, G.**, Licis, N., Berzina, M., Berzina, L. & Kalnins, U. (2004) Association of IL-1 beta (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 1, 85.
- Latkovskis, G.**, Licis, N., Berzina, M., Kreicburga, L. & Kalnins, U. (2004) Association of IL-1B (+3954) T allele with development of myocardial infarction in younger age interacts with hypercholesterolemia and family history of myocardial infarction [abstract]. (2004) *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 17-18.
- Erglis, A., Kalnins, U., Licis, N., Narbutė, I., Jegere, S. & **Latkovskis, G.** (2004) Interleukin-1 receptor gene polymorphism and neointimal proliferation in patients who underwent PCI with reduced barotraumas [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 12.
- Latkovskis, G.**, & Kalnins, U. (2004) Inflammation and atherosclerosis [abstract of the lecture]. *Atherosclerosis Supplements*, **5**, 4, 34-35.
- Latkovskis, G.**, Tretjakovs, P., Licis, N., Jurka, D., Juhnevicā, D., Berzina, M., Kreicburga, L., Zabunova, M. & Kalnins, U. (2005) Interleukin-6 (-174) G/C polymorphism and insulin resistance in patients with coronary heart disease [abstract]. *Atherosclerosis Supplements*, **6**, 1, 58.
- Latkovskis, G.**, Licis, N., Juhnevicā, D., Berzina, M., Zabunova, M., Erglis, A. & Kalnins, U. (2005) Haplotypes of promoter region in interleukin-6 gene and levels of C-reactive protein and fibrinogen [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 137.

- Erglis, A., Licis, N., Narbutė, I., Jegere, S. & **Latkovskis, G.** (2005) Interleukin-1 genes cluster polymorphisms and the degree of neointimal proliferation after percutaneous coronary intervention [abstract]. *European Heart Journal*, **26** (Abstract Supplement), 153.
- Latkovskis, G.**, Licis, N., Zabunova, M., Berzina, M. & Erglis, A. (2006) Haplotypes of interleukin-6 promoter correlate with cholesterol levels in patients treated with statins [abstract]. *Atherosclerosis Supplements* [in print].

***Abstracts published in other publications or proceedings of conferences.***

- Latkovskis G.**, Licis N., Kalnins U. Association of common polymorphisms of interleukin-1 genes with C-reactive protein levels in patients with coronary heart disease. 1<sup>st</sup> Baltic Cardiology Conference, Parnu, Estonia, September 18-19.
- Latkovskis G.**, Licis N., Kalnins U. C-reactive protein levels in relation to common polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-6 genes in patients with coronary heart disease. XIX Nordic Congress of Cardiology, Odense, Denmark. 04-06.06.2003.
- Latkovskis G.**, Licis N., Juhnēviča D., Berzina M., Kreicburga L., Zabunova M., Ērglis A., Kalnins U. Interleikīna-6 promotera haplotipu saistība ar C-reaktīvā proteīna un fibrinogēna līmeni. Latvijas Universitātes 63. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 11.02.2005.
- Latkovskis G.**, Treļjakovs P., Līcis N., Jurka D., Juhnēviča D., Berzina M., Kreicburga L., Zabunova M., Kalnins U. Interleikīna-6 (-174) G/C polimorfisms un insulīna rezistence adipoziem pacientiem ar koronāro sirds slimību. Latvijas Universitātes 63. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 11.02.2005.
- Latkovskis, G.**, Licis, N., Zabunova, M., Berzina, M., Juhneviča D. & Erglis, A. (2006) Association of interleukin-6 promoter haplotype with coronary artery occlusions [submitted abstract]. *Transcatheter Cardiovascular Therapeutics*, Washington, USA, October 22-27, 2006.

***Presentations at conferences and meetings in Latvia***

- Latkovskis G.**, Kalnins U., Līcis N. C-reaktīvā proteīna līmeņa saistība ar IL-1B un IL-1RA ģenētisko polimorfismu 160 pacientiem ar koronāro sirds slimību. Latvijas Universitātes 61. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 07.02.2003.
- Latkovskis G.**, Līcis N., Mača A., Kamzola G., Berzina M., Kalnins U. Ģenētisko un fenotipisko faktoru saistība ar miokarda infarkta attīstīšanos jaunākā vecumā. Latvijas Universitātes 62. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 06.02.2004.
- Latkovskis G.**, Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhnēviča D., Ērglis A. Interleikīna-6 promotera polimorfisma saistība ar koronāro artēriju oklūziju. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.
- Latkovskis G.**, Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhnēviča D., Ērglis A. Interleikīna-6 promotera polimorfismi un koronārās sirds slimības gaita. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.
- Latkovskis G.**, Līcis N., Zabunova M., Berzina M., Juhnēviča D., Ērglis A. Stafīnu interakcija ar interleikīna-6 promotera rajona polimorfismiem: ietekme uz lipīdu līmeni. Latvijas Universitātes 64. zinātniskās konferences tēzes. Rīga, 03.02.2006.