



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА

КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ“

Тихомир Руменов Рашев

**Промени в орексигенни и анорексигенни гени,
регулиращи енергийната хомеостаза и тяхната роля в
развитието на obeзитет и метаболитен синдром**

Автореферат

**на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „Доктор“**

**Научен ръководител:
Доц. Д-р Стефан Венелинов Трифонов, д.м**

**Плевен
2026**



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА

КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ“

Тихомир Руменов Рашев

Промени в орексигенни и анорексигенни гени, регулиращи енергийната хомеостаза и тяхната роля в развитието на obesity и метаболитен синдром

**Автореферат
на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „Доктор“**

**Докторска програма:
„Анатомия, хистология и цитология“**

**Научен ръководител:
Доц. Д-р Стефан Венелинов Трифонов, д.м**

**Плевен
2026**

Дисертационния труд съдържа 164 стандартни страници и е структурирана в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цели, Задачи и методични подходи, Резултати, Обсъждане на резултатите, Заключение, Изводи, Приноси, Бъдещи насоки за развитие. Работата е илюстрирана с 20 таблици, 34 фигури. Включени са 5 приложения.

Библиографския списък включва 298 литературни източника. Лабораторната работа и молекулярния анализ са извършени в катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, сектор „Анатомия, хистология и цитология“, факултет „Медицина“ при МУ-Плевен и Университетска лаборатория за научни изследвания при МУ-Плевен.

Във връзка с дисертационния труд са направени три пълнотекстови публикации и 3 научни съобщения на национални форуми.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за публична защита от разширен Катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, факултет „Медицина“, при МУ-Плевен проведен на 26.05.2026 год.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на.....отч. в зала.....при МУ-Плевен, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен и въз основа на Заповед на Ректора.....пред научно жури в състав:

Председател

Проф. д-р Стефан Сивков, д.м.

Членове:

Проф. д-р Иван Масларски, д.м.

Доц. д-р Стоян Павлов, д.м.

Доц. д-р Драгомир Дарданов, д.м.

Доц. д-р Армине Григорян, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Иван Масларски, д.м.

Доц. д-р Драгомир Дарданов, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на сайта на МУ-Плевен:

<http://www.mu-pleven.bg/index.php/bg/>

Използвани термини и терминология

T2DM – Type 2 diabetes mellitus (Диабет тип 2)
SNP-Single nucleotide polymorphisms (единични нуклеотидни полиморфизми)
PRDM16-PR/SET domain 16
PGC-1 α -Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
IRF4-Interferon regulatory factor 4
FGF21-Fibroblast growth factor 21
BMP7-Bone morphogenetic protein 7
PKA-Protein kinase A
UCP1-Uncoupling protein 1
AMPK-AMP-activated protein kinase
IL6-Интерлевкин-6
PAI-1-Plasminogen activator inhibitor-1
MetS-Metabolic syndrome
TNF- α -Tumor Necrosis Factor-Alpha
FFA-Free fatty acids
ASP-Stimulation acetylation proteins
VEGF-Vascular endothelial growth factor
IGF-1-Insulin-like growth factor-1
LEPR-Leptin receptor
Myf5-Myogenic factor 5
Ob-R, LR, DR, CD295, HuB219-Leptin receptor
JAKs-Janus kinase
STATs-Signal transducers and activators of transcription.
MC4-Melanocortin 4 receptor.
MT-II-Melanotan II
CAMKK-Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase
PP2C-Protein phosphatase 2C
LKB-also known as STK11 – serine/threonine kinase 11
CAMKK β -Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase β
SOCS3-Suppressor of cytokine signaling 3
PTP1B-Protein tyrosine phosphatase 1B
SH2 домен-Src homology 2 domain
POMC-Pro-opiomelanocortin
NPY-Neuropeptide Y
PTP1B-Protein tyrosine phosphatase 1B
UPR-Unfolded protein response
GnRH-Gonadotropin-releasing hormone
PRMT2-Protein arginine methyltransferase 2
Grb2-Growth factor receptor-bound protein 2
ERK1/2-Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
PI3K–Akt–FoxO1- phosphatidylinositol 3-kinase- serine/threonine kinase-forkhead box O1
IRS-Insulin receptor substrate
PDK1-3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PTEN-Phosphatase and tensin homolog
mTOR-Mammalian target of rapamycin
PDE3B-Phosphodiesterase 3BP

TP1B-Protein tyrosine phosphatase 1B
TCPTP-T-cell protein tyrosine phosphatase
LRP2-Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
LEPROT- Endospanin 1
RNF41-Ring finger protein 41
ADAM10-A Disintegrin and metalloproteinase 10
RPGRIP1L-Retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1-like
Xbp1s-spliced X-box binding protein 1
IKK β -NF κ B- I κ B kinase β - транскрипционен фактор (p65/p50)
GRP78-Glucose-regulated protein 78/шаперон
TLR4-Toll-like receptor 4
AdipoR1-Adiponectin receptor 1
AAPL1-Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper1
CART-cocaine- and amphetamine-regulated transcript
BMI-body mass index
TC-Total cholesterol
HDL-High-density lipoprotein
LDL-Low-density lipoprotein
FPG-Fasting plasma glucose
Hypertension-хипертония
SD – standard deviation
95% DI-confidence interval

Съдържание	
I. Въведение	8
II. Цели, задачи, материали и методи.....	10
1. Цели	10
2. Задачи	10
3. Материали и методи.....	11
3.1 Клиничен контингент – основни характеристики	11
3.2 Дефиниране на изследваните показатели	12
3.3 Артериална хипертония	12
3.4 Захарен диабет	12
3.5 Повишена кръвна захар на гладно.....	12
3.6 Затлъстяване.....	13
3.7 Генетични профили за носителството на следните полиморфизми:.....	13
3.8 Плазмена концентрация на липопротеини HDL-C и LDL-C	13
4. Методи	14
4.1. Документален и социологически метод	14
4.2. Клиничен метод.....	14
4.3. Лабораторни методи за биохимичен анализ на серумни показатели	14
4.4. Материали и методи за ДНК-анализ на генетичните варианти.....	14
5. Статистически методи.....	23
5.1 Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.	24
5.2 Вариационен анализ – изчисляване оценките на централната тенденция на разсейване.....	24
5.3 Графичен анализ – за визуализиране на получените резултати.	24
5.4 Алтернативен анализ – за сравняване на относителните дялове.	24
5.5 Точен тест на Фишер (Fisher) и тест χ^2 – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категориен и променлив.	24
5.6 Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.	24
5.7 Т-тест на Стюдънт (Student's test) – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.	24
5.8 Бинарна и мултиноминална логистична регресия – за количествена оценка на влиянието на изследваните фактори.....	24
III Резултати	24
1. Адипонектин.....	27
2. ЛЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР (LEPR)	31

3. ЛЕПТИН.....	41
IV.Обсъждане на резултатите	50
1.Адипонектин (ADIPOQ, rs266729).....	50
2. LEPR (rs1137101)	51
3. LEP (-2548G>A).....	51
V.Заклучение	62
VI.Изводи	63
VII.Приноси.....	64
1. Приноси с оригинален характер	64
2. Приноси с приложен характер.....	65
VIII. Бъдещи насоки и перспективи.....	66
IX.Публикации, участия в научни форуми и научен проект във връзка дисертационния труд.....	66
Приложение 1	67
Приложение 2А	69
Приложение 2В	70
Приложение 3	71
Приложение 4	74

I. Въведение

Затлъстяването и свързаните с него метаболитни нарушения представляват едно от най-сериозните предизвикателства пред съвременната медицина. През последните десетилетия се наблюдава тревожно нарастване на честотата му, особено в развитите страни, което води до увеличаване на заболяемостта от състояния, обединени в понятието метаболитен синдром. Този синдром включва инсулинова резистентност, захарен диабет тип 2 (T2DM), сърдечно-съдови и чернодробни заболявания. В основата на тези нарушения стои комплексно взаимодействие между генетични фактори, фактори на околната среда и нарушена регулация на енергийния баланс. Диабет тип 2 представлява доминиращата форма на диабет (90–95% от случаите) и се характеризира с широк спектър от метаболитни нарушения – от изразена инсулинова резистентност до дефекти в инсулиновата секреция. Нарастването на честотата на T2DM е тясно свързано с увеличаването на затлъстяването, което подчертава необходимостта от задълбочено изследване на патогенетичните механизми, свързващи тези състояния. Етиологията е мултифакторна, като геномните изследвания идентифицират редица гени, включително тези, кодиращи адипокини, като лептин и адипонектин, които играят ключова роля в метаболитната регулация.

В този контекст мастната тъкан се разглежда не просто като депо за енергия, а като активен ендокринен орган. Бялата мастна тъкан е най-големият ендокринен орган в човешкото тяло и секретира широк спектър от биологично активни молекули – адипокини, включително лептин, адипонектин, резистин, както и провъзпалителни цитокини като TNF- α и IL-6. Тези фактори участват в регулацията на апетита, енергийния разход, инсулиновата чувствителност, възпалителните процеси и съдовата функция. Адипозната тъкан комуникира с множество органи – черен дроб, скелетна мускулатура, панкреас и централната нервна система – чрез сложна мрежа от ендокринни, паракринни и аутокринни сигнали.

При затлъстяване настъпват значими структурни и функционални промени в мастната тъкан. Увеличаването на адипозната маса води до хипертрофия и хиперплазия на адипоцитите, съпроводени с инфилтрация на макрофаги и развитие на хронично нискостепенно възпаление. Това състояние се характеризира с повишена продукция на провъзпалителни цитокини и свободни мастни киселини, които нарушават инсулиновата сигнализация в периферните тъкани и допринасят за развитието на инсулинова резистентност.

Ключова роля в този процес играят адипокините. Лептинът, продуциран основно от адипоцитите, функционира като сигнал за енергийните запаси в организма и регулира апетита и енергийния разход чрез действие върху централната нервна система. При физиологични условия той потиска приема на храна и стимулира енергийния разход. При затлъстяване обаче се наблюдава лептинова резистентност – състояние, при което въпреки високите нива на циркулиращ лептин, неговият ефект е отслабен. Обратно, адипонектинът, който има инсулино-сенсibiliзиращи и противовъзпалителни свойства, е понижен при затлъстяване, което допълнително утежнява метаболитния дисбаланс.

Централно място в интеграцията на периферните метаболитни сигнали заема хипоталамусът – основен регулатор на енергийния баланс. Хипоталамичните ядра функционират като интеграционни центрове, които обработват сигнали от адипокини (лептин, адипонектин и др.), хормони (инсулин, грелин) и хранителни субстрати. Особено значение има аркуатното ядро (*nucleus arcuatus*), което съдържа две основни популации неврони: орексигенни (NPY/AgRP), стимулиращи апетита, и анорексигенни (POMC/CART), потискащи приема на храна. Балансът между тези две системи определя крайния ефект върху хранителното поведение.

Лептинът и инсулинът стимулират анорексигенните неврони и потискат орексигенните, докато грелинът има противоположен ефект. При затлъстяване лептиновата резистентност на ниво хипоталамус води до нарушена регулация на тези невронни мрежи, което поддържа повишен прием на храна и намален енергоразход. Освен аркуатното ядро, в регулацията на енергийния баланс участват и други хипоталамични структури, включително паравентрикуларното ядро (PVN), вентромедиалното ядро (VMN) и дорзомедиалното ядро (DMN), които формират сложна невронна мрежа, координираща метаболитните и поведенческите отговори.

Паравентрикуларното ядро интегрира сигналите от аркуатното ядро и участва в контрола на автономната нервна система и ендокринните функции. Вентромедиалното ядро се свързва с механизми на ситост, докато латералните хипоталамични области участват в стимулирането на хранителното поведение. Тези структури са взаимосвързани чрез невронни вериги, които осигуряват прецизна регулация на енергийния баланс.

В заключение, затлъстяването представлява резултат от сложни взаимодействия между периферни и централни механизми. Мастната тъкан като ендокринен орган и хипоталамусът като централен регулатор формират интегрирана система, контролираща енергийния баланс. Нарушенията в тази система, включително дисрегулация на

адипокините и хипоталамичната сигнализация, лежат в основата на развитието на инсулинова резистентност, T2DM и метаболитен синдром. Разбирането на тези механизми е от съществено значение за разработването на ефективни превантивни и терапевтични подходи.

II. Цели, задачи, материали и методи

1. Цели

- Да се оцени асоциацията между полиморфизмите *AdipoQ* rs266729, *LEPR* Q223R и полиморфизма в гена *LEP* с риска от затлъстяване, захарен диабет тип 2 (T2DM) и свързаните кардиометаболитни нарушения в етнически хомогенна популация от Северозападна България.
- Да се анализира разпределението на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми чрез сравнение между група пациенти с метаболитен синдром и контролна група от популацията на Северозападна България.

2. Задачи

- Да се извърши сравнителен анализ на антропометричните, клиничните и биохимичните показатели между пациентите с метаболитен синдром и контролната група.
- Да се анализира разпределението на генотипните и алелните честоти на полиморфизмите *AdipoQ* rs266729, *LEPR* Q223R и полиморфизма в гена *LEP* в изследваната и контролната група.
- Да се оцени асоциацията на полиморфизмите *AdipoQ* rs266729, *LEPR* Q223R и полиморфизма в гена *LEP* с риска от метаболитен синдром, затлъстяване, захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.
- Да се изследва влиянието на изследваните генетични полиморфизми върху показателите на въглехидратния и липидния метаболизъм чрез анализ на генотип–фенотипните взаимоотношения.
- Да се оцени наличието на алел-дозов ефект на рисковите алели върху основните метаболитни показатели.
- Да се определи относителният принос на генетичните полиморфизми и фенотипните характеристики при стратификацията на кардиометаболитния риск.

- Да се интегрират генетичните, клиничните и биохимичните данни с цел изясняване на ролята на *AdipoQ*, *LEPR* и *LEP* в патогенезата на метаболитния синдром и свързаните с него кардиометаболитни нарушения.

3. Материали и методи

3.1 Клиничен контингент – основни характеристики

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

Всички участници в проучването бяха предварително запознати с целите и методите му и подписаха информирано съгласие за провеждане на генетично и имунологично изследване (**Приложение 3 и 4**).

I група – контроли: 74 пациенти без избыток и диабет тип II (diabetes mellitus) и нормални серумни нива на глюкоза.

II група – таргетна: 82 пациенти

Критериите за подбора на контролната група I са:

- Възраст над 21 години;
- Липса на затлъстяване $BMI \leq 25$;
- Нормални серумни нива на глюкоза;
- Отсъствие на диабет тип II (diabetes mellitus);
- Нормално кръвно налягане;

Критериите за включване във II таргетна група са:

- Възраст над 21 години;
- Боди мас индекс над 25-30 ($BMI \geq 25; 30$);
- Завишени нива на глюкоза;
- Установен тип 2 диабет;
- Хипертония;
- Дислипидемия;

Критерии за изключване от проучването:

- Възраст под 18 години;
- Бременни жени, и жени 3 месеца пост-партум;
- Участници с тежки физиологични форми на затлъстяване;

- Участници с тежка форма на хипертония;
- Напреднало бъбречно заболяване (креатинин над 250 мкмол/л или хемодиализно лечение);
- Известни заболявания, свързани с нарушение на калциево-фосфорната обмяна (хиперпаратиреоидизъм, болест на Paget и др.);
- Отказ за подписване на Информирано съгласие.

Характеристика на изследвания контингент по демографски показатели:

От обхванатите общо 157 пациенти 82 (52.6%) мъже и 75 (47.4%) жени.

Средната възраст на изследваната група е 69.15 ± 0.87 години, в интервала между 35 и 85 години. Разпределението по възраст и пол едновременно е:

- Най-голям брой пациенти (35) при мъжете са от възрастовите групи 60-69 и 70-79 години, следвани от възрастовата група 50-59 години (7). Най-малко са във възрастовата група 90⁺ години (1);
- При жените най-много пациенти са от възрастова група 70-79 години (40), следвани от тези между 60-69 години (18). Най-малко (7) са от възрастова група 50-59 години, а във възрастова група 90⁺ години участници в проучването липсват.

3.2 Дефиниране на изследваните показатели

3.3 Артериална хипертония

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

3.4 Захарен диабет

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

3.5 Повишена кръвна захар на гладно

Включва пациенти с кръвна захар на гладно (след поне 8-часова хранителна пауза) > 5.6 mmol/l и < 7 mmol/l без анамнеза за захарен диабет.

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

3.6 Затлъстяване

Оценен качествено – спрямо body-mass индекса (BMI): като обезитетни са класифицирани пациенти с индекс на телесна маса $\geq 25 \text{ kg/m}^2$.

3.7 Генетични профили за носителството на следните полиморфизми:

- Полиморфизъм в гена (*db*) кодиращ лептиновия рецептор (LEPR) локализиран в chr1p31-LEPR Q223R (SNP rs1137101).

Носителите на SNP rs1137101 в кодон 223 кодиращ една от изоформите на лептиновия рецептор (OB-R) се обозначават като:

AA-генотип, хомозиготни носители на дивия алел.

AG- или GA-генотип, хетерозиготи по двата алела.

GG-генотип, хомозиготни носители на минорния алел.

- Полиморфизъм в гена (*ob*) кодиращ хормона лептин, локализиран в chr7q31.3-SNP rs12112075 (Leptin G-2548-A).

Носителите на SNP rs12112075 в гена кодиращ хормона лептин се обозначават като:

GG -генотип, хомозиготни носители на дивия алел.

AG- или GA-генотип, хетерозиготи по двата алела.

AA -генотип, хомозиготни носители на минорния алел.

- Полиморфизъм SNP rs266729 в промоторния регион на гена *AdipoQ* локализиран в chr3q27.

Носителите на SNP rs266729 се означават като:

CC -генотип, хомозиготни носители на дивия алел.

CG- или GC-генотип, хетерозиготи по двата алела.

GG -генотип, хомозиготни носители на минорния алел

3.8 Плазмена концентрация на липопротеини HDL-C и LDL-C

Използваната мерна единица е mmol/l.

На всички участници в проучването е взета периферна венозна кръв в отделен стандартен вакутейнер за биохимичен анализ. Плазмената концентрация е определена по ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) метода.

4. Методи

4.1. Документален и социологически метод

Анализ на документи: Подробно е изучена историята на заболяването и съпътстващите заболявания, отразени в придружаваща медицинска документация на пациентите (епикризи от болнични пролежавания, фишове с резултати от проведени изследвания и др.).

4.2. Клиничен метод

Анамнеза и клиничен статус – при всички пациенти. Снета е подробна анамнеза и физикален статус. При наличие на документи и/или клинични данни за захарен диабет и ожестет е събрана подробна информация за проява на заболяването.

4.3. Лабораторни методи за биохимичен анализ на серумни показатели

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

- Глюкоза – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни и завишени са приети серумни нива на глюкоза над 5.6 mmol/l.
- Общ холестерол – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на общия холестерол над 5.6 mmol/l.
- LDL-холестерол – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на LDL-холестерол над 3.4 mmol/l.
- HDL-холестерол – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумни нива на HDL-холестерол под 1.0 mmol/l.
- Триглицериди – отчетените стойности са в mmol/l. За абнормни са приети серумните нива на триглицеридите над 1.7 mmol/l.
- Креатинин – отчетените стойности са в mmol/l. Пациенти със серумен креатинин над 250 mmol/l не са включени в проучването.

4.4. Материали и методи за ДНК-анализ на генетичните варианти

Генетичните изследвания са извършени в Университетската лаборатория за научни изследвания, МУ-Плевен и включват следните етапи:

- Изолиране и съхранение на геномна ДНК на всички участници в изследването;
- Дизайн на високо специфични двойки праймери граничещи с полиморфния участък;

- In vitro тестване на създадените праймери и установяване на оптималната температура на хибридизация, чрез градиентен – PCR;
- Индиректен ДНК анализ-PCR-RLFP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms) анализ;
- Разделяне на продуктите на хоризонтална гел електрофореза.

Изолиране на генома човешка ДНК. Бяха използвани два метода за изолиране на генетичен материал, според количеството и качеството на изходния материал за изследването:

- комерсиални китове за ДНК изолиране – като се спазваше препоръчания протокол на производителя (QIAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, USA)

- Солево екстрахиране на ДНК от венозна кръв (ПРИЛОЖЕНИЕ 5)

Дизайна на двойките праймери беше осъществен с помощта на Primer3 дизайн софтуер. Участък от гените на изследваните полиморфизми с дължина 1000 нд.дв. беше взет от Национален център за биотехнологична информация на САЩ (National Center for Biotechnology Information – NCBI). По тези фрагменти създадохме съответните двойки праймери (Табл.1,2,3):

Табл. 1. Праймери за полиморфизъм в гена (*db*) кодиращ лептиновия рецептор (LEPR) SNPrs1137101.

Праймери за полиморфизъм в гена (<i>db</i>) кодиращ лептиновия рецептор (LEPR) SNPrs1137101	
Прав праймер	5'-GCTCTTATTTTCAATATAGGC-3'
Обратен праймер	5'-ATCATTACAGTGTTAAGCAAA-3'

Използваните праймери бяха закупени от Bioneer (Korea).

Табл. 2. Праймери за полиморфизъм в гена (*ob*) кодиращ хормона лептин (LEP), rs12112075.

Праймери за полиморфизъм в гена (<i>ob</i>) кодиращ хормона лептин (LEP), rs12112075	
Прав праймер	5'-TTTCCTGTAATTTCCCGTGAG -3'
Обратен праймер	5'-AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA -3'

Използваните праймери бяха закупени от Metabion International (Germany)

Табл. 3. Праймери за полиморфизъм rs266729 в гена на адипонектин *AdipoQ*.

Праймери за полиморфизъм rs266729 в гена на адипонектин <i>AdipoQ</i> .	
Прав праймер	5'-GGTGGACTTGACTTTACTGG -3'
Обратен праймер	5'-TAGAAGCAGCCTGGAGAA-3'

Използваните праймери бяха закупени от Metabion International (Germany)

Условия на *In vitro* тестване на праймерите и установяване на оптималните температури на хибридизация, чрез **градиентен PCR** (Табл.4):

- разреждане на изходната ДНК матрица до крайна работна концентрация до 5 ng/μL с измерена с NanoDrop™ One (ThermoScientific, USA).

Табл. 4. Условия за провеждане на градиентна полимеразна верижна реакция (PCR)

Компоненти на реакционната смес	Етапи на реакцията	Температура	Време на повторяемост на циклите	
1ml ДНК матрица 5 ng/μL	Начална денатурация	94°C	5 минути	
200 μM dNTPs	Денатурация	94°C	30 секунди	35 цикъла
0.3 μM of прав праймер	Градиентна хибридизация	45°C-65°C	30 секунди	
0.3 μM обратен праймер	Елонгация	72°C	45 секунди	
0.5 U и Hot Start Taq	Финална екстензия	72°C	5 минути	
Краен обем 20 μL				

За амплификацията беше използван: PCR thermal cycler-qTOWER3G (Analytik Jena, Germany); HotBegan TM Hot Start Taq (Canvax, Spain); Primers were purchased from: Metabion International (Germany)

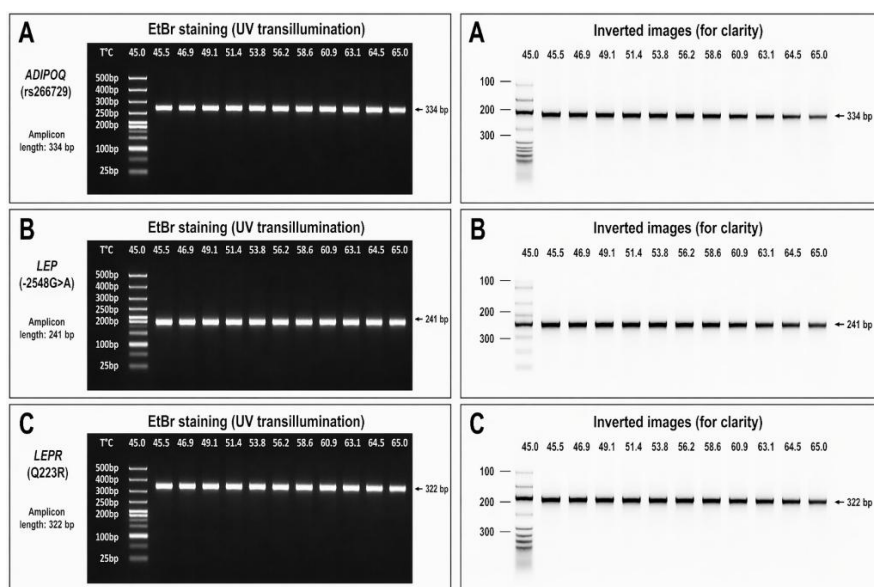
- приготвяне на реакционната среда: 0.3 μM концентрация на правия и обратен праймер, 200 μM dNTP (ThermoScientific, USA), 1.5 μM MgCl₂, and 0.5 U и термостабилна Hot Start Taq (Canvax, Spain), и 10 μM Tris-HCl, pH 7.4; Краен обем 20 μL

За амплификацията беше използван: qTOWER3G (Analytik Jena, Germany) PCR thermal cycler

- параметри на амплификация:

Начална денатурация за 5 min при 94°C, последвана от 35 цикъла на денатурация при 94°C за 30 s, хибридизация 45.0°C-65. °C за 45 s, екстензия при 7 °C, за 45 s, и крайна екстензия при 72°C за 5 min. Оптималната температура на хибридизация (annealing) беше избрана при задаване на градиент от 20°C с граници от 45 °C – 65 °C за 35 цикъла.

(Фиг.1)



Фиг. 1. Експериментална демонстрация на оптималната температура на хибридизация на с de novo създадените праймери разделена на хоризонтална гел електрофореза. (molecular weight Hyper Ladder 25 bp and 100bp-Bioline Germany).

Анализ на полиморфизми по дължината на рестрикционните фрагменти (RLFP) – техника за анализ на различията в дължините на рестрикционните фрагменти, дължащи се на унаследени изменения в ДНК нуклеотидните последователности, които създават или унищожават рестрикционно място за определен ензим (Приложение 6).

Условия на реакциите за трите полиморфизма:

- **полиморфизъм в гена (*db*) кодиращ лептиновия рецептор (LEPR) rs1137101:**
реакционна среда с краен обем 20 µL: 5 ng/µL DNA, 0.3 µM от правия и обратен праймер, 200 µM dNTP (ThermoScientific, USA), 1.5 µM MgCl₂, и 0.5 U термостабилна Taq DNA полимераза, и 10 µM Tris-HCl, pH 7.4.

параметрите на PCR реакцията: начална денатурация за 5 min at 94°C, 35 на денатурация при 94°C за 30 s, хибридизация на праймерите при 60.0°C за 45 s, екстензия при 72°C, за 45 s, и крайна екстензия при 72°C за 5 min.

Табл. 5. Компоненти и условия на PCR-реакцията за LEPR

Компоненти на реакционната смес	Етапи на PCR реакцията	Температура	Време на повторяемост на циклите	
1ml ДНК матрица 5 ng/ μ L	Начална денатурация	94°C	5 минути	
200 μ M dNTPs	Денатурация	94°C	30 секунди	35 цикъла
0.3 μ M of прав праймер	Специфична хибридизация	60°C	45секунди	
0.3 μ M обратен праймер	Елонгация	72°C	45 секунди	
0.5 U и Taq DNA	Финална екстензия	72°C	5 минути	
Краен обем 20 μ L				

За амплификацията беше използван: PCR thermal cycler-qTOWER3G (Analytik Jena, Germany); Праймерите са закупени от: Bioneer, (Korea); Taq DNA polymerase (ThermoScientific, USA); dNTP (ThermoScientific, Waltam, MA, USA).

Продукта на PCR амплификацията е 346 нд.дв. ампликон включващ изследвания полиморфен участък (Табл.5).

- **полиморфизъм в гена (*ob*) кодиращ хормона лептин (LEP) rs12112075:**

реакционна среда с краен обем 20 μ L: 5 ng/ μ L DNA, 0.3 μ M от правия и обратен праймер, 200 μ M dNTP (ThermoScientific, USA), 1.5 μ M MgCl₂, и 0.5 U термостабилна Taq DNA полимераза, и 10 μ M Tris-HCl, pH 7.4.

параметрите на PCR реакцията: начална денатурация за 5 min at 94°C, 35 на денатурация при 94°C за 30 s, хибридизация на праймерите при 52.0°C за 45 s, екстензия при 72°C, за 45 s, и крайна екстензия при 72°C за 5 min.

Табл.6. Компоненти и условия на PCR-реакцията за LEP

Компоненти на реакционната смес	Етапи на PCR реакцията	Температура	Време на повторяемост на циклите
1ml ДНК матрица 5 ng/ μ L	Начална денатурация	94°C	5 минути
200 μ M dNTPs	Денатурация	94°C	30 секунди
0.3 μ M of прав праймер	Специфична хибридизация	54°C	45секунди
0.3 μ M обратен праймер	Елонгация	72°C	45 секунди
0.5 U и Taq DNA	Финална екстензия	72°C	5 минути
Краен обем 20 μ L			

За амплификацията беше използван: PCR thermal cycler-qTOWER3G (Analytik Jena, Germany); Праймерите бяха закупени от: Bioneer, (Korea); Taq DNA polymerase (ThermoScientific, Waltham, MA, USA); dNTP (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) Продукта на PCR амплификацията е 241 нд.дв. ампликон включващ изследвания полиморфен участък (Табл.6).

- **полиморфизъм rs266729 в промоторния регион на гена адипонектин *AdipoQ*.**
реакционна среда с краен обем 20 μ L: 5 ng/ μ L DNA, 0.3 μ M от правия и обратен праймер, 200 μ M dNTP (ThermoScientific, USA), 1.5 μ M MgCl₂, и 0.5 U термостабилна Taq DNA полимераза, и 10 μ M Tris-HCl, pH 7.4.
параметрите на PCR реакцията: начална денатурация за 5 min at 94°C, 35 на денатурация при 94°C за 30 s, хибридизация на праймерите при 55.0°C за 45 s, екстензия при 72°C, за 45 s, и крайна екстензия при 72°C за 5 min.

Табл. 7. Компоненти и условия на PCR-реакцията за AdipoQ

Компоненти на реакционната смес	Етапи на PCR реакцията	Температура	Време на повторяемост на циклите
1ml ДНК матрица 5 ng/ μ L	Начална денатурация	94°C	5 минути

200 μM dNTPs	Денатурация	94°C	30 секунди	35 цикъла
0.3 μM of прав праймер	Специфична хибридизация	57°C	45секунди	
0.3 μM обратен праймер	Елонгация	72°C	45 секунди	
0.5 U и Taq DNA	Финална екстензия	72°C	5 минути	
Краен обем 20 μL				

За амплификацията беше използван: PCR thermal cycler-qTOWER3G (Analytik Jena, Germany); Праймерите бяха закупени от: Bioneer, (Korea); Taq DNA polymerase (ThermoScientific, Waltham, MA, USA); dNTP (ThermoScientific, Waltham, MA, USA)

Продукта на PCR амплификацията е 334 нд.дв. ампликон включващ изследвания полиморфен участък (Табл.7).

След размножаване на фрагментите, получените ампликоните бяха подложени на рестрикция с подбрани високо специфични рестриктазни ензими, съответно за:

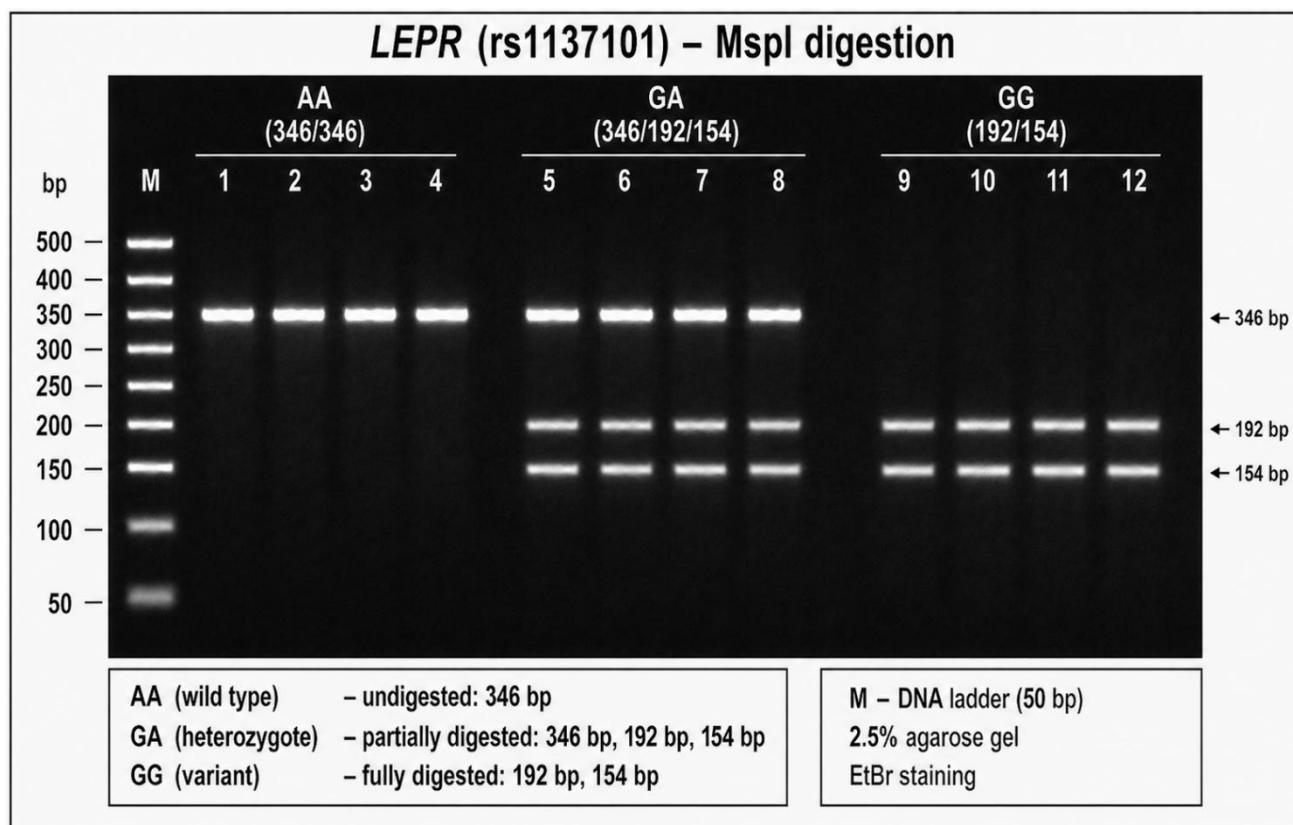
- **полиморфизма в гена на лептиновия рецептор (LEPR) rs1137101 (Фиг.2):**

MspI (Thermo Scientific, USA). Аликвоти от продуктите бяха инкубирани при 37°C с MspI рестрикционен ензим за 12 часа. Рестрикционните продукти за rs1137101 полиморфизма със съответните размери 192 нд.дв. и 154 нд.дв. продуктите на реакцията бяха визуализирани на хоризонтална агарозна гел електрофореза с концентрация 2.5% и етидиев бромид (Jena Analytik, Germany).

При носители на дивив алел (AA) се визуализира само една ивица на агарозния гел с дължина 346 нд.дв.

При носители и на двата алела, хетерозиготи (GA), се визуализират три ивици на агарозния гел със съответни дължини: 346 нд.дв., 192 нд.дв. и 154 нд.дв.

При носители на полиморфния алел (GG), хомозиготи се визуализират само две ивици на агарозния гел със дължини съответно: 192 нд.дв. и 154 нд.дв.



Фиг. 2. Визуализиране на продуктите на рестрикционната реакцията. *Панел А (AA генотип – wild type). Всички проби показват единствена лента ~346 bp; Панел Б (GA генотип – хетерозиготен). Във всяка проба се виждат три ленти: ~346 bp ~192 bp ~154 bp. Панел С (GG генотип – вариантен); Пробите показват две ленти: ~192 bp и ~154 bp; (molecular weight Hyper Ladder 50 bp -Bioline Germany)*

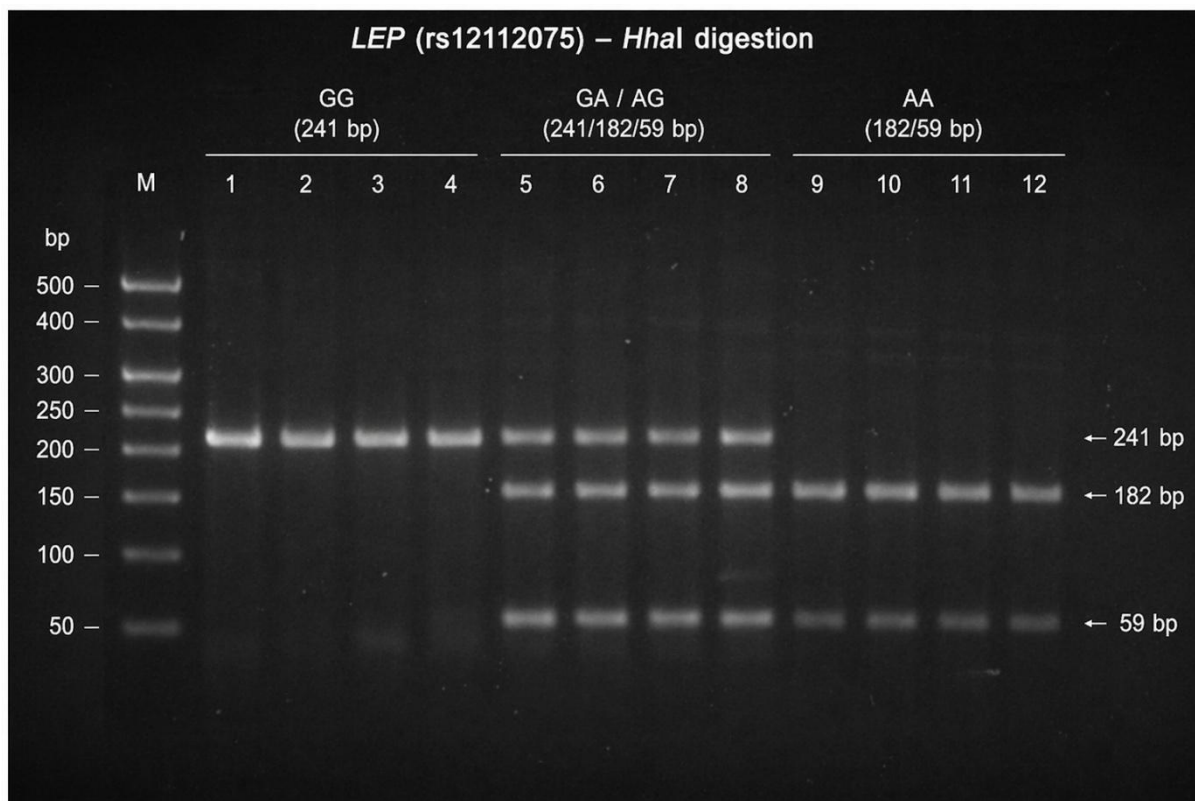
- **полиморфизъм в гена (*ob*) кодиращ хормона лептин (LEP) rs12112075 (Фиг.3):**

HhaI (Thermo Scientific, USA). Аликвоти от продуктите бяха инкубирани при 37°C с HhaI рестрикционен ензим за 12 часа. Рестрикционните продукти за rs12112075 полиморфизма със съответните размери 182 нд.дв. и 59 нд.дв. продуктите на реакцията бяха визуализирани на хоризонтална агарозна гел електрофореза с концентрация 2.5% и етидиев бромид (Jena Analytik, Germany).

При носители на дивив алел (GG) се визуализира само една ивица на агарозния гел с дължина 241 нд.дв.

При носители и на двата алела, хетерозиготи (GA,AG), се визуализират три ивици на агарозния гел със съответни дължини: 241 нд.дв., 182 нд.дв. и 59 нд.дв.

При носители на полиморфния алел (AA), хомозиготи се визуализират само две ивици на агарозния гел със дължини съответно: 182 нд.дв. и 59 нд.дв.



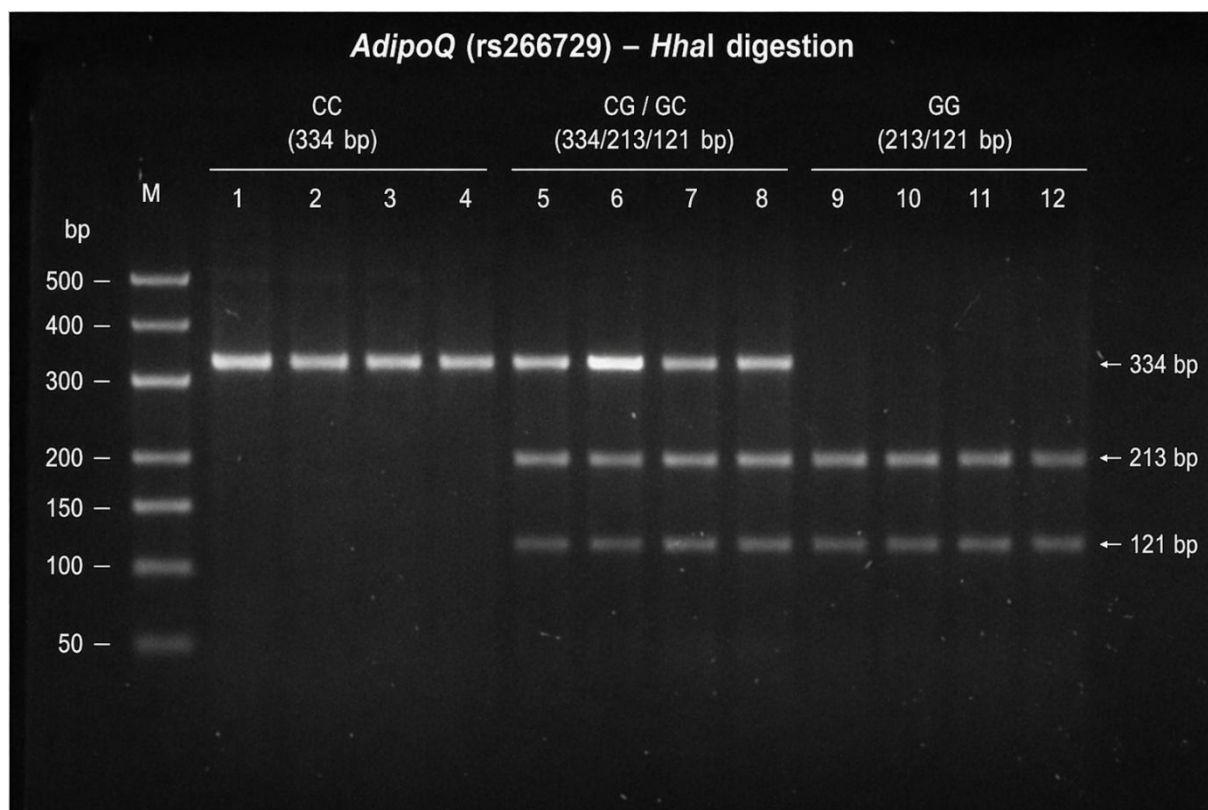
Фиг. 3. Визуализиране на продуктите на рестрикционната реакцията. Панел А (GG генотип – wild type). Всички проби показват единствена лента ~241 bp; Панел Б (AG генотип – хетерозиготен). Във всяка проба се виждат три ленти: ~241 bp ~182 bp ~59bp. Панел С (GG генотип – вариантен); Пробите показват две ленти: ~182 bp и ~59 bp (molecular weight Hyper Ladder 50 bp -Bioline Germany)

- **полиморфизъм rs266729 в промоторния регион на гена адипонектин *AdipoQ***
(Фиг.4):

HhaI (Thermo Scientific, USA). Аликвоти от продуктите бяха инкубирани при 37°C с HhaI рестрикционен ензим за 12 часа. Рестрикционните продукти за *AdipoQ* rs266729 полиморфизма със съответните размери 213 нд.дв. и 121 нд.дв. продуктите на реакцията бяха визуализирани на хоризонтална агарозна гел електрофореза с концентрация 2.5% и етидиев бромид (Jena Analytik, Germany).

При носители на дивив алел (CC) се визуализира само една ивица на агарозния гел с дължина 334 нд.дв. При носители и на двата алела, хетерозиготи (CG,GC), се визуализират три ивици на агарозния гел със съответни дължини: 334 нд.дв., 213 нд.дв.

и 121 нд.дв. При носители на полиморфния алел (GG), хомозиготи се визуализират само две ивици на агарозния гел със дължини съответно: 213 нд.дв. и 121 нд.дв.



Фиг. 4. Визуализиране на продуктите на рестрикционната реакция за полиморфизма rs166729: Панел А (CC генотип – wild type). Всички проби показват единствена лента ~334 bp; Панел Б (CG генотип – хетерозиготен). Във всяка проба се виждат три ленти: ~334 bp ~213 bp ~121 bp. Панел С (GG генотип – вариантен); Пробите показват две ленти: ~213 bp и ~121 bp (molecular weight Hyper Ladder 50 bp - Bioline Germany)

5. Статистически методи

Получените резултати на всичките 157 участници в проучването са систематизирани в екселска таблица включваща следните показатели за анализ:

- Демографски показатели: пол, възраст, възрастова група;
- Артериална хипертония;
- Захарен диабет;
- Затлъстяване;
- Хронично бъбречно заболяване;
- Предшестваща статин-терапия;
- Кръвна глюкоза;

- Липиден профил;
- Креатинин;
- Генетичен профил за SNP rs113710;
- Генетичен профил за SNP rs12112075;
- Генетичен профил за SNP rs266729.

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

Бяха приложени следните статистически методи:

5.1 Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

5.2 Вариационен анализ – изчисляване оценките на централната тенденция на разсейване.

5.3 Графичен анализ – за визуализиране на получените резултати.

5.4 Алтернативен анализ – за сравняване на относителните дялове.

5.5 Точен тест на Фишер (Fisher) и тест χ^2 – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категориен променлив.

5.6 Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

5.7 Т-тест на Стюдънт (Student's test) – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

5.8 Бинарна и мултиноминална логистична регресия – за количествена оценка на влиянието на изследваните фактори.

Сравняването на пропорциите между групите пациенти е осъществено с χ^2 -теста. Интервалните променливи са представени като средна стойност (стандартно отклонение) или медиана (25-75 персентил) в зависимост от типа на разпределение на данните. Значимостта на разликите между групите при нормално разпределените данни е установена със Student's test и one way ANOVA. За праг на статистическа значимост е разглеждана стойността $p < 0.05$.

III Резултати

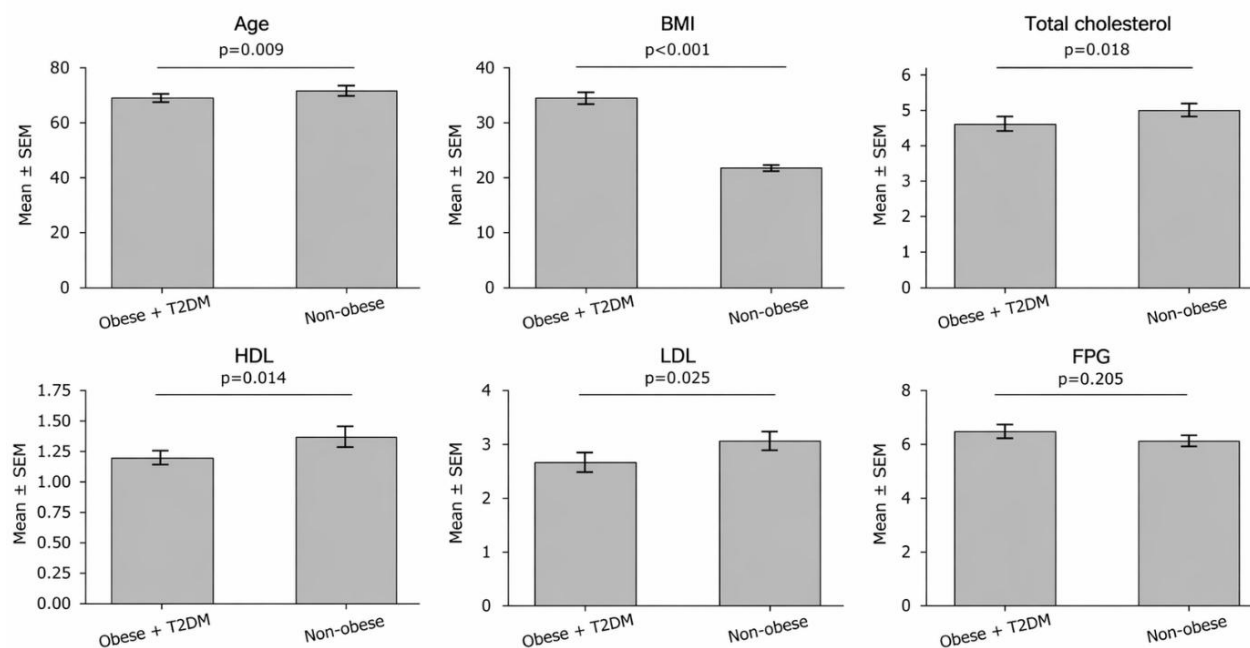
Табл. 8. Антропометрични и биохимични характеристики на obese и non-obese индивиди.

Phenotypic data	Obese and T2DM	Non-obese	p-value
	(n=82)	(n=74)	
Age (years)	69.15 ± 0.87	72.35 ± 0.84	0.009

BMI (kg/m ²)	34.23 ± 0.21	22.42 ± 0.15	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.55 ± 0.15	5.05 ± 0.15	0.018
HDL (mmol/L)	1.22 ± 0.05	1.38 ± 0.03	0.014
LDL (mmol/L)	2.61 ± 0.12	3.02 ± 0.13	0.025
FPG (mmol/L)	6.58 ± 0.26	6.16 ± 0.20	0.205
Hypertension (%)	47.4	21.8	<0.001
Diabetes Mellitus (%)	26.3	10.9	<0.001

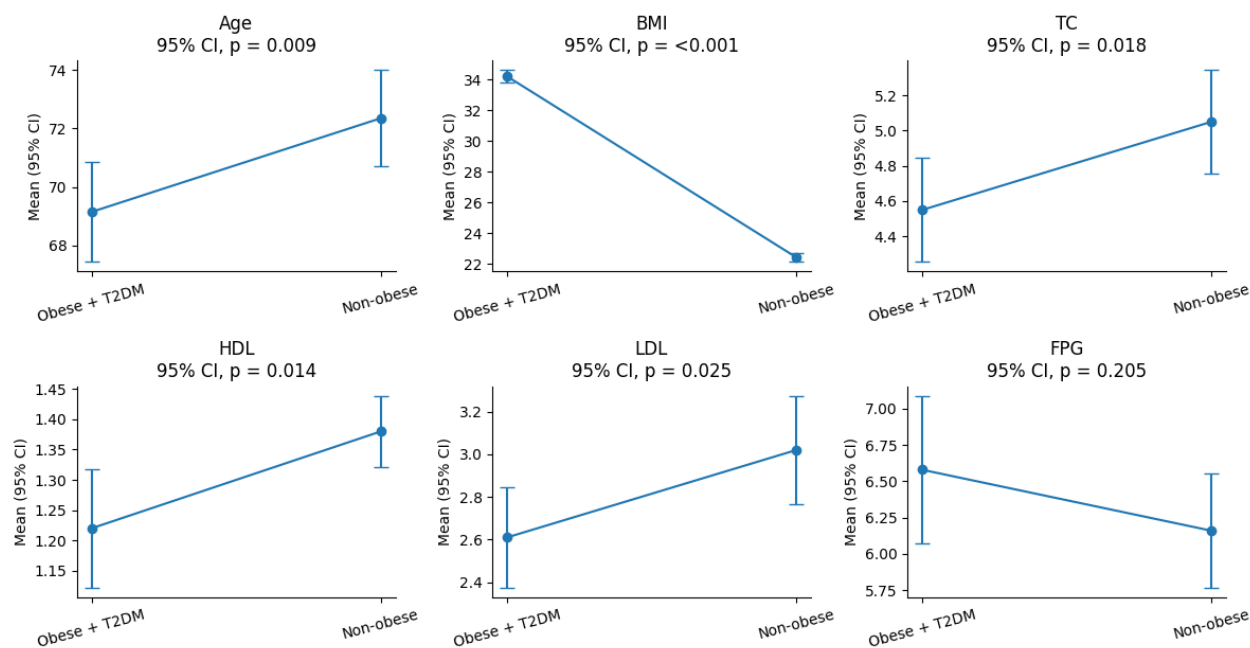
Броят на индивидите е посочен в скоби. Непрекъснатите променливи са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD) и са сравнени чрез *t*-тест; категориалните променливи са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест. Преди анализа е извършена натурално-логаритмична трансформация на данните. Стойности на $p < 0.005$ се считат за статистически значими. BMI – индекс на телесна маса; TC – общ холестерол; HDL – липопротеин с висока плътност; LDL – липопротеин с ниска плътност; FPG – глюкоза на гладно в плазмата

Дизайна на проучването и популацията включва 156 индивида, които бяха разделени на две групи обездитетни $n=82$ (BMI ≥ 25) и не-обездитетни контроли $n=74$, във възрастов диапазон между 35-85 години, като Северно Българската кохорта е етнически хомогенна (Табл.8). При този таргет-контрола дизайн е подходящ за асоциативна не козална връзка.



Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant.

Фиг.5. Фенотипна характеристика на обезитетните и T2DM индивиди и контролната група. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SEM за затлъстели със 3Д тип 2 и незатлъстели индивиди. Статистическата значимост е означена с p -стойности. GraphPad Prism.



Фиг. 6. Фенотипни параметри сред изследваната група (95%CI). Данните са представени като средна стойност $\pm$ 95% доверителен интервал (CI) за затлъстели със захарен диабет тип 2 и незатлъстели индивиди. Разликите между групите са оценени чрез p -стойности, посочени за всеки показател, използвана One-way ANOVA

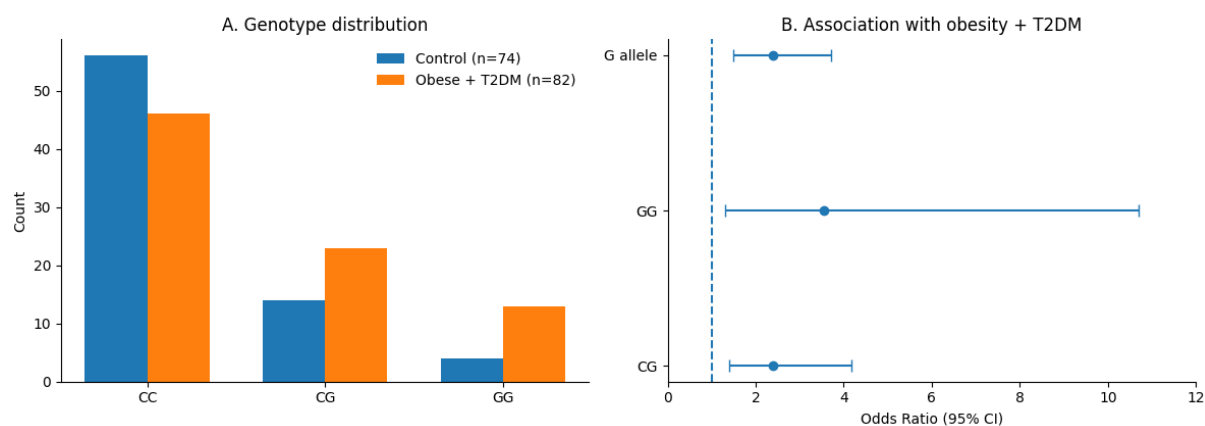
В таблицата са показани ключови за изследването фенотипни/клинични показатели. Значителни различия в показатели като завишен общ холестерол, LDL, хипертензия, тип 2 диабет и BMI и понижен HDL холестерол е както се очаква, но не се наблюдава сигнификантна разлика в нивата на глюкоза на гладно между двете групи ($p = 0.205$). Метаболитния профил съответства на състоянието метаболитен синдром, забележимото отсъствие на разликата в нивата на FPG допуска или ранен стадий на дисгликемия или хетерогенност в тежестта на диабета. Всичко това допълнително показва важността на генетично изследване и анализ т. к. фенотипа сам по себе си не е напълно дискриминативен (Фиг5,6).

1. Адипонектин

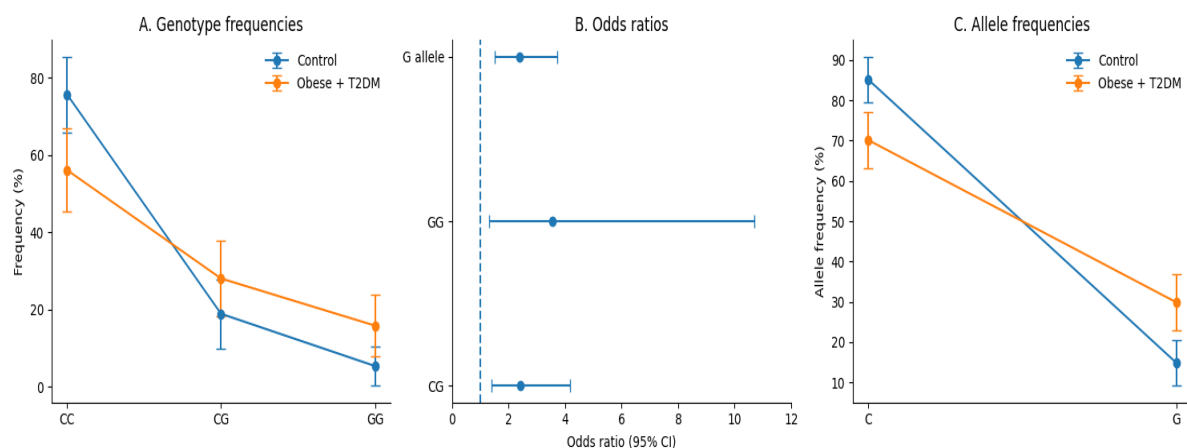
Табл. 9. Генотипна и алелна честота на rs266729 полиморфизма на адипонектиновия ген и връзката на този вариант с T2DM при изследваните индивиди.

Genotype rs266729 (C/G)	Control n=74	Obese, T2DM=82	Unjustified (95%CI) <i>p</i> value	OR Adjusted OR for age and BMI (95%CI) <i>p</i> value
CC	56 (75%)	46 (56%)	Reference	
CG	14 (19%)	23 (28%)	2.40 (1.4-4.18) 0.002	2.30 (1.40-4.22) 0.001
GG	4 (6%)	13 (16%)	3.55 (1.30-10.70) 0.01	3.62 (1.28-10.70) 0.01
Frequency of G allele	22 (15%)	49 (30%)	2.39 (1.50-3.72) 0.001	

Таблица 9. Данните са представени като брой случаи, като честотите са посочени в скоби. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест. Съотношенията на шансовете (OR) и 95% доверителните интервали (95% CI) са изчислени за оценка на силата на асоциацията. OR – съотношение на шансовете (odds ratio); CI – доверителен интервал.



Фиг. 7. Генотипен асоциативен анализ на полиморфизма **ADIPOQ rs266729** при затлъстяване и захарен диабет тип 2 (GraphPad Prism). **(А)** Разпределение на генотипите CC, CG и GG в контролната група и групата със затлъстяване и захарен диабет тип 2. **(Б)** Съотношения на шансовете (odds ratios, OR) с 95% доверителни интервали (95% CI) за генотипите CG и GG, както и за G алела, спрямо референтния генотип CC. Пунктираната вертикална линия обозначава OR = 1. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест, а OR и 95% CI са изчислени с помощта на **GraphPad Prism**.



Фиг. 8. Асоциация между генотипа **ADIPOQ rs266729** и алелните честоти при затлъстяване и захарен диабет тип 2. **(А)** Генотипни честоти (%) на генотипите CC, CG и GG в контролната група и групата със затлъстяване и захарен диабет тип 2. **(В)** Съотношения на шансовете (odds ratios, OR) с 95% доверителни интервали (95% CI) за генотипите CG и GG, както и за G алела, спрямо референтния генотип CC. Пунктираната вертикална линия обозначава OR = 1. **(С)** Алелни честоти (%) на алелите C и G в двете изследвани групи. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест, а OR и 95% CI са изчислени с помощта на **GraphPad Prism**.

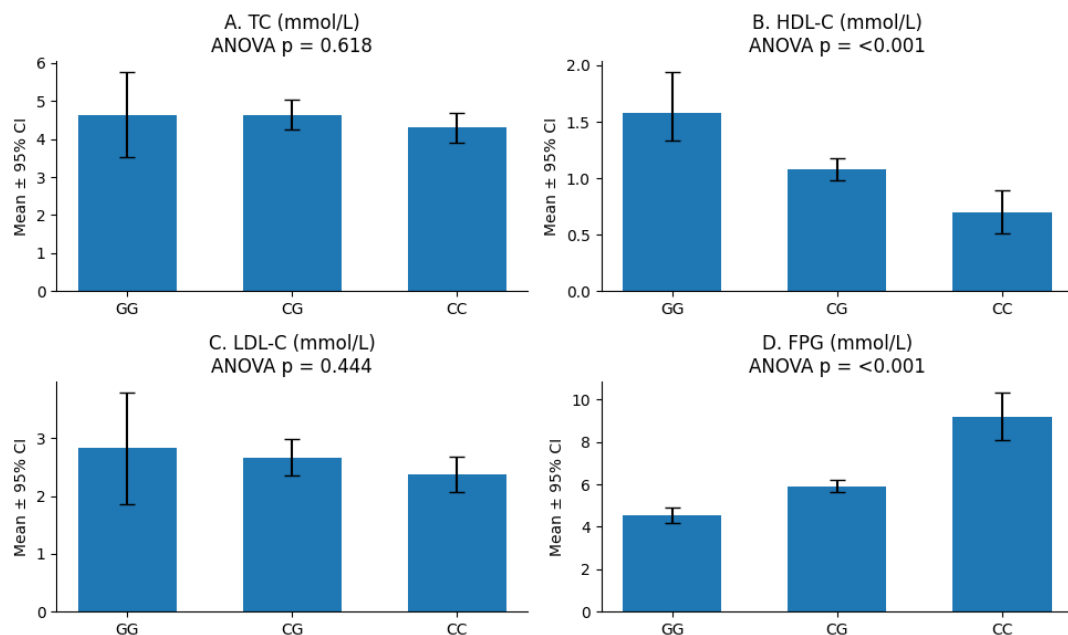
Генотипна асоциация с полиморфизма rs266729 (Табл.9): GG-генотип (хомозиготен полиморфен вариант) GC-генотип (хетерозиготен полиморфен вариант), CC-генотип (хомозиготен див тип). При генетичния анализ основните генетични находки са по-висока честота на G-алела в obese и T2DM индивиди ($p=0.001$). И двата генотипа GG и CG са сигнификантно асоциирани с obesity и T2DM.

Преценка на риска показва, че при генотип GG риска от повишени нива на FPG е около 3 пъти по-висок спрямо контролата, а CG генотипа повишава вероятността около два пъти. Резултатите показват дозово зависим генетичен ефект: CC (контрол)< CG <GG (Фиг7,8);

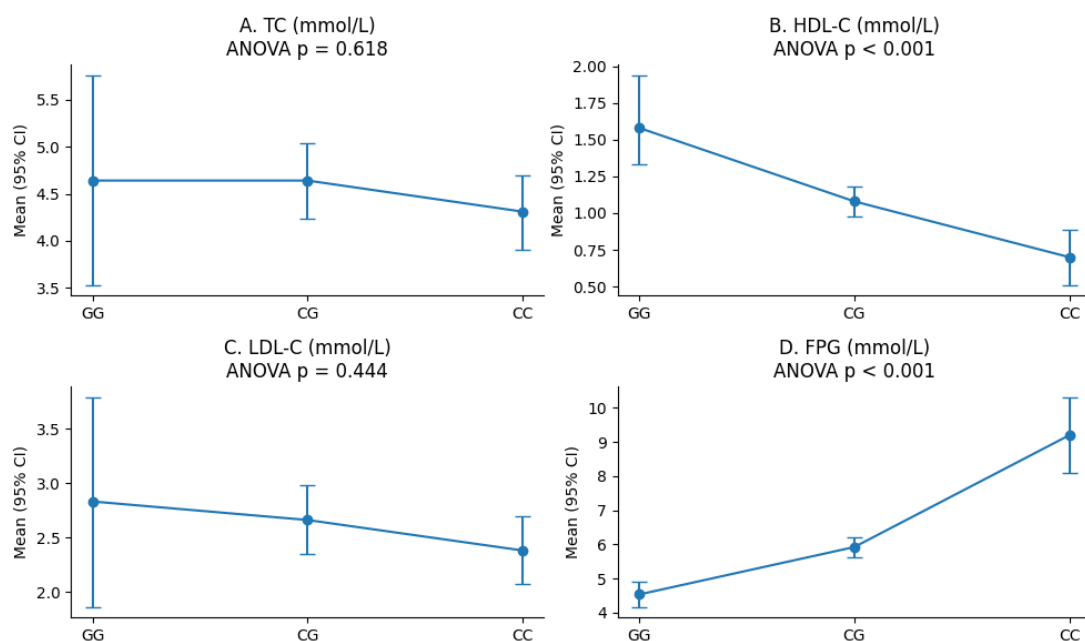
Табл. 10. Асоциация на *AdipoQ* rs266729 с метаболитни параметри при obese (BMI>30kgm²) и T2DM на изследваната група.

Parameter	Genotype	Mean $\pm$ SE	95% CI for mean	ANOVA <i>p</i> -value
TC (mmol/L)	GG	4.64 $\pm$ 0.52	3.53-5.76	0.618
	CG	4.64 $\pm$ 0.20	4.24-5.04	
	CC	4.31 $\pm$ 0.19	3.91-4.70	
HDL-C (mmol/L)	GG	1.58 $\pm$ 0.16	1.33-1.94	<0.001
	CG	1.08 $\pm$ 0.07	0.98-1.18	
	CC	0.70 $\pm$ 0.07	0.51-0.23	
LDL-C (mmol/L)	GG	2.83 $\pm$ 0.45	1.86-3.79	0.444
	CG	2.66 $\pm$ 0.16	2.35-2.98	
	CC	2.38 $\pm$ 0.15	2.07-2.69	
FPG (mmol/L)	GG	4.53 $\pm$ 0.17	4.16-4.89	<0.001
	CG	5.92 $\pm$ 0.15	5.62-6.22	
	CC	9.20 $\pm$ 0.54	8.08-10.32	

Table 10. Data are presented as mean $\pm$ SD. TC, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein cholesterol; LDL, low density lipoprotein cholesterol; FPG, fasting plasma glucose; CI, confidence interval. Използван статистически анализ One-way ANOVA



Фиг. 17. Биохимични показатели при генотипите GG, CG и CC на полиморфизма **ADIPOQ rs266729**, представени като средна стойност с 95% доверителен интервал (95% CI). **(A)** Общ холестерол (TC), **(B)** HDL-холестерол (HDL-C), **(C)** LDL-холестерол (LDL-C) и **(D)** плазмена глюкоза на гладно (FPG). Разликите между генотипните групи са оценени чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA). Не се установяват статистически значими различия за TC ($p = 0.618$) и LDL-C ($p = 0.444$), докато HDL-C и FPG показват статистически значими различия между генотипните групи ($p < 0.001$).



Фиг. 10. Точкови графики с грешки и свързани средни стойности, представящи биохимичните показатели при различните генотипове на полиморфизма **ADIPOQ rs266729**. Многопанелните графики илюстрират средните стойности на общия холестерол (TC), HDL-холестерола (HDL-C), LDL-холестерола (LDL-C) и плазмената глюкоза на гладно (FPG) при генотипите GG, CG и CC. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SE). Разликите между генотипните групи са оценени чрез **еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA)**.

При анализа на биохимичните маркери се наблюдава значителна асоциация на rs266729 генотипа и нивата на FPG (глюкозните нива) и HDL холестерола ($p = 0.001$), като няма такава с общите нива на холестерола (TC) и LDL холестерола (Табл10). Интерпретацията на тези данни позволява да допуснем участието на полиморфизма в глюкозния метаболизъм и протективната липидна фракция (HDL), но не и в общия липиден метаболизъм. Всичко това е в съответствие с известните функции на адипонектина:

- Инсулинова чувствителност;
- Противовъзпалителна и анти-атеросклеротична роля.

Тези резултати са в подкрепа на следното: rs266729 (G алела) $\rightarrow$ променя адипонектиновата експресия, което понижава инсулиновата секреция увеличава нивата на FPG понижава нивата на HDL $\rightarrow$ увеличава риска от T2DM и метаболитен синдром, което е в съответствие с познатата му физиология – адипонектина е незаменимо свързан с obesity и инсулиновата резистентност (Фиг.9,10)

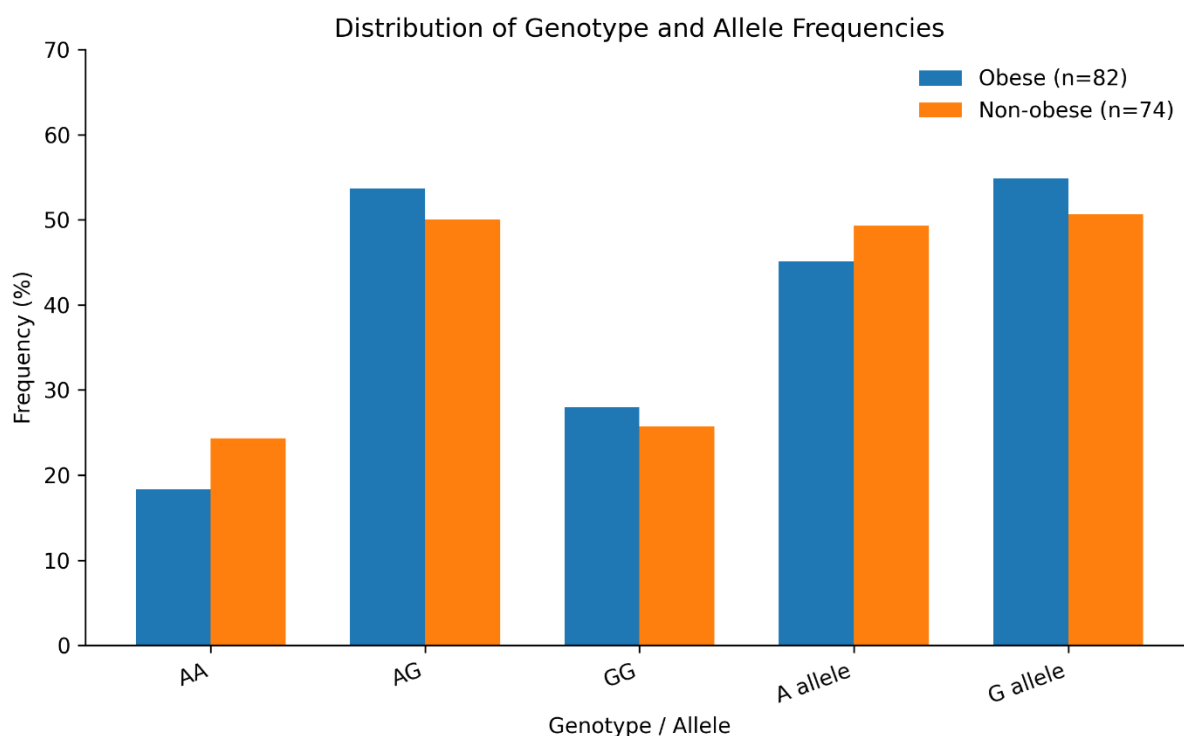
2. ЛЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР (LEPR)

Табл. 11 Генотипно разпределение и алелна честота на **LEPR Q223R** полиморфизма в двете групи.

Genotype	Obese (n=82)	Non-obese (n=74)	OR (CI)	p-value
AA	15 (18.3 %)	18 (24.3 %)	0.697 (0.322-1.507)	0.358
AG	44 (53.7 %)	37 (50 %)	1.158 (0.617-2.173)	0.648
GG	23 (28 %)	19 (25.7 %)	1.128 (0.555-2.295)	0.739
A	74 (45.1 %)	73 (49.3 %)		
G	90 (54.9 %)	75 (50.7 %)		

Таблица 11. Данните са представени като брой случаи, като честотите са посочени в скоби. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест. Съотношенията на шансовете (OR) и 95% доверителните интервали (95% CI) са изчислени чрез логистична регресия. OR – съотношение на шансовете (odds ratio); CI – доверителен интервал.

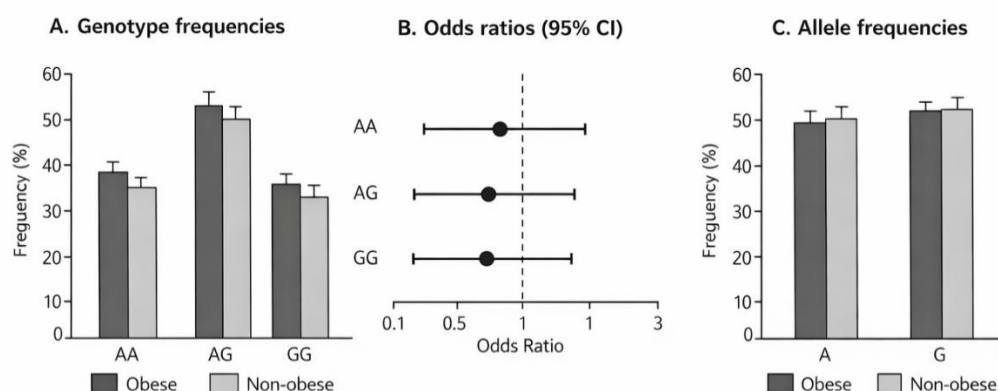
Представените в таблица 11 данни обобщават разпределението на генотипите и алелната честота на *LEPR Q223R* при затлъстели и незатлъстели индивиди, заедно със съответните коефициенти OR, CI и *p*-стойности, оценяващи статистическата значимост на резултатите. Честотата на генотипите показва, че генотипът AA се наблюдава при 18.3% от затлъстелите индивиди и при 24.3% от не затлъстелите лица. Изчисленият коефициент на (OR = 0.697; 95% CI: 0.322–1.507) предполага по-ниска вероятност за затлъстяване при носителите на този генотип, но тази асоциация не е статистически значима (*p* = 0.358). Следователно не може да се направи категоричен извод за протективен или рисков ефект на генотипа AA.



Фиг. 11. Разпределение на генотипните и алелните честоти на изследвания полиморфизъм. Представени са честотите (%) на генотипите (AA, AG и GG) и алелите (A и G) при затлъстели и незатлъстели индивиди. Данните са представени като процентни честоти (%). Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест. Статистическият анализ и графичното представяне са извършени с помощта на **GraphPad Prism**.

Генотипът AG е най-често срещаният и в двете групи, като се установява при 53.7% от затлъстелите и 50% от контролната група. Коефициентът на (OR = 1.158; 95% CI: 0.617–2.173) показва леко, но статистически незначимо повишение на вероятността за затлъстяване при хетерозиготните индивиди (Фиг.11,12). Това се потвърждава и от високата p -стойност ($p = 0.648$), което изключва наличието на значима статистическа значимост.

По подобен начин, генотипът GG се среща при 28% от затлъстелите и 25.7% от не затлъстелите индивиди. Изчисленият коефициент (OR = 1.128; 95% CI: 0.555–2.295) предполага слабо повишение на риска от затлъстяване, но този резултат също не е статистически значим ($p = 0.739$). Широкият Confidence интервал, който включва стойността 1, допълнително потвърждава липсата на надеждна асоциация.



Фиг. 12. Асоциация между генотипите и алелните честоти на изследвания полиморфизъм при затлъстяване. **(А)** Генотипни честоти (%) на генотипите AA, AG и GG при затлъстели и незатлъстели индивиди. **(В)** Съотношения на шансовете (odds ratios, OR) с 95% доверителни интервали (95% CI) за генотипите AA, AG и GG. Пунктираната вертикална линия обозначава OR = 1. **(С)** Алелни честоти (%) на алелите A и G в двете изследвани групи. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест, а съотношенията на шансовете (OR) и 95% доверителните интервали (95% CI) са изчислени с помощта на **GraphPad Prism**.

На алелно ниво, алелът A се среща с честота 45.1% при затлъстелите и 49.3% при не затлъстелите индивиди, докато алелът G има честота съответно 54.9% и 50.7%. Въпреки че алелът G се наблюдава малко по-често при затлъстелите, в таблицата не са представени данни, които да доказват статистически значима разлика между двете групи.

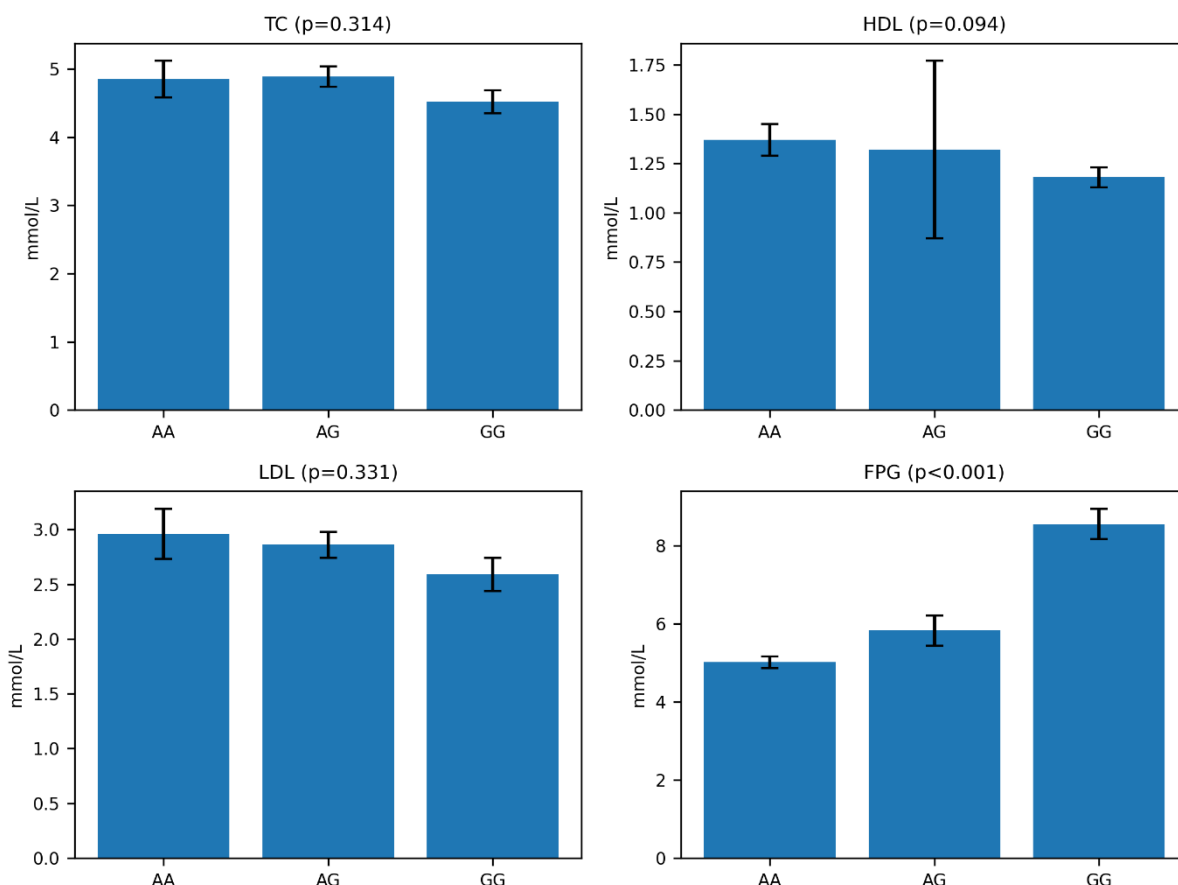
В обобщение, резултатите от тази таблица показват, че не се установяват статистически значими разлики в разпределението на генотипите и алелите между затлъстелите и не затлъстелите индивиди. Всички коефициентис са близки до 1, а p -стойностите са

значително над приетия праг за статистическа значимост ($p < 0.05$). Тези данни показват, че полиморфизмът LEPR Q223R не е свързан със затлъстяването в изследваната севернобългарска популация.

Табл. 12. Връзка на LEPR Q223R полиморфизма и метаболитните параметри в групата изследвани индивиди (контроли и таргетна групи).

Parameters	Genotype	Mean $\pm$ SE	95 % CI for mean	ANOVA p -value
TC (mmol/L)	AA	4.85 $\pm$ 0.27	4.29-5.41	0.314
	AG	4.89 $\pm$ 0.15	4.60-5.19	
	GG	4.52 $\pm$ 0.17	4.17-4.87	
HDL (mmol/L)	AA	1.37 $\pm$ 0.08	1.20-1.54	0.094
	AG	1.32 $\pm$ 0.45	1.23-1.41	
	GG	1.18 $\pm$ 0.05	1.08-1.29	
LDL (mmol/L)	AA	2.96 $\pm$ 0.23	2.48-3.43	0.331
	AG	2.86 $\pm$ 0.12	2.60-3.10	
	GG	2.59 $\pm$ 0.15	2.29-2.89	
FPG (mmol/L)	AA	5.01 $\pm$ 0.15	4.71-5.32	<0.001
	AG	5.82 $\pm$ 0.39	5.58-6.06	
	GG	8.55 $\pm$ 0.39	7.77-9.34	

Таблица 12. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). Разликите между генотипните групи са оценени чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA). TC – общ холестерол; HDL – холестерол в липопротеините с висока плътност (HDL-C); LDL – холестерол в липопротеините с ниска плътност (LDL-C); FPG – плазмена глюкоза на гладно; CI – доверителен интервал.



Фиг. 13. Биохимични параметри според генотипното разпределение. (A) Общ холестерол (TC), (B) HDL-холестерол (HDL-C), (C) LDL-холестерол (LDL-C) и (D) плазмена глюкоза на гладно (FPG). Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SE). Разликите между генотипните групи са оценени чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA). Не се наблюдават статистически значими различия по отношение на липидните показатели ($p > 0.05$), докато плазмената глюкоза на гладно показва статистически значимо увеличение между генотипните групи ($p < 0.001$). Статистическият анализ и графичното представяне са извършени с помощта на GraphPad Prism.

Таблица 12 представя сравнителен анализ на основни биохимични показатели, включително общ холестерол (TC), HDL-холестерол, LDL-холестерол и глюкоза на гладно (FPG), в зависимост от генотипите AA, AG и GG на полиморфизма LEPR Q223R. Данните са изразени като средни стойности $\pm$ стандартна грешка (Mean $\pm$ SE), придружени от 95% confidence intervals, като статистическата значимост на различията между групите е оценена чрез едно факторен дисперсионен анализ (ANOVA).

По отношение на общия холестерол (TC), средните стойности показват минимални вариации между отделните генотипни групи. При носителите на генотип AA средната стойност е 4.85 ± 0.27 mmol/L (95% CI: 4.29–5.41), при AG – 4.89 ± 0.15 mmol/L (95% CI:

4.60–5.19), а при GG – 4.52 ± 0.17 mmol/L (95% CI: 4.17–4.87). Въпреки лекото понижение при GG генотипа, статистически значими различия не се установяват ($p = 0.314$), което показва, че полиморфизмът не оказва съществено влияние върху нивата на общия холестерол.

Анализът на HDL-холестерола разкрива известна тенденция към по-ниски стойности при носителите на GG генотипа. Средната стойност при AA е 1.37 ± 0.08 mmol/L (95% CI: 1.20–1.54), при AG – 1.32 ± 0.45 mmol/L (95% CI: 1.23–1.41), и при GG – 1.18 ± 0.05 mmol/L (95% CI: 1.08–1.29). Въпреки наблюдаваното постепенно намаляване на HDL стойностите при увеличаване на броя на G алелите, разликите между групите не достигат статистическа значимост ($p = 0.094$), което предполага липса на убедителна асоциация.

По сходен начин, резултатите за LDL-холестерола показват намаляваща тенденция от AA към GG генотипа. Средната стойност при AA е 2.96 ± 0.23 mmol/L (95% CI: 2.48–3.43), при AG – 2.86 ± 0.12 mmol/L (95% CI: 2.60–3.10), а при GG – 2.59 ± 0.15 mmol/L (95% CI: 2.29–2.89). Независимо от тази тенденция, статистически значима разлика не се установява ($p = 0.331$), което показва, че вариацията в генотипа не е съществен фактор за нивата на LDL-холестерола.

За разлика от липидните показатели, при глюкозата на гладно (FPG) се наблюдават ясно изразени и статистически значими различия между генотипните групи. При носителите на генотип AA средната стойност е 5.01 ± 0.15 mmol/L (95% CI: 4.71–5.32), при AG – 5.82 ± 0.39 mmol/L (95% CI: 5.58–6.06), а при GG – значително по-висока стойност от 8.55 ± 0.39 mmol/L (95% CI: 7.77–9.34). Разликата между групите е силно статистически значима ($p < 0.001$), като се наблюдава ясно изразен градиент, при който стойностите на глюкозата нарастват с увеличаване на броя на G алелите. Освен това, ограниченото припокриване на confidence intervals допълнително подкрепя наличието на съществена разлика между генотипите.

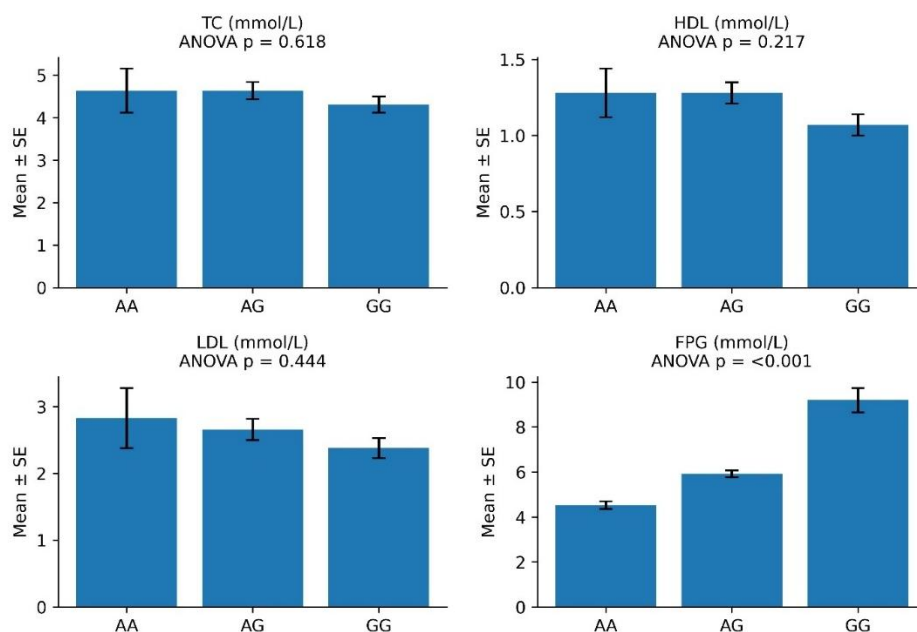
В обобщение, представените резултати показват, че не се установяват статистически значими различия между генотипите по отношение на липидните показатели (TC, HDL и LDL холестерол), въпреки наличието на определени тенденции. За сметка на това, при глюкозата на гладно се наблюдава ясно изразена и статистически значима асоциация с генотипа, като носителите на GG генотипа демонстрират значително по-високи стойности. Този модел предполага, че полиморфизмът *LEPR Q223R* оказва по-специфично влияние върху глюкозния метаболизъм, отколкото върху липидния профил (Фиг.13). Общият модел показва липса на значими различия при липидните параметри

между генотипите, докато при глюкозата на гладно се наблюдава ясно изразено увеличение на стойностите при носителите на G алела, особено при хомозиготите GG.

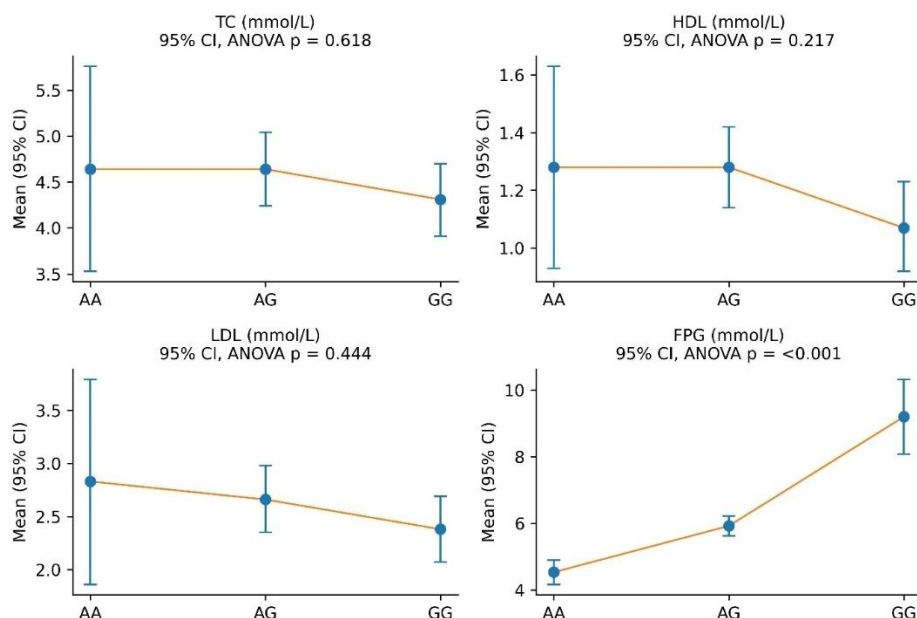
Табл. 13. Връзка между *LEPR* Q233R полиморфизма с метаболитни параметри при obese групата ($BMI \geq 25kg/m^2$).

Parameters	Genotype	Mean $\pm$ SE	95 % CI for mean	ANOVA <i>p</i> -value
TC (mmol/L)	AA	4.64 $\pm$ 0.52	3.53 - 5.76	0.618
	AG	4.64 $\pm$ 0.20	4.24 - 5.04	
	GG	4.31 $\pm$ 0.19	3.91 - 4.70	
HDL (mmol/L)	AA	1.28 $\pm$ 0.16	0.93 - 1.63	0.217
	AG	1.28 $\pm$ 0.07	1.14 - 1.42	
	GG	1.07 $\pm$ 0.07	0.92 - 1.23	
LDL (mmol/L)	AA	2.83 $\pm$ 0.45	1.86-3.79	0.444
	AG	2.66 $\pm$ 0.16	2.35 - 2.98	
	GG	2.38 $\pm$ 0.15	2.07 - 2.69	
FPG (mmol/L)	AA	4.53 $\pm$ 0.17	4.16 - 4.89	< 0.001
	AG	5.92 $\pm$ 0.15	5.62 - 6.22	
	GG	9.20 $\pm$ 0.54	8.08 - 10.32	

аблица 13. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). Разликите между генотипните групи са оценени чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA). TC – общ холестерол; HDL – холестерол в липопротеините с висока плътност (HDL-C); LDL – холестерол в липопротеините с ниска плътност (LDL-C); FPG – плазмена глюкоза на гладно; CI – доверителен интервал.



Фиг. 14. Биохимични параметри според генотипа на LEPR Q223R. А) Общ холестерол (TC), (В) HDL-холестерол (HDL-C), (С) LDL-холестерол (LDL-C) и (D) глюкоза на гладно (FPG). Данните са представени като средни стойности $\pm$ стандартна грешка (SE). Не се установяват статистически значими разлики за липидните показатели ($p > 0.05$), докато FPG показва статистически значимо генотип-зависимо повишение ($p < 0.001$). Използван статистически анализ GraphPad Prism



Фиг. 15. Средни стойности на биохимичните показатели при генотипите AA, AG и GG с 95% доверителни интервали (CI). Статистическите сравнения са извършени чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA). Глюкозата на гладно (FPG)

показва статистически значима разлика между генотипите ($p < 0.001$), докато общият холестерол (TC), HDL-холестеролът (HDL) и LDL-холестеролът (LDL) не показват статистически значими различия.

Таблица 13 представя подробно сравнителен анализ на основни биохимични показатели — общ холестерол (TC), липопротеини с висока плътност (HDL-C), липопротеини с ниска плътност (LDL-C) и глюкоза на гладно (FPG) — в зависимост от генотипното разпределение (AA, AG и GG) на полиморфизма LEPR Q223R. Данните са представени като средни стойности $\pm$ стандартна грешка (SE), придружени от 95% confidence intervals (CI), като статистическата значимост на между груповите различия е оценена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA).

По отношение на общия холестерол (TC), резултатите показват относително хомогенни стойности между трите генотипни групи, без наличие на съществени вариации. При индивидите с генотип AA средната стойност на TC е 4.64 ± 0.52 mmol/L, като 95% confidence intervals варира между 3.53 и 5.76 mmol/L, което отразява по-широка вариабилност в тази група. При носителите на AG генотипа се наблюдава идентична средна стойност (4.64 ± 0.20 mmol/L), но с по-тесен confidence intervals (4.24–5.04 mmol/L), което предполага по-голяма хомогенност на данните в тази група. При GG генотипа се отчита леко по-ниска средна стойност на общия холестерол — 4.31 ± 0.19 mmol/L (95% CI: 3.91–4.70). Въпреки тази минимална тенденция към намаление при носителите на G алела, статистическият анализ не установява значима разлика между групите ($p = 0.618$). Това показва, че LEPR Q223R полиморфизмът не оказва съществено влияние върху серумните нива на общия холестерол в изследваната популация.

При анализа на HDL-холестерола, който е ключов защитен фактор срещу атеросклероза, се наблюдава слаба, но последователна тенденция към понижаване на стойностите при носителите на G алела. Индивидите с AA генотип демонстрират средна стойност от 1.28 ± 0.16 mmol/L, като 95% CI е 0.93–1.63 mmol/L, което показва относително по-широка вариабилност. При AG генотипа средната стойност също е 1.28 ± 0.07 mmol/L, но с по-тесен confidence intervals (1.14–1.42 mmol/L), което отразява по-стабилно разпределение. При GG генотипа се отчита по-ниска средна стойност на HDL-C — 1.07 ± 0.07 mmol/L (95% CI: 0.92–1.23), което може да се интерпретира като потенциална неблагоприятна тенденция по отношение на липидния профил. Въпреки това, статистическата значимост не е достигната ($p = 0.217$), което означава, че наблюдаваните разлики не са достатъчно изразени, за да се приемат като доказан ефект на генотипа.

Подобна картина се наблюдава и при LDL-холестерола, който е основен атерогенен липопротеин. При AA генотипа средната стойност е 2.83 ± 0.45 mmol/L (95% CI: 1.86–3.79), като се наблюдава най-широк confidence interval, което предполага по-голяма вариабилност в тази група. При AG генотипа стойността е 2.66 ± 0.16 mmol/L (95% CI: 2.35–2.98), а при GG генотипа — 2.38 ± 0.15 mmol/L (95% CI: 2.07–2.69). Макар да се наблюдава постепенна тенденция към намаляване на LDL-C при увеличаване на броя на G алелите, резултатите от ANOVA анализа показват, че тези различия не са статистически значими ($p = 0.444$). Следователно не може да се приеме наличие на убедителна връзка между LEPR Q223R вариацията и LDL-холестероловите нива.

Съществено различие се установява при анализа на глюкозата на гладно (FPG), където се наблюдава ясно изразена и статистически силно значима асоциация с генотипа ($p < 0.001$). При индивидите с AA генотип средната стойност е 4.53 ± 0.17 mmol/L (95% CI: 4.16–4.89), което е в рамките на нормални гликемичните граници. При AG генотипа се наблюдава значително повишение на FPG до 5.92 ± 0.15 mmol/L (95% CI: 5.62–6.22), което вече се доближава до гранични стойности за нарушен глюкозен толеранс. Най-драстично отклонение се отчита при GG генотипа, където средната стойност достига 9.20 ± 0.54 mmol/L (95% CI: 8.08–10.32), което е характерно за изразена хипергликемия и предполага значително нарушение в глюкозния метаболизъм (Фиг.14,15).

Особено важно е, че разпределението на стойностите при FPG демонстрира ясно изразена генотип–фенотип зависимост, при която увеличаването на броя на G алелите е свързано с прогресивно и значимо повишаване на нивата на кръвната глюкоза. Този градиентен модел (AA < AG < GG) подсказва потенциален дозо-зависим ефект на полиморфизма върху регулацията на глюкозния метаболизъм. За разлика от това, липидните параметри (TC, HDL-C и LDL-C) не показват статистически значими различия между генотипите, въпреки наличието на слаби и последователни тенденции в определени показатели.

В обобщение, резултатите от таблицата ясно демонстрират, че LEPR Q223R полиморфизмът не е свързан със значими промени в липидния профил на изследваната популация, но показва силна, статистически значима и биологично правдоподобна асоциация с глюкозата на гладно. Това предполага, че генетичният вариант има по-специфично действие върху глюкозната хомеостаза, отколкото върху общия липиден метаболизъм, което е в съответствие с известната роля на лептиновия рецептор в регулацията на енергийния баланс и инсулиновата чувствителност.

3. ЛЕПТИН

Табл. 14. Генотипно и алелно разпределение на изследвания полиморфизъм при obese и не-obese индивиди

Genotype / Allele	Obese	Non-obese	OR (95% CI)	p-value
GG	16 (19.5%)	20 (27%)	0.65 (0.31–1.38)	0.342
GA	40 (48.8%)	37 (37%)	0.95 (0.51–1.79)	1.000
AA	26 (31.7%)	17 (17%)	1.56 (0.76–3.18)	0.282
G	72 (44%)	77(52%)	0.72 (0.46–1.13)	0.173
A	92 (56%)	71 (48%)	1.39 (0.89–2.17)	0.173

Табл. 14. Представя разпределението на генотипните и алелните честоти при индивиди със затлъстяване и при незатлъстели индивиди. Генотипът *GA* е най-често срещаният генотип и в двете изследвани групи, като се установява при 48,8% от индивидите със затлъстяване и при 37,0% от незатлъстелите индивиди. Разликите в разпределението на генотипните и алелните честоти между групите са оценени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест.

Генотипът *AA* се среща с по-висока честота в групата със затлъстяване (31,7%) в сравнение с контролната група (17,0%), като изчисленото OR е 1,56 (95% CI: 0,76–3,18). Този резултат предполага тенденция към по-висока вероятност за наличие на затлъстяване сред индивидите, носители на генотип *AA* (Табл.14). Независимо от това, установената асоциация не достига статистическа значимост ($p = 0,282$).

За разлика от него, генотипът *GG* е наблюдаван по-често в групата без затлъстяване (27,0%) в сравнение с групата със затлъстяване (19,5%), с OR = 0,65 (95% CI: 0,31–1,38). Този резултат може да насочва към възможен протективен ефект по отношение на риска от затлъстяване, макар и без статистическа значимост ($p = 0,342$). По аналогичен начин, генотипът *GA* също не показва статистически значима асоциация със затлъстяването (OR = 0,95, 95% CI: 0,51–1,79; $p = 1,000$).

По отношение на алелните честоти, алелът *A* е по-често представен сред индивидите със затлъстяване (56,0%) в сравнение с тези без затлъстяване (48,0%), с OR = 1,39 (95% CI: 0,89–2,17). Обратно, алелът *G* се установява с малко по-висока честота в групата без затлъстяване (52,0%) спрямо групата със затлъстяване (44,0%), с OR = 0,72 (95% CI: 0,46–1,13). И при двата алела не е установена статистически значима връзка със затлъстяването ($p = 0,173$).

Като цяло, не се наблюдават статистически значими различия в разпределението на генотипите и алелите между двете групи. Това показва, че изследваният полиморфизъм

не е значимо асоцииран с риска от затлъстяване в рамките на настоящата изследвана популация.

Особено внимание заслужава фактът, че генотипът GA е най-често срещан и в двете групи, което показва преобладаване на хетерозиготната форма в анализираната популация. Въпреки че честотата му е числено по-висока сред лицата със затлъстяване (48,8%) спрямо контролната група (37,0%), стойността на $OR = 0,95$, съчетана с широкия 95% CI (0,51–1,79) и $p = 1,000$, не предоставя доказателства за съществуването на статистически значима асоциация между този генотип и риска от затлъстяване.

Генотипът AA се среща с по-висока честота сред индивидите със затлъстяване (31,7%) в сравнение с индивидите без затлъстяване (17,0%). Изчисленото $OR = 1,56$ предполага, че носителите на този генотип могат да имат приблизително 1,5 пъти по-висок шанс за развитие на затлъстяване спрямо сравняваната група. Въпреки това, CI включва стойността 1 (95% CI: 0,76–3,18), а p -стойността (0,282) е по-голяма от 0,05, което показва, че наблюдаваното увеличение не е статистически значимо. Това може да отразява както слаб биологичен ефект, така и недостатъчен размер на извадката за установяване на реална асоциация.

За разлика от това, генотипът GG е по-често представен в групата без затлъстяване (27,0%) в сравнение с групата със затлъстяване (19,5%). Стойността на $OR = 0,65$ насочва към възможна протективна тенденция, предполагаща по-нисък риск от затлъстяване при носителите на генотип GG. Независимо от това, и този резултат не достига статистическа значимост ($p = 0,342$), като CI също включва стойността 1.

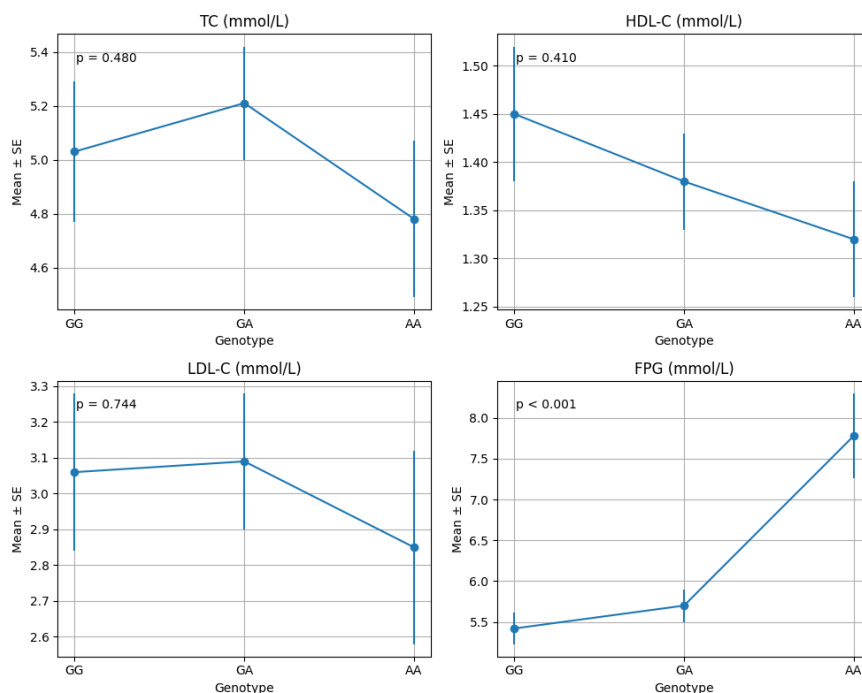
На алелно ниво честотата на алел A е по-висока при индивидите със затлъстяване (56,0%) в сравнение с индивидите без затлъстяване (48,0%), докато алел G се среща по-често в групата без затлъстяване (52,0%). Отношението на шансовете за алел A ($OR = 1,39$) предполага възможна повишена предразположеност към затлъстяване, докато алел G ($OR = 0,72$) може да бъде свързан с потенциална протективна тенденция. Въпреки това, и двете асоциации остават статистически незначими ($p = 0,173$).

Като цяло, получените данни показват тенденция към повишен риск от затлъстяване, свързан с алел A и генотип AA, докато алел G и генотип GG могат да имат възможен протективен ефект. Въпреки това, тъй като всички p -стойности са над 0,05, а всички CI включват стойността 1, въз основа на настоящата извадка не може да се направи заключение за статистически значима асоциация. Наблюдаваните тенденции обаче могат да бъдат основание за последващо изследване в по-голяма кохорта, което би повишило статистическата мощност на анализа.

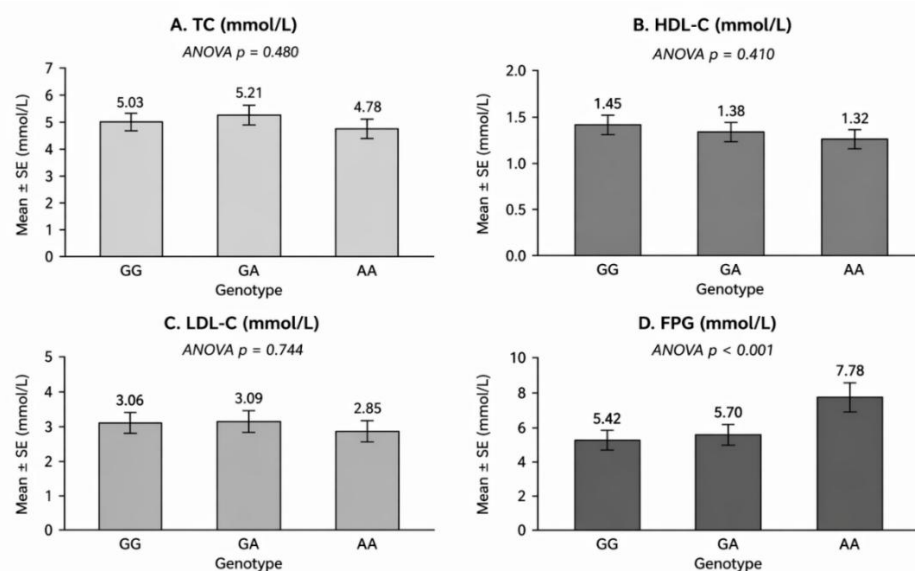
Табл. 15. Сравнение на биохимични параметри между различните генотипи при контролната група.

Control Group (BMI<25kgm ²)				
Parameter	Genotype	Mean±SE	95% Confidence interval for mean	ANOVA p-value
TC (mmol/L)	GG	5.03±0.26	4.47-5.58	0.480
	GA	5.21±0.21	4.77-5.64	
	AA	4.78±0.29	4.15-5.40	
HDL-C (mmol/L)	GG	1.45±0.07	1.30-1.60	0.410
	GA	1.38±0.05	1.28-1.48	
	AA	1.32±0.06	1.20-1.44	
LDL-C (mmol/L)	GG	3.06±0.22	2.61-3.52	0.744
	GA	3.09±0.19	2.68-3.5	
	AA	2.85±0.27	2.29-3.41	
FPG (mmol/L)	GG	5.42±0.19	5.01-5.82	<0.001
	GA	5.70±0.20	5.30-6.10	
	AA	7.78±0.52	6.70-8.90	

Табл.15. сравнява параметрите на липидния профил и плазмените нива на глюкозата на гладно (FPG) между различните генотипове на гена за лептин (GG, GA, AA) в контролната група с нормален индекс на телесна маса (BMI < 25 kg/m²). Стойностите са представени като средна стойност ± стандартна грешка (SE), заедно с 95% CI за всяка средна стойност. р-стойността от ANOVA анализа показва дали съществува статистически значима разлика между трите генотипни групи.



Фиг. 16. Сравнение на общия холестерол (TC), HDL-холестерола (HDL-C), LDL-холестерола (LDL-C) и плазмената глюкоза на гладно (FPG) между генотиповете GG, GA и AA в контролната група. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SE) (или $\pm$ стандартно отклонение (SD), ако това е използвано във фигурата). Разликите между генотипните групи са оценени чрез **еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA)**.



Фиг. 17. Сравнение на метаболитните параметри между генотипите в контролната група. Представени са общият холестерол (TC), HDL-холестеролът (HDL-C), LDL-холестеролът (LDL-C) и плазмената глюкоза на гладно (FPG). Данните са представени като средна стойност с 95% доверителен интервал (95% CI) (или съгласно формата, използван във фигурата). Статистическият анализ и графичното представяне са извършени с помощта на **GraphPad Prism**.

В контролната група с BMI < 25 kg/m² биохимичните показатели бяха сравнени между трите генотипа на гена за лептин (GG, GA и AA) (Табл.15). По отношение на общия холестерол (TC), средните стойности бяха 5,03 ± 0,26 mmol/L при генотип GG, 5,21 ± 0,21 mmol/L при GA и 4,78 ± 0,29 mmol/L при AA, като *p*-стойността от ANOVA анализа беше 0,480, което показва липса на статистически значима разлика между генотиповете. По аналогичен начин, нивата на HDL-C показаха средни стойности от 1,45 ± 0,07 mmol/L за GG, 1,38 ± 0,05 mmol/L за GA и 1,32 ± 0,06 mmol/L за AA, като разликата също не беше статистически значима (*p* = 0,410).

Средните стойности на LDL-C също бяха съпоставими между отделните генотипове, съответно 3,06 ± 0,22 mmol/L при GG, 3,09 ± 0,19 mmol/L при GA и 2,85 ± 0,27 mmol/L при AA, без наличие на статистически значима вариация (*p* = 0,744).

За разлика от липидните показатели, глюкозата в плазмата на гладно (FPG) демонстрира изразена разлика между генотиповете, със средни стойности 5,42 ± 0,19 mmol/L за GG, 5,70 ± 0,20 mmol/L за GA и значително по-висока стойност от 7,78 ± 0,52 mmol/L за AA. Тази разлика беше установена като високо статистически значима (*p* < 0,001), което предполага, че генотипът AA на гена за лептин може да бъде асоцииран с повишени нива на глюкоза на гладно в контролната група, докато не се наблюдава значима асоциация с параметрите на липидния профил (Фиг.16,17)

Табл. 16. Асоциация на полиморфизма в лептиновия ген с хипертония и T2DM сред участници в контролната група.

		Non-hypertensive	Hypertensive	p-value
Hypertension	GG	11 (14.9%)	7 (9.5%)	0.049
	GA	15 (20.3%)	22 (29.7%)	
	AA	14 (18.9%)	5 (6.8%)	
		Non-diabetic	Diabetic	p-value
Diabetes Mellitus	GG	16 (21.6%)	2 (2.7%)	0.058
	GA	30 (40.5%)	7 (9.5%)	
	AA	11 (14.9%)	8 (10.8%)	

По отношение на артериалната хипертония (Табл.16), сред участниците без хипертония честотата на генотиповете беше както следва: GG – 11 (14,9%), GA – 15 (20,3%) и AA – 14 (18,9%). Сред участниците с хипертония съответните честоти бяха GG – 7 (9,5%), GA – 22 (29,7%) и AA – 5 (6,8%). Установената връзка между разпределението на генотипите и хипертоничния статус беше статистически значима (*p* = 0,049), което предполага, че

генотипът на гена за лептин може да бъде свързан с наличието на артериална хипертония в контролната група, като генотипът GA се среща по-често сред хипертоничните индивиди.

По отношение на T2DM, сред недиабетните контроли честотата на генотиповете беше GG – 16 (21,6%), GA – 30 (40,5%) и AA – 11 (14,9%). В подгрупата на диабетните участници честотите бяха GG – 2 (2,7%), GA – 7 (9,5%) и AA – 8 (10,8%). Получената p -стойност беше 0,058, което е малко над конвенционалния праг за статистическа значимост ($p < 0,05$). Това показва, че асоциацията между генотипа на лептина и диабетния статус в контролната група не достига статистическа значимост, въпреки че се наблюдава гранична тенденция, при която генотипът AA е относително по-силно представен сред диабетните индивиди в сравнение с GG и GA.

В контролната група разпределението на генотиповете на гена за лептин демонстрира различни модели по отношение на статуса на артериалната хипертония и захарния диабет. За артериалната хипертония честотите на генотиповете се различават значимо между нехипертоничните и хипертоничните индивиди ($p = 0,049$), което показва наличие на статистически значима асоциация. Генотипът GA е най-често срещан сред хипертоничните контроли, като обхваща 22 индивида (29,7%), в сравнение с 15 индивида (20,3%) в групата без хипертония. За разлика от това, генотипът AA е по-рядко срещан сред хипертоничните лица (5; 6,8%) в сравнение с нехипертоничните (14; 18,9%). Генотипът GG също се наблюдава по-рядко в хипертоничната група (7; 9,5%) спрямо групата без хипертония (11; 14,9%). Тези резултати предполагат, че генотипът GA може да бъде свързан с по-висока вероятност за наличие на артериална хипертония, докато генотипът AA се среща по-рядко сред хипертоничните индивиди в рамките на контролната популация.

По отношение на T2DM, разпределението на генотиповете показва гранично незначима асоциация ($p = 0,058$). Въпреки че p -стойността е малко над приетия праг за статистическа значимост, резултатите насочват към възможна тенденция. Генотипът AA е относително по-силно представен сред диабетните контроли (8; 10,8%) в сравнение с дела му сред недиабетните контроли (11; 14,9%), особено когато се вземе предвид значително по-малкият размер на диабетната подгрупа. Генотипът GG е най-слабо представен сред диабетните индивиди (2; 2,7%), докато GA остава най-често срещаният генотип и в двете групи (30; 40,5% при недиабетните и 7; 9,5% при диабетните участници). Това може да предполага възможна връзка между генотипа на лептина и

риска от T2DM, която обаче не достига статистическа значимост, вероятно поради ограничения размер на извадката.

Като цяло, таблицата показва, че полиморфизмът на гена за лептин е статистически значимо асоцииран с артериалната хипертония и демонстрира почти значима тенденция по отношение на T2DM в контролната група, което налага провеждането на допълнителни изследвания в по-големи популации.

Табл. 17. Сравнение на биохимичните параметри спрямо лептиновия генотип в таргетната група. (BMI > 30 kg/m²)

Obese Group (BMI>30kgm2)				
Parameter	Genotype	Mean±SE	95% Confidence interval for mean	ANOVA p-value
TC (mmol/L)	GG	4.7±0.24	4.19-5.21	0.336
	GA	5.01±0.21	4.59-5.43	
	AA	5.4±0.38	4.61-6.18	
HDL-C (mmol/L)	GG	1.40±0.1	1.19-1.6	0.447
	GA	1.40±0.05	1.30-1.50	
	AA	1.30±0.05	1.18-1.41	
LDL-C (mmol/L)	GG	2.56±0.24	2.05-3.07	0.129
	GA	3.04±0.18	2.67-3.40	
	AA	3.43±0.34	2.73-4.14	
FPG (mmol/L)	GG	5.93±0.41	5.05-6.81	0.065
	GA	6.43±0.29	5.84-7.03	
	AA	5.42±0.20	5.00-5.84	

По отношение на общия холестерол (TC), средните стойности показаха постепенно нарастване между отделните генотипове, като бяха $4,70 \pm 0,24$ mmol/L при GG, $5,01 \pm 0,21$ mmol/L при GA и $5,40 \pm 0,38$ mmol/L при AA. Въпреки тази възходяща тенденция, разликата не достигна статистическа значимост (ANOVA $p = 0,336$), което показва липса на съществена асоциация между генотипа на лептина и нивата на общия холестерол в групата със затлъстяване (Табл.17).

По аналогичен начин, стойностите на HDL-C бяха относително сходни между генотиповете, със средни стойности $1,40 \pm 0,10$ mmol/L за GG, $1,40 \pm 0,05$ mmol/L за GA и леко по-ниска стойност от $1,30 \pm 0,05$ mmol/L за AA. Наблюдаваната вариация също не беше статистически значима ($p = 0,447$), което предполага, че нивата на HDL-C не се различават съществено в зависимост от генотипа при лицата със затлъстяване.

За LDL-C средните стойности бяха $2,56 \pm 0,24$ mmol/L при GG, $3,04 \pm 0,18$ mmol/L при GA и $3,43 \pm 0,34$ mmol/L при AA. Макар да се наблюдава тенденция към постепенно увеличение от GG към AA, разликата не достига статистическа значимост ($p = 0,129$). Това може да насочва към възможна тенденция за по-високи нива на LDL-C при носителите на генотип AA, но наличните данни са недостатъчни за потвърждаване на статистически значима асоциация.

По отношение на глюкозата на гладно в плазмата (FPG), средните стойности бяха $5,93 \pm 0,41$ mmol/L при GG, $6,43 \pm 0,29$ mmol/L при GA и $5,42 \pm 0,20$ mmol/L при AA. Генотипът GA показва най-висока средна стойност на FPG, докато AA демонстрира най-ниската стойност. Получената p -стойност от 0,065 е малко над прага за статистическа значимост, което показва гранично незначима разлика между генотиповете. Това предполага възможна тенденция към различия в глюкозния метаболизъм при лицата със затлъстяване в зависимост от генотипа на лептина, особено при носителите на GA, въпреки че за потвърждение на тази връзка са необходими изследвания с по-голям размер на извадката.

Като цяло, в групата със затлъстяване не бяха установени статистически значими различия в параметрите на липидния профил и глюкозата на гладно между различните генотипове на гена за лептин, въпреки че LDL-C и FPG показаха тенденции, които могат да бъдат обект на по-нататъшно изследване.

Липсата на статистическа значимост при всички изследвани показатели ($p > 0,05$) предполага, че полиморфизмът на гена за лептин не е значимо свързан с липидния профил или глюкозата на гладно в рамките на настоящата извадка от лица със затлъстяване. Въпреки това, наблюдаваните тенденции при LDL-C и FPG могат да придобият статистическа значимост при изследвания с по-голяма популация. Тези резултати предполагат, че самото затлъстяване може да оказва по-силно влияние върху метаболитните показатели, отколкото генотипът на лептина сам по себе си.

Табл.18. Асоциация на лептиновия полиморфизъм с хипертония и T2DM в таргетната група (обезитетни индивиди).

		Non-hypertensive	Hypertensive	p-value
Hypertension	GG	14 (17.1%)	1 (1.2%)	<0.001
	GA	28 (34.1%)	16 (19.5%)	
	AA	6 (7.3%)	17 (20.7%)	
		Non-diabetic	Diabetic	p-value
Diabetes Mellitus	GG	13 (15.9%)	2 (2.4%)	0.324
	GA	31 (37.8%)	13 (15.9%)	
	AA	19 (23.2%)	4 (4.9%)	

В групата със затлъстяване ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) разпределението на генотиповете на лептина беше анализирано във връзка със статуса на артериалната хипертония и T2DM (Табл 18). По отношение на хипертонията беше установена силно статистически значима връзка между разпределението на генотиповете и наличието на хипертония ($p < 0.001$). Сред лицата без хипертония честотата на генотиповете беше както следва: GG: 14 (17.1%), GA: 28 (34.1%) и AA: 6 (7.3%). За разлика от това, при лицата с хипертония честотите бяха GG: 1 (1.2%), GA: 16 (19.5%) и AA: 17 (20.7%). Прави впечатление, че AA генотипът е значително по-чест при хипертоничните пациенти, докато GG генотипът се среща рядко, което предполага силна връзка между AA генотипа и повишения риск от хипертония при индивиди със затлъстяване.

По отношение на T2DM разпределението на генотиповете не показва статистически значима връзка ($p = 0.324$). Сред лицата без диабет честотите бяха GG: 13 (15.9%), GA: 31 (37.8%) и AA: 19 (23.2%), докато в групата с диабет те бяха GG: 2 (2.4%), GA: 13 (15.9%) и AA: 4 (4.9%). Въпреки че GA генотипът остава най-често срещан и в двете групи, а AA генотипът изглежда по-слабо представен сред диабетиците, тези разлики не са статистически значими.

Като цяло, резултатите показват, че в групата със затлъстяване полиморфизмът на гена на лептина е силно свързан с хипертонията, но не и със захарния диабет, което предполага по-изразена роля на генетичната вариабилност на лептина в регулацията на артериалното налягане, отколкото в глюкозния метаболизъм в тази популация.

В групата със затлъстяване разпределението на генотиповете на лептина демонстрира силна и статистически значима връзка със статуса на хипертонията ($p < 0.001$). Най-съществената находка е ясно изразената промяна в честотата на генотиповете между нехипертоничните и хипертоничните индивиди. Сред нехипертоничните лица GA

генотипът беше най-чест (28; 34.1%), следван от GG (14; 17.1%) и AA (6; 7.3%). Обратно, сред хипертоничните лица AA генотипът стана най-често срещан (17; 20.7%), докато GG генотипът спадна драстично само до 1 индивид (1.2%). Този модел силно предполага, че AA генотипът може да бъде свързан с повишена предразположеност към хипертония при индивиди със затлъстяване, докато GG генотипът може да има относително протективна роля. Като се има предвид установената роля на лептина в активирането на симпатиковата нервна система и регулацията на артериалното налягане, тази находка може да показва, че AA вариантът допринася за засилена лептинова сигнализация или механизми на лептинова резистентност, свързани с хипертонията.

За разлика от това, по отношение на T2DM разпределението на генотиповете не показва статистически значима връзка ($p = 0.324$). GA генотипът остана най-често срещан както при лицата без диабет (31; 37.8%), така и при диабетните пациенти (13; 15.9%). Честотите на GG и AA генотиповете също бяха относително пропорционални между двете групи, без ясен модел, който да предполага специфичен генотипно обусловен риск. Това показва, че в изследваната популация със затлъстяване полиморфизмът на гена на лептина не изглежда да оказва значимо влияние върху диабетния статус.

Като цяло, тези резултати предполагат, че при затлъстяване генетичната вариация на лептина може да бъде по-силно свързана с хипертонията, отколкото със T2DM. Силно значимата връзка с хипертонията, особено повишената честота на AA генотипа сред хипертоничните пациенти, подкрепя потенциалната роля на полиморфизма на лептина в сърдечно-съдовия риск при индивиди със затлъстяване. Бъдещи проучвания с по-големи извадки и механизтична оценка биха помогнали да се изясни дали този генотип допринася директно за патогенезата на хипертонията.

IV.Обсъждане на резултатите

1.Адипонектин (ADIPOQ, rs266729)

Настоящото проучване установи, че полиморфизмът **rs266729** в промоторната област на гена **ADIPOQ** е свързан с повишен риск от затлъстяване и диабет тип 2 в севернобългарската популация. G-алелът и генотипите CG/GG се асоциират с по-висок метаболитен риск, понижени HDL-холестеролни нива и нарушения в глюкозната хомеостаза. Получените резултати са в съответствие с известната роля на адипонектина в регулацията на инсулиновата чувствителност и липидния метаболизъм и подкрепят данни от предходни международни изследвания. Липсата на асоциация с общия и LDL-холестерола предполага по-селективен ефект върху HDL и глюкозния метаболизъм.

Основните ограничения на изследването са малкият размер на извадката и липсата на директно определяне на серумните нива на адипонектин. Въпреки това резултатите подкрепят потенциала на rs266729 като генетичен маркер за кардиометаболически риск.

2. LEPR (rs1137101)

Не беше установена статистически значима връзка между **LEPR rs1137101** и затлъстяването или липидния профил. За разлика от това, полиморфизмът показва значима асоциация с плазмената глюкоза на гладно, като се наблюдава дозово-зависим ефект (AA < AG < GG). Това предполага участие на G-алела в нарушената глюкозна регулация и повишения риск от диабет тип 2. Получените резултати съответстват на данните, че лептиновата сигнализация има по-голямо значение за глюкозната хомеостаза, отколкото за развитието на затлъстяване. Необходими са по-мощни проучвания за потвърждаване на наблюдаваните асоциации. Получените резултати показват, че полиморфизмът **LEPR rs1137101 (Q223R)** не е свързан със затлъстяването или липидния профил, но демонстрира значима асоциация с плазмената глюкоза на гладно. Наблюдаваният дозово-зависим ефект (AA < AG < GG) предполага участие на G-алела в нарушената глюкозна хомеостаза и повишения риск от диабет тип 2. Данните подкрепят схващането, че LEPR влияе предимно върху инсулиновата сигнализация и глюкозния метаболизъм, а не върху телесното тегло или липидната обмяна. Въпреки ограниченията, свързани с размера на извадката и липсата на показатели за инсулинова резистентност, резултатите определят **LEPR rs1137101** като потенциален генетичен маркер за нарушения в глюкозната регулация.

3. LEP (-2548G>A)

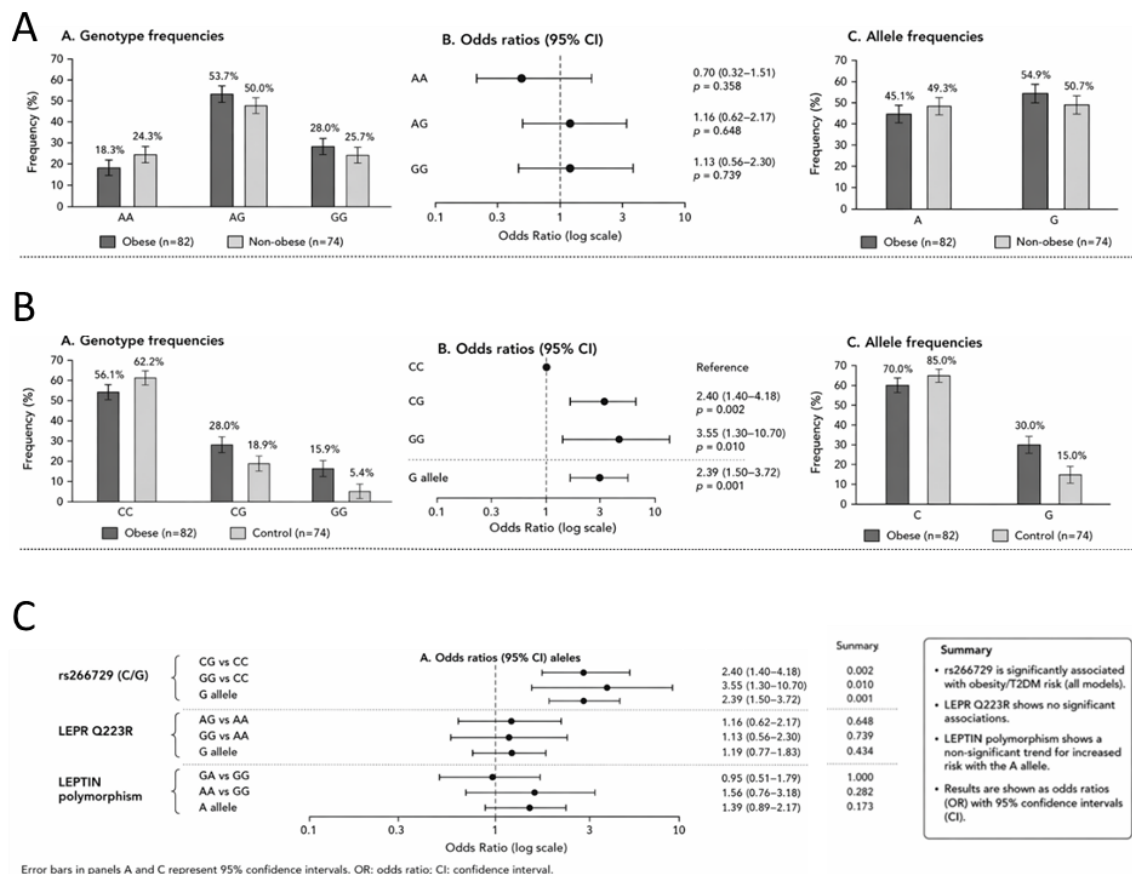
Полиморфизмът **LEP -2548G>A** показва зависим от BMI ефект върху метаболитните показатели. При лица с нормално телесно тегло AA генотипът се асоциира с по-високи стойности на плазмената глюкоза на гладно и повишен риск от артериална хипертония, без значима връзка с липидния профил. При затлъстелите индивиди не се установяват статистически значими различия между генотиповете, вероятно поради доминиращото влияние на лептиновата резистентност и метаболитните нарушения, свързани със затлъстяването. Резултатите подкрепят ролята на **LEP -2548G>A** като модификатор на глюкозната регулация и сърдечно-съдовия риск, чието влияние зависи от метаболитния контекст.

Най-същественият резултат от настоящото проучване е значимата асоциация между полиморфизма **LEP -2548G>A** и артериалната хипертония при пациенти със

затлъстяване, като AA генотипът се среща по-често сред хипертоничните индивиди. Тези резултати съответстват на данните, че лептинът повишава артериалното налягане чрез симпатикова активация, нарушена натриева хомеостаза и съдова дисфункция. Вероятно наблюдаваният ефект се обяснява със селективната лептинова резистентност, при която пресорните ефекти на лептина се запазват въпреки нарушената регулация на апетита. Не беше установена статистически значима асоциация между полиморфизма и T2DM при затлъстелите индивиди, вероятно поради доминиращото влияние на инсулиновата резистентност и ограничения размер на извадката.

Като цяло резултатите показват, че ефектът на **LEP -2548G>A** е BMI-зависим – полиморфизмът оказва по-голямо влияние върху глюкозния метаболизъм при лица с нормално тегло и по-силна връзка с артериалната хипертония при затлъстяване. Това подкрепя ролята на лептина като важен медиатор на кардиометаболитния риск.

Метаболитните нарушения са резултат от взаимодействието между фактори на околната среда и полигенна генетична предразположеност. Адипонектинът и лептинът са ключови адипокини, които регулират инсулиновата чувствителност, енергийния баланс и глюкозната хомеостаза. Генетичните вариации в гените **ADIPOQ**, **LEPR** и **LEP** могат да допринасят за индивидуалните различия в риска от затлъстяване, инсулинова резистентност и диабет тип 2.



Фиг. 18. Сравнителен анализ на генотипните и алелните честоти, както и на съотношенията на шансовете (odds ratio, OR) за полиморфизмите (A) *LEPR Q223R* и (B) *ADIPOQ rs266729 (C/G)*. (C) Обобщаващият анализ (forest plot) представя OR с 95% доверителни интервали (95% CI) и показва, че полиморфизмът *ADIPOQ rs266729* има консистентен и статистически значим ефект във всички разгледани генетични модели, докато *LEPR Q223R* не демонстрира статистически значима асоциация, а лептиновият полиморфизъм показва тенденция към повишен риск без достигане на статистическа значимост. Генотипните и алелните честоти са сравнени чрез χ^2 (хи-квадрат) тест, а съотношенията на шансовете (OR) и 95% доверителните интервали (95% CI) са изчислени чрез логистична регресия.

При полиморфизма *LEPR Q223R* не се наблюдават съществени различия в генотипното разпределение между групите със затлъстяване и контролите (Фиг.18). Честотите на генотипите AA, AG и GG са сходни в двете групи, което предполага липса на връзка между този генетичен вариант и риска от затлъстяване. Анализът на съотношенията на шансовете потвърждава това наблюдение – стойностите на OR за AG и GG генотипите спрямо референтния AA са близки до единица, а доверителните интервали (95% CI) включват 1, което означава липса на статистическа значимост ($p > 0.05$). Аналогично, алелните честоти на A и G не се различават значимо между групите. В обобщение,

результатите показват, че полиморфизмът LEPR Q223R не е асоцииран със затлъстяване в изследваната популация (Фиг. 30).

За разлика от това, полиморфизмът ADIPOQ rs266729 (C/G) демонстрира ясна и статистически значима асоциация с риска от затлъстяване. Генотипното разпределение показва, че CC генотипът е по-чест при контролната група, докато CG и GG генотипите са по-чести при индивидите със затлъстяване. Анализът на OR разкрива значително повишен риск при носителите на G алела: хетерозиготният CG генотип е свързан с приблизително 2.4 пъти по-висок риск ($OR \approx 2.40$, $p = 0.002$), а хомозиготният GG генотип – с над 3.5 пъти по-висок риск ($OR \approx 3.55$, $p = 0.010$) спрямо референтния CC генотип. Освен това, G алелът като цяло също показва значима асоциация с повишен риск ($OR \approx 2.39$, $p = 0.001$). Наблюдава се ясно изразен дозозависим ефект, при който рискът нараства с броя на G алелите, което подкрепя биологичната значимост на този вариант.

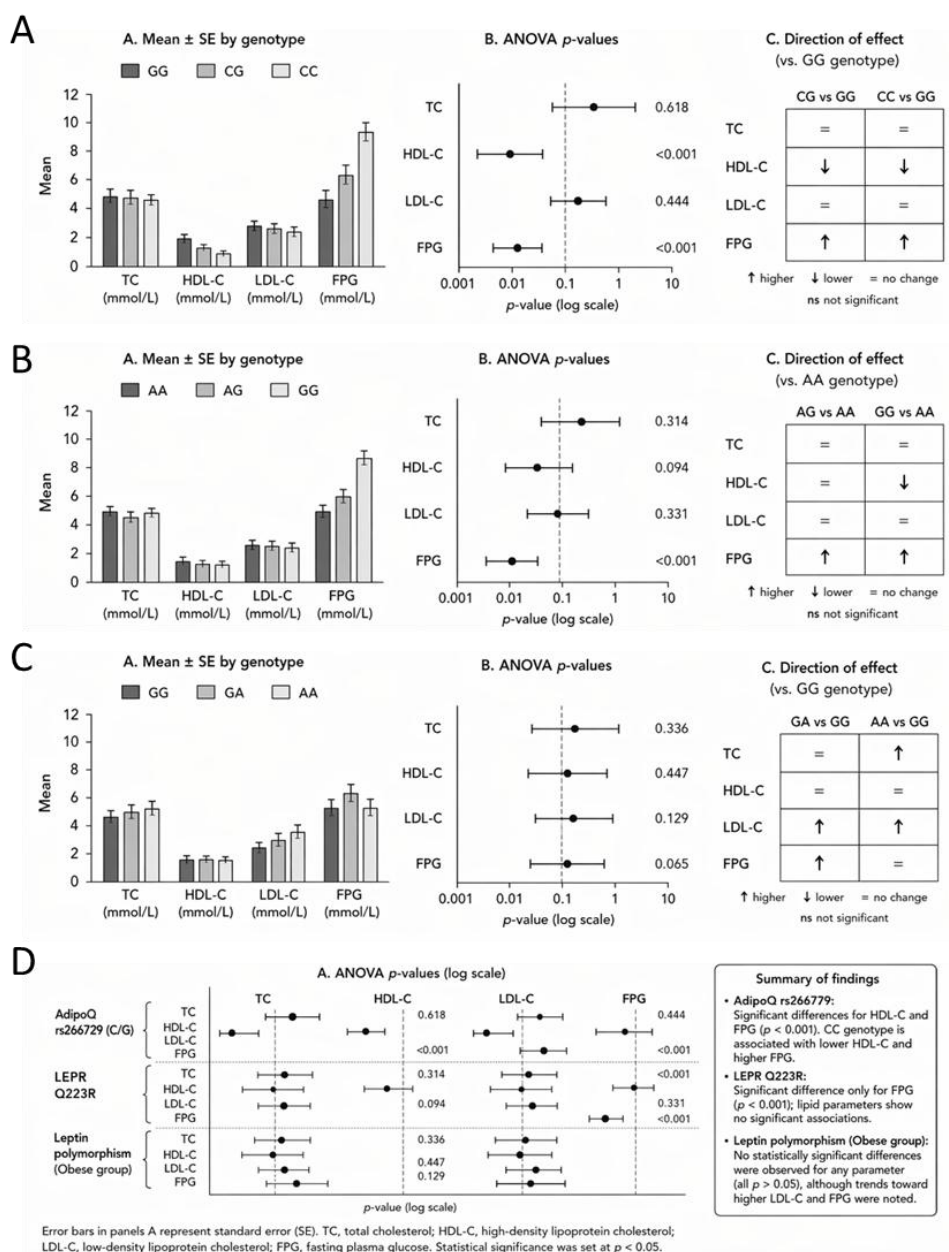
Обобщаващият анализ (forest plot) (Фиг. 30C) потвърждава тези резултати, като показва, че ADIPOQ rs266729 има консистентен и статистически значим ефект във всички разгледани модели, докато LEPR Q223R не демонстрира значима асоциация, а лептиновият полиморфизъм показва само несигнификантна тенденция към повишен риск.

Като цяло, фигурата ясно демонстрира, че генетичните ефекти върху затлъстяването са специфични за отделни сигнални пътища. Докато вариациите в гена ADIPOQ, свързани с адипонектиновата сигнализация и периферния метаболизъм, оказват съществено влияние върху риска, вариациите в LEPR, свързани с централната регулация на апетита, не показват значим ефект в тази изследвана популация. Това подчертава ролята на адипонектина като ключов фактор в метаболитната регулация и потенциален генетичен маркер за оценка на риска от затлъстяване и свързаните с него метаболитни нарушения. В настоящия анализ ADIPOQ rs266729 не показва статистически значима асоциация със затлъстяването, като генотипните разпределения между затлъстели и не затлъстели индивиди са сходни, а odds ratio стойностите са близки до единица с CI, включващи нулев ефект. По аналогичен начин липидните параметри, включително общ холестерол, HDL-C и LDL-C, не се различават значимо между различните генотипните групи. Въпреки това се наблюдава по-изразена тенденция при плазмената глюкоза на гладно, което предполага, че функционалното въздействие на този вариант е по-специфично свързано с инсулиновата чувствителност, отколкото с липидния метаболизъм или адипозността.

Адипонектинът играе ключова роля в метаболитната регулация чрез активиране на AMP-активирана протеин киназа (AMPK), което води до увеличен периферен глюкозен транспорт и потискане на чернодробната глюконеогенеза. Намалените нива на адипонектин или функционални промени в *ADIPOQ* са последователно свързани с инсулинова резистентност и развитие на T2DM. Полиморфизмът rs266729, локализиран в промоторната област на гена, може да влияе върху транскрипционната активност и серумните нива на адипонектин, което води до промени в глюкозната хомеостаза.

Мета-анализи показват, че връзката между *ADIPOQ* rs266729 и T2DM е умерена, но значима, особено в определени популации. Flindris K et al. съобщават за значима асоциация между този полиморфизъм и риска от диабет, като подчертават съществена хетерогенност между проучванията. Подобни резултати докладват и Veerabathiran R et al., като отбелязват, че *ADIPOQ* промоторните варианти са по-последователно свързани с инсулинова резистентност, отколкото със затлъстяване или липидни нарушения. Това съответства на наблюдаваните резултати в настоящото изследване, при което ефектът на rs266729 е най-ясно изразен върху глюкозната регулация.

По отношение на *LEPR Q223R* се наблюдава сходен модел на метаболитна специфичност. Не се установява статистически значима асоциация със затлъстяване, а липидните параметри също не показват значими различия между генотипите. Въпреки това плазмената глюкоза на гладно демонстрира силен и статистически значим генотип-зависим градиент ($p < 0.001$), при който стойностите прогресивно нарастват от AA към AG и GG генотипи. Това предполага дозово-зависим генетичен ефект, при който G алелът оказва неблагоприятно влияние върху глюкозната хомеостаза.



Фиг. 19. Полиморфизми и техните метаболитни параметри. (A) AdipoQ rs266729. (A)

Средни стойности $\pm$ стандартна грешка (SE) на TC, HDL-C, LDL-C и FPG по генотип. (B) ANOVA p -стойности (в логаритмична скала), показващи статистически значими различия за HDL-C и FPG ($p < 0.001$). (C) Посока на ефекта спрямо референтния GG генотип. (B) **LEPR Q223R.** (A) Метаболитни параметри по генотип. (B) Статистически значими различия се наблюдават единствено за FPG ($p < 0.001$). (C) Посока на ефекта спрямо референтния AA генотип. (C) **Лептинов полиморфизъм.** (A) Метаболитни параметри по генотип при индивиди с BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$. (B) Не се установяват статистически значими различия ($p > 0.05$). (C) Посока на ефекта спрямо референтния GG генотип. Грешките са представени като стандартна грешка (SE). TC – общ холестерол; HDL-C – HDL холестерол; LDL-C – LDL холестерол; FPG – глюкоза на гладно. Статистическа значимост се приема при $p < 0.05$. (D) представя сравнителен анализ на метаболитните ефекти на различни генетични полиморфизми чрез ANOVA p -стойности, изобразени в логаритмична скала. В анализа са включени полиморфизмите на AdipoQ rs266729, LEPR Q223R и лептинов полиморфизъм при затлъстели индивиди, като са оценени основни метаболитни параметри: общ холестерол (TC), HDL-холестерол (HDL-C), LDL-холестерол (LDL-C) и плазмена глюкоза на гладно (FPG).

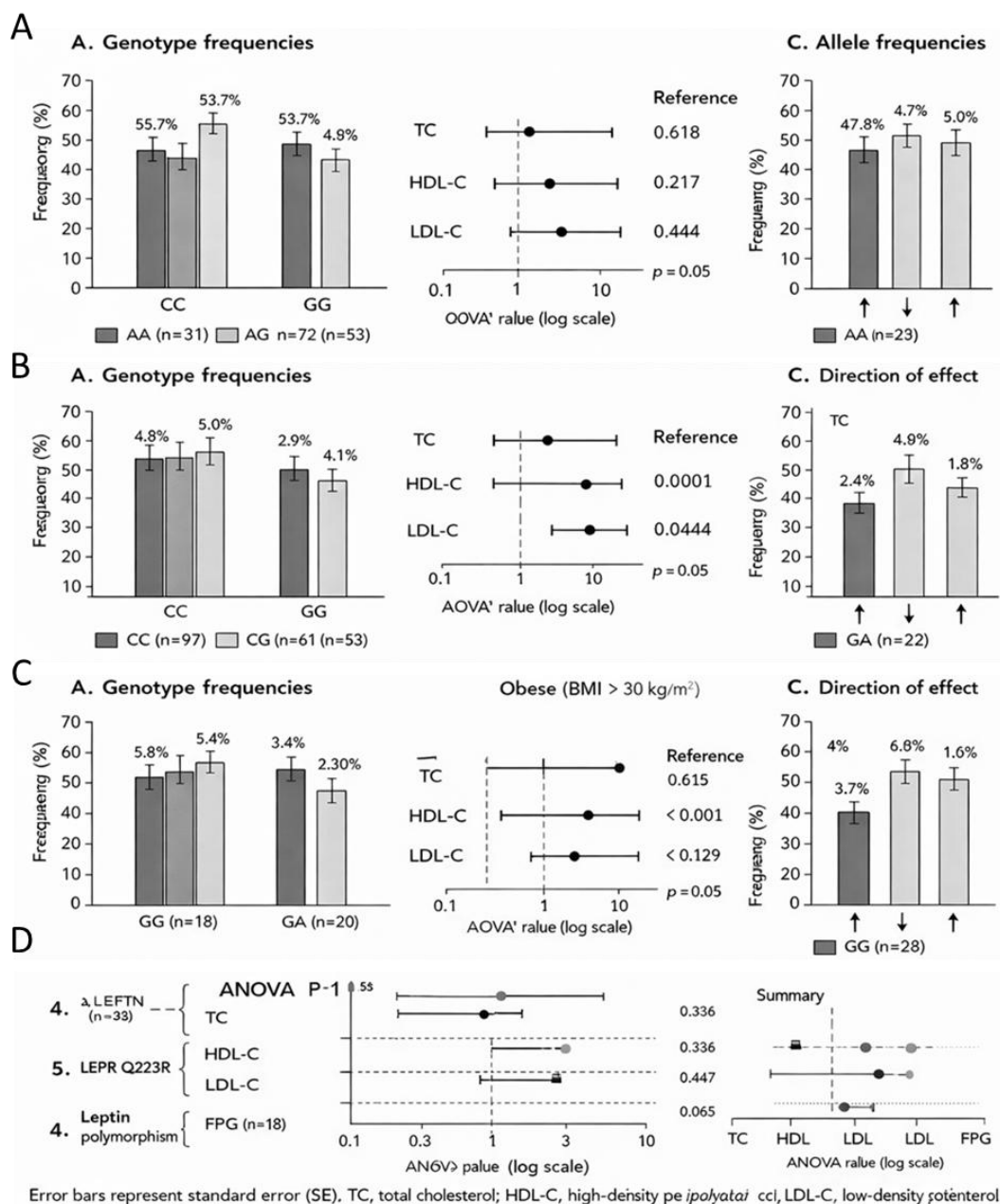
Резултатите показват, че полиморфизмът AdipoQ rs266729 е свързан със статистически значими промени в нивата на HDL-C и FPG ($p < 0.001$), като генотипът CG се асоциира с по-ниски стойности на HDL-C и по-високи нива на глюкоза на гладно. За разлика от това, при полиморфизма LEPR Q223R се установява статистически значима разлика единствено за FPG ($p < 0.001$), без съществени ефекти върху липидния профил (Фиг. 19). Относно лептиновия полиморфизъм при затлъстели индивиди ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), не се наблюдават статистически значими разлики за нито един от изследваните метаболитни параметри ($p > 0.05$), въпреки че се забелязват тенденции към повишени стойности на LDL-C и FPG.

Обобщено, фигурата подчертава, че плазмената глюкоза на гладно (FPG) е най-чувствителният метаболитен показател спрямо генетичните вариации, докато ефектите върху липидния профил са по-ограничени и зависят от конкретния полиморфизъм.

Анализът на вариацията (ANOVA) показва значима връзка между полиморфизма AdipoQ rs266729 и част от изследваните метаболитни параметри. Установени бяха статистически значими разлики за HDL-C и глюкоза на гладно (FPG) (и двете $p < 0.001$), докато за общия холестерол (TC) и LDL-C не се наблюдаваха значими различия ($p > 0.05$). Наблюдава се ясен генотип-зависим ефект, като CC генотипът е свързан с по-ниски стойности на HDL-C и по-високи нива на FPG, което предполага неблагоприятен метаболитен профил.

За полиморфизма LEPR Q223R статистически значими различия бяха установени само за FPG ($p < 0.001$), като най-високи стойности се наблюдават при носителите на GG генотипа. Не се установиха значими различия за липидните показатели (TC, HDL-C, LDL-C; всички $p > 0.05$), което предполага по-скоро специфичен ефект върху глюкозния метаболизъм.

При лептиновия полиморфизъм не бяха установени статистически значими разлики между генотипите за нито един от изследваните параметри (всички $p > 0.05$). Въпреки това се наблюдават тенденции към по-високи стойности на LDL-C и FPG при определени генотипи, които не достигат статистическа значимост.



Фиг. 20. Асоциация на полиморфизмите *AdipoQ* rs266729 (C/G), *LEPR* Q223R и лептиновия ген с метаболитните параметри при затлъстели индивиди. (A) *LEPR* Q223R. Средни стойности $\pm$ стандартна грешка (SE) на общ холестерол (TC), HDL-C, LDL-C и глюкоза на гладно (FPG) по генотип. (B) ANOVA *p*-стойности (логаритмична скала), показващи статистически значима разлика само за FPG ($p < 0.001$). (C) Посока на ефекта спрямо AA генотип. (B) (*AdipoQ* rs266729, C/G). (A) Средни стойности $\pm$ SE на метаболитните параметри по генотип. (B) ANOVA *p*-стойности, показващи значими различия за HDL-C и FPG ($p < 0.001$). (C) Посока на ефекта спрямо GG генотип. (C) Лептинов полиморфизъм. (A) Метаболитни параметри при затлъстели индивиди ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), представени като средни стойности $\pm$ SE. (B) Не се установяват статистически значими различия (всички $p > 0.05$). (C) Посока на ефекта спрямо GG генотип. (D) Сравнителен анализ на ANOVA *p*-стойностите между полиморфизмите за TC, HDL-C, LDL-C и FPG. Пунктираната линия обозначава нивото на статистическа значимост ($p = 0.05$).

Като цяло резултатите показват, че *ADIPOQ* rs266729 демонстрира най-силна и последователна връзка с метаболитните нарушения, следван от по-ограничения ефект на

LEPR Q223R върху глюкозния метаболизъм, докато **LEP -2548G>A** не показва значима обща асоциация в изследваната популация (Фиг. 20).

Мета-анализите показват, че връзката между **LEPR Q223R** и затлъстяването е слаба и хетерогенна, докато асоциацията с T2DM и гликемичните показатели е последователна. Това съответства на настоящите резултати, при които **ADIPOQ rs266729** и **LEPR Q223R** не са свързани със затлъстяването или липидния профил, но показват значима връзка с плазмената глюкоза на гладно. Тези данни предполагат, че основният ефект на двата полиморфизма е върху глюкозната хомеостаза и инсулиновата чувствителност, а не върху адипозността.

Функционално, адипонектиновата и лептиновата сигнализация се пресичат в общи метаболитни пътища, включително **AMPK**, **IRS-1/PI3K** и **GLUT4**-медиацията на транспорт на глюкоза. Нарушенията в тези механизми водят до понижена инсулинова чувствителност, повишена чернодробна глюконеогенеза и хипергликемия. Съвременните GWAS проучвания също показват, че затлъстяването и глюкозната регулация имат различна генетична архитектура, като гликемичните фенотипове са по-тясно свързани с ендокринни и метаболитни гени.

Полиморфизмът **LEP -2548G>A** проявява BMI-зависим ефект. При индивиди с нормално телесно тегло AA генотипът се асоциира с по-високи стойности на плазмената глюкоза и повишен риск от артериална хипертония, докато при затлъстелите този ефект вероятно се маскира от хиперлептинемията и лептиновата резистентност. Независимо от това, асоциацията с артериалната хипертония се запазва, което подкрепя концепцията за селективна лептинова резистентност.

Клинично, резултатите предполагат, че **ADIPOQ rs266729** и **LEPR Q223R** могат да бъдат потенциални генетични маркери за нарушена глюкозна регулация и риск от T2DM, докато **LEP -2548G>A** оказва влияние главно върху сърдечно-съдовия риск при затлъстяване. Ограниченията на изследването включват умерен размер на извадката, липса на показатели за инсулинова резистентност (HOMA-IR и инсулин на гладно) и невъзможност за оценка на взаимодействията ген–околна среда.

В заключение, интегрираният анализ показва, че генетичните вариации в **ADIPOQ**, **LEPR** и **LEP** влияят върху различни аспекти на метаболитния синдром. Най-силен и последователен ефект има **ADIPOQ rs266729**, докато **LEPR Q223R** е свързан предимно с глюкозната хомеостаза, а **LEP -2548G>A** проявява BMI-зависими ефекти върху глюкозния метаболизъм и артериалната хипертония. Тези резултати подчертават централната роля на адипокиновата сигнализация в ранната патогенеза на T2DM и

[illegible]

60

Q223R. Анализът е извършен чрез ANOVA, като р-стойностите са представени в логаритмична скала, което позволява по-ясно разграничаване на значимите и незначимите ефекти.

В лявата част на фигурата (Фиг. 21) са показани резултатите за различните генотипи (GG, GA, AA), като са представени съответните ANOVA стойности и доверителни интервали. При лептиновия полиморфизъм се наблюдава статистически значим ефект ($p \approx 0.001$), което показва съществена връзка между генотипа и изследваните метаболитни параметри. За разлика от това, при полиморфизма **LEPR Q223R** не се установяват статистически значими различия ($p \approx 0.324$ и $p \approx 0.088$), което предполага по-слаб или липсващ ефект върху метаболитния профил.

Дясната част на фигурата представя процентното разпределение на ефектите между различните генотипни сравнения (напр. GG спрямо GA), като визуализира относителната сила на асоциациите. Въпреки че се наблюдават определени разлики между групите, те не винаги достигат статистическа значимост.

Обобщено, фигурата показва, че лептиновият полиморфизъм има по-изразено влияние върху метаболитните показатели в сравнение с **LEPR Q223R**, като само част от наблюдаваните ефекти са статистически значими. Това подчертава различната роля на генетичните вариации в регулацията на метаболизма.

Липсата на асоциация със затлъстяването не означава липса на биологична значимост, а подкрепя концепцията за фенотипна специфичност, според която отделни генетични варианти влияят селективно върху определени метаболитни процеси. Това съответства на данните от консорциумите DIAGRAM и MAGIC, които показват различна генетична архитектура на глюкозната регулация и телесното тегло.

От клинична гледна точка идентифицирането на генетични варианти, свързани предимно с глюкозната хомеостаза, може да подпомогне ранното откриване на индивиди с повишен риск от T2DM, независимо от наличието на затлъстяване. Освен това BMI-зависимите ефекти на полиморфизма **LEP -2548G>A** подчертават потенциала за персонализирани стратегии за оценка и превенция на кардиометаболитния риск.

Основните ограничения на изследването са сравнително малкият размер на извадката, липсата на показатели за инсулинова резистентност (HOMA-IR и инсулин на гладно) и отсъствието на анализ на взаимодействията ген–околна среда.

В заключение, интегрираният анализ на **ADIPOQ rs266729**, **LEPR Q223R** и **LEP -2548G>A** показва, че вариациите в адипокиновата система оказват предимно влияние върху глюкозната регулация и инсулиновата чувствителност, докато ефектите им върху затлъстяването и липидния метаболизъм са ограничени. Допълнително, **LEP -2548G>A**

демонстрира връзка с артериалната хипертония при затлъстяване, което подчертава ролята му в кардиометаболитния риск. Тези резултати разширяват разбирането за молекулните механизми на T2DM и подкрепят използването на интегриран подход при оценката на генетичния риск.

V. Заключение

Настоящото проучване изследва връзката между фенотипните характеристики и генетичните вариации в адипокиновата сигнализация (ADIPOQ rs266729, LEPR Q223R и LEP -2548G>A) в контекста на затлъстяването и захарния диабет тип 2 (T2DM) в севернобългарска популация.

Фенотипният анализ установи метаболитен профил, характерен за метаболитния синдром, включващ повишен индекс на телесна маса, понижени серумни нива на HDL-холестерол и по-висока честота на артериална хипертония и T2DM при индивидите със затлъстяване. Липсата на значима разлика в нивата на плазмената глюкоза на гладно между групите вероятно отразява хетерогенността на гликемичния статус в изследваната популация.

Генетичният анализ показва, че ADIPOQ rs266729 е асоцииран с повишен риск от затлъстяване и T2DM. Носителството на G-алела и генотипите CG и GG се свързва със статистически значимо по-висок риск, както и с промени в плазмената глюкоза на гладно и HDL-холестерола, което предполага участие на този вариант в регулацията на инсулиновата чувствителност и глюкозната хомеостаза.

За LEPR Q223R не беше установена значима асоциация със затлъстяването или липидния профил, но се наблюдава генотип-зависима връзка с плазмената глюкоза на гладно (AA < AG < GG), което предполага адитивен ефект на G-алела върху глюкозната регулация. Полиморфизмът LEP -2548G>A не показва значима асоциация със затлъстяването или липидните показатели. Въпреки това се установиха генотип-зависими различия в нивата на плазмената глюкоза при контролната група и значима асоциация с артериалната хипертония при индивидите със затлъстяване, което предполага BMI-зависим ефект на този вариант.

Интегрираният анализ показва, че генетичните вариации в адипокиновата сигнализация оказват по-последователно влияние върху показателите на глюкозната хомеостаза, отколкото върху затлъстяването и липидния профил. Това подкрепя хипотезата, че нарушенията в адипокиновата сигнализация имат по-съществен принос за развитието на

инсулинова резистентност и T2DM, отколкото за развитието на адипозността като самостоятелен фенотип.

Резултатите следва да се интерпретират с оглед на ограниченията на проучването, включително относително малкия размер на извадката, дизайн тип „случай–контрол“ и липсата на директни показатели за инсулинова резистентност.

В заключение, настоящото проучване показва, че *ADIPOQ* rs266729 е най-силно асоцииран с повишен риск от затлъстяване и T2DM, докато *LEPR* Q223R е свързан предимно с нарушенията в глюкозната хомеостаза. Полиморфизмът *LEP* -2548G>A проявява по-ограничени и зависими от метаболитния контекст ефекти, главно по отношение на артериалната хипертония при затлъстяване. Получените резултати разширяват познанията за ролята на адипокиновата сигнализация в патогенезата на метаболитните нарушения и подкрепят необходимостта от бъдещи проучвания в по-големи и независими популации за потвърждаване на установените асоциации и изясняване на техните биологични механизми.

VI.Изводи

- В изследваната популация индивидите със затлъстяване се характеризират със статистически значимо по-висок индекс на телесна маса, по-ниски серумни нива на HDL-холестерол и по-висока честота на артериална хипертония и захарен диабет тип 2 в сравнение с контролната група. Тези резултати са в съответствие с фенотипните характеристики на метаболитния синдром.
- Получените данни предполагат наличие на асоциация между полиморфизма *ADIPOQ* rs266729 и повишената предиспозиция към затлъстяване и захарен диабет тип 2, като носителството на G-алела се свързва със статистически значимо по-висок риск в изследваната популация.
- Наблюдаваната генотип-зависима тенденция (CC < CG < GG), както и асоциацията на *ADIPOQ* rs266729 с нивата на плазмената глюкоза на гладно и HDL-холестерола, предполагат възможно участие на този полиморфизъм в нарушенията на глюкозната хомеостаза и липидния метаболизъм.
- За полиморфизма *LEPR* Q223R не се установиха убедителни доказателства за асоциация със затлъстяването или показателите на липидния профил. В същото време наблюдаваната връзка с нивата на плазмената глюкоза на гладно и генотип-зависимата тенденция (AA < AG < GG) са в съответствие с възможно участие на този вариант в регулацията на глюкозния метаболизъм.

- За полиморфизма *LEP* -2548G>A не се установи статистически значима асоциация със затлъстяването, захарния диабет тип 2 или липидния профил. Наблюдаваните различия в нивата на плазмената глюкоза на гладно в контролната група и асоциацията с артериалната хипертония при индивидите със затлъстяване предполагат, че ефектът на този вариант може да зависи от метаболитния контекст.
- В рамките на настоящото проучване асоциациите между изследваните генетични полиморфизми и показателите на глюкозната хомеостаза се очертават като по-последователни в сравнение с тези за липидния профил и степента на затлъстяване.
- Получените резултати са в съответствие с предположението, че генетичната вариабилност в гените *ADIPOQ*, *LEPR* и *LEP* може да допринася за индивидуалните различия в метаболитния риск, вероятно чрез механизми, свързани с адипокиновата сигнализация и глюкозната хомеостаза.
- Предвид ограниченията на настоящото проучване, включително размера на извадката и дизайна тип „случай–контрола“, получените асоциации следва да бъдат интерпретирани предпазливо и да бъдат потвърдени в по-големи, независими популации и чрез функционални изследвания.

VII. Приноси

1. Приноси с оригинален характер

- За първи път е проведен комплексен анализ на асоциацията между полиморфизмите *ADIPOQ* rs266729, *LEPR* Q223R и *LEP* -2548G>A и фенотипните прояви на метаболитния синдром в етнически хомогенна популация от Северозападна България.
- Получени са данни за разпределението на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми в изследваната популация, които разширяват наличната информация за генетичната структура на българската популация по отношение на тези генетични варианти.
- Установена е статистически значима асоциация между полиморфизма *ADIPOQ* rs266729 и повишения риск от затлъстяване и захарен диабет тип 2, както и с показателите на глюкозната хомеостаза и HDL-холестерола, което предполага

възможна роля на този генетичен вариант в индивидуалната предиспозиция към метаболитни нарушения.

- Получените резултати показват, че полиморфизмът *LEPR* Q223R не се асоциира със затлъстяването или липидния профил в изследваната популация, но може да бъде свързан с вариабилността в нивата на плазмената глюкоза на гладно.
- Установени са данни, предполагащи контекст-зависим ефект на полиморфизма *LEP* -2548G>A, изразяващ се в различни асоциации с показателите на глюкозната хомеостаза и артериалната хипертония в зависимост от фенотипната характеристика на изследваните лица.
- Чрез интегриран анализ на клиничните, биохимичните и генетичните данни е оценен относителният принос на изследваните генетични варианти към отделните компоненти на метаболитния синдром, като резултатите предполагат по-тясна връзка с нарушенията в глюкозната хомеостаза, отколкото с показателите на липидния профил или степента на затлъстяване.

2. Приноси с приложен характер

- Получените резултати разширяват наличната информация за разпределението на полиморфизмите *ADIPOQ* rs266729, *LEPR* Q223R и *LEP* -2548G>A в севернобългарска популация и могат да бъдат използвани като референтни данни при бъдещи генетични и епидемиологични проучвания.
- Установените асоциации между изследваните генетични варианти и отделни показатели на глюкозната хомеостаза предполагат, че включването на генетичната информация, наред с клиничните и биохимичните показатели, може да допринесе за по-прецизна оценка на индивидуалния кардиометаболически риск.
- Получените резултати подчертават необходимостта от комплексен подход при оценката на пациенти със затлъстяване и метаболитни нарушения, основан на съвместен анализ на фенотипните и генетичните характеристики.
- Данните от настоящото проучване създават предпоставки за последващо валидиране на *ADIPOQ* rs266729, *LEPR* Q223R и *LEP* -2548G>A като потенциални компоненти на мултигенни модели за оценка на риска от кардиометаболически заболявания.

- Получените резултати могат да бъдат използвани като основа за бъдещи проспективни, мултицентрови и функционални изследвания, насочени към изясняване на ролята на адипокиновата сигнализация в развитието на затлъстяването, захарния диабет тип 2 и свързаните кардиометаболитни нарушения.

VIII. Бъдещи насоки и перспективи

- Провеждане на проучвания с по-големи и мултиетнични кохорти с цел валидиране на установените асоциации и повишаване на статистическата мощност на анализа.
- Включване на допълнителни метаболитни показатели, като инсулин на гладно, НОМА-IR и HbA1c, за по-прецизна оценка на инсулиновата резистентност и глюкозната хомеостаза.
- Изследване на ген–среда взаимодействия, включително влиянието на диета, физическа активност и начин на живот върху ефекта на ADIPOQ, LEPR и LEP полиморфизмите.
- Функционални и молекулярни изследвания за изясняване на механизмите, чрез които rs266729, Q223R и -2548G>A влияят върху адипокиновата сигнализация и метаболитните пътища.
- Разработване и валидиране на полигенни рискови скорове (PRS), включващи изследваните полиморфизми, за по-точна предикция на T2DM и кардиометаболитен риск.
- Провеждане на лонгитудинални (проспективни) проучвания за оценка на причинно-следствените връзки между генотипите и развитието на метаболитни заболявания.
- Интегриране на генетичните данни с клинични и биохимични показатели с цел разработване на персонализирани превантивни и терапевтични стратегии.
- Изследване на потенциалната роля на адипонектиновата и лептиновата сигнализация като терапевтични таргети при T2DM и свързаните метаболитни нарушения.

IX. Публикации, участия в научни форуми и научен проект във връзка с дисертационния труд.

Публикации

1. K. Kovacheva, P. Nikolova, V. Hristov, D. Pendicheva, S. Marchev, **T. Rashev**. Preliminary data of a study on polymorphism rs4244285 of P4502C19 cytochrome gene in patients with acute coronary syndrome, undergoing treatment with dual antiplatelet therapy with Clopidogrel and Aspirin. Journal of Biomedical and Clinical Research, 2016, 9(1): 65-71; ISSN: 1313-6917; doi: 10.1515/jbcr-2016-0010; Web of Science
2. **Rashev TR**, Marinova DM, Dobrev M, Trifonov SV. *De novo design of a PCR-RFLP assay for detecting the leptin receptors single nucleotide polymorphism in hypothalamic nuclei*. Journal of IMAB, 2022, Supplement 12 SEEC & 32 IMAB, vol. 28, pp.59-62; ISSN: 1312-773X; Web of Science
3. Marinova DM, Dobrev ML, **Rashev TR**, Gerasimov IK, Nankov V, Trifonov SV. *Acetylcholine and its synthesizing enzyme choline acetyltransferase in the enteric nervous system*. Journal of IMAB, 2022, Oct-Dec, 28(4): 4671-4675; doi: 10.5272/jimab.2022284.4671; ISSN: 1312-773X; Web of Science

Участия

1. Desislava M. Marinova, **Tihomir R. Rashev**, Stefan V. Trifonov, Testing of primers and optimization of PCR for the detection of alternatively spliced variants of mouse ChAT mRNA, XXVI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, 29.09-01.10, 2023, Sofia.
2. **T. Rashev**, D. Marinova, M. Dobrev, S. Trifonov, De novo design of a PCR-RFLP assay for detecting the leptin single nucleotide polymorphism G – 2548A in the human genome, 20th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists – IFAA 2022, 5-7.08.2022.
3. **T. Rashev**, D. Marinova, M. Dobrev, S. Trifonov, De novo design of a PCR-RFLP assay for detecting leptin receptor single nucleotide polymorphism in hypothalamic nuclei, 12th South-East European Conference of chemotherapy, infections and cancer and 32st Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria, 20-23.10.2022, Trakia University, St. Zagora.

Проект D1/2021 - МУ-Плевен "Проучване носителството на полиморфизми G-2548A в лептиновия ген и Q223R в гена на лептиновия рецептор при пациенти със затлъстяване и метаболитен синдром"

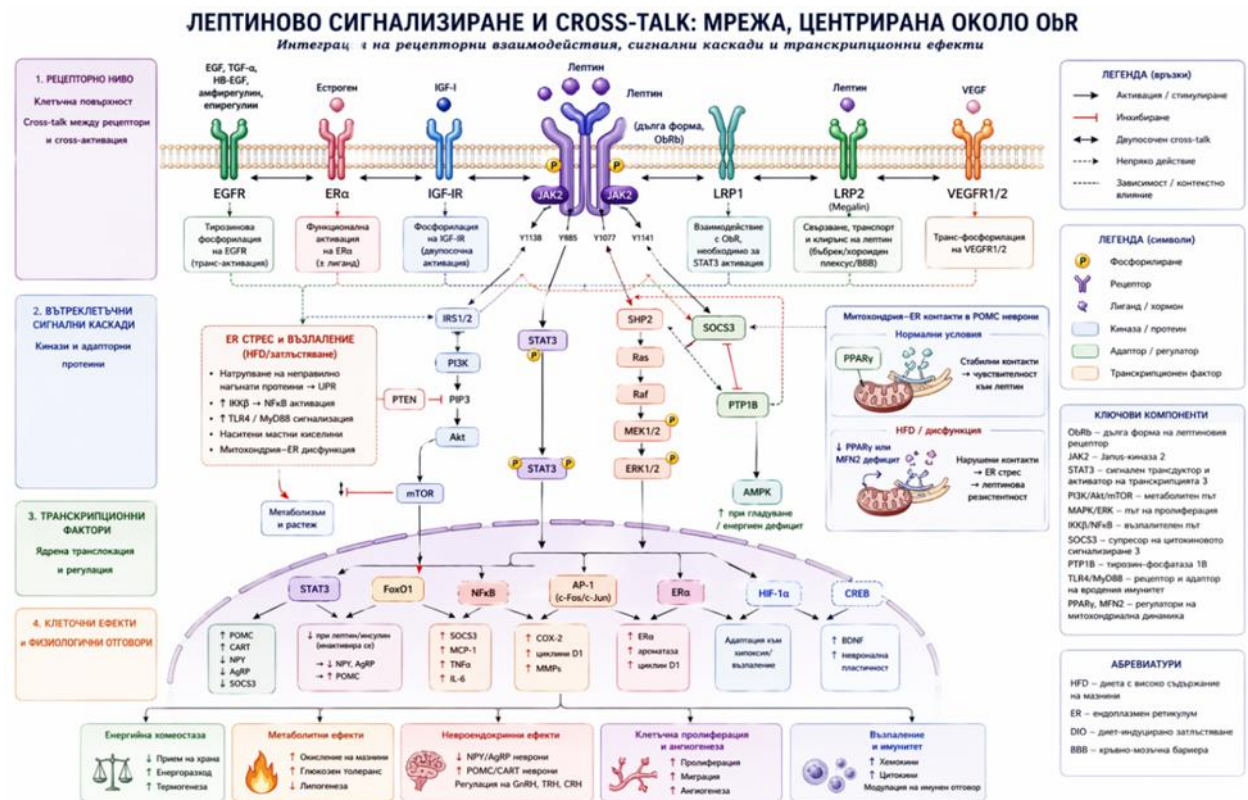
Приложение 1

Обзор на проучванията, описващи cross-talk и/или кръстосана активация на Ob-R (лептиновия рецептор)

Receptor System	Model Type	Experimental Model	Key Effects of Leptin	Reference
-----------------	------------	--------------------	-----------------------	-----------

EGFR	In vitro	Gastric cancer cells (MKN28, MKN74)	↑ EGFR phosphorylation; EGFR inhibitor (AG1478) блокира JAK2 и ERK1/2	(237)
	In vitro	Breast cancer cells (MCF7, MDA-MB-231)	↑ пролиферация, миграция, survivin, Notch-I, EGFR phosphorylation	(238)
	In vitro	Esophageal cancer cells	↑ пролиферация, ↓ апоптоза, ↑ EGFR/ERK1/2; инхибитори блокират ефекта	(239, 240)
	In vitro	Rat vascular smooth muscle	↑ EGFR, ERK1/2, endothelin-1	(241)
	In vitro	Gastric mucosal cells	↑ EGFR, cPLA2; защита от цитотоксичност	(242)
	In vitro	Salivary gland cells	↑ EGFR, cPLA2; защитен ефект	(243)
	In vitro	HEK293T (transfected)	Long & short ObR → EGFR activation	(244)
	In vivo	Rat kidney	↑ Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, H ₂ O ₂ , ERK1/2	(245)
ERα	In vitro	Breast cancer cells	ERα необходим за STAT3 activation; ↑ клетъчна жизнеспособност	(246)
	In vitro	MCF7	↑ aromatase чрез STAT3/ERK	(247)
	In vitro	MCF7, HeLa	↑ nuclear ERα; ↑ expression	(248)
	In vitro	MCF7	↑ ERα levels	(249)
	Ex vivo	Breast cancer patients	Корелация ObR ↔ ERα	—
	In vivo	Mouse xenograft	↑ ERα, ↓ ERβ	(250)
IGF-IR	In vitro	Breast cancer cells	Co-IP ObR + IGF-IR; IGF-I → ObR phosphorylation	(251)
	In vitro	Breast cancer cells	Bidirectional activation; синергия с EGFR; ↑ метастаза	(252)
LRP1	In vivo	Knockout mice	↓ leptin signaling; obesity	(253)
			LRP1 необходим за STAT3 activation	
LRP2 (Megalin)	In vivo/in vitro	Multiple species	↑ leptin uptake (kidney, cells)	(254)
	In vivo	Rats	Transport през choroid plexus	(255)
	In vivo/in vitro	Rats, cells	Binding (Ca ²⁺ -dependent), internalization, degradation	(256)

VEGFR	In vitro	HUVEC cells	↑ proliferation, COX-2, VEGFR2 phosphorylation	(257)
	In vitro	Endothelial cells	Trans-phosphorylation VEGFR1/2; ↑ Notch, angiogenesis	(258)



Приложение 2А

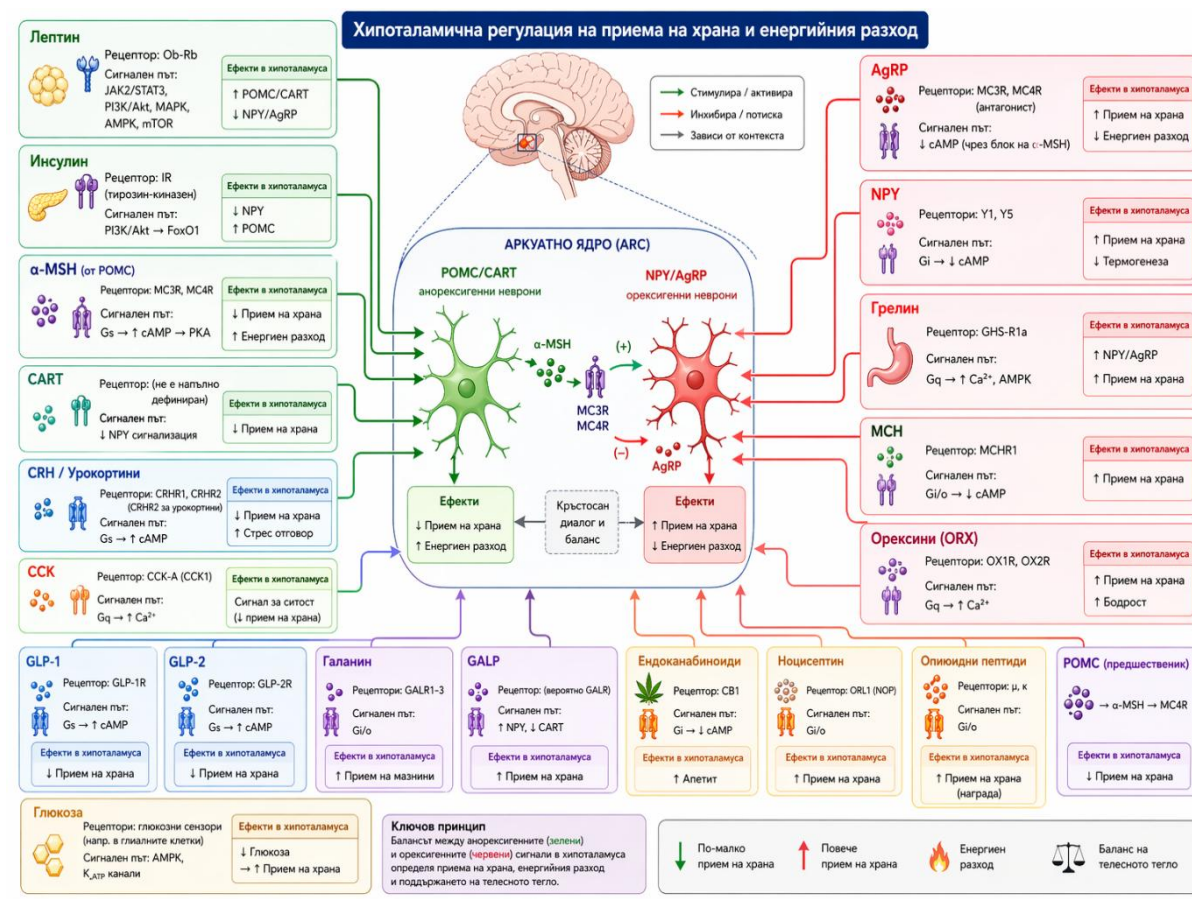
Функционално ориентирана таблица с включени рецептори и основни сигнални пътища в хипоталамусните ядра

	Ефект	Рецептори	Основни сигнални пътища	Основни ефекти в хипоталамуса
AgRP	Орексигенен	MC3R, MC4R (антагонист)	↓ cAMP (чрез блок на α-MSH)	↑ хранене, ↓ енергиен разход
α-MSH (POMC)	Анорексигенен	MC3R, MC4R	Gs → ↑ cAMP → PKA	↓ хранене, ↑ енергоразход
NPY	Силен орексигенен	Y1, Y5	Gi → ↓ cAMP	↑ хранене, ↓ термогенеза
CART	Анорексигенен	(не напълно дефиниран)	↓ NPY сигнализация	↓ хранене

Лептин	Анорексигенен	Ob-Rb	JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK, AMPK, mTOR	↑ POMC/CART, ↓ NPY/AgRP
Инсулин	Анорексигенен	IR (тирозин-киназен)	PI3K/Akt → FoxO1	↓ NPY, ↑ POMC
Грелин	Орексигенен	GHS-R1a	Gq → ↑ Ca ²⁺ , AMPK	↑ NPY/AgRP
MCH	Орексигенен	MCHR1	Gi/o → ↓ cAMP	↑ хранене
Орексини (ORX)	Орексигенни	OX1R, OX2R	Gq → ↑ Ca ²⁺	↑ хранене, ↑ бодрост
CRH	Анорексигенен	CRHR1, CRHR2	Gs → ↑ cAMP	↓ хранене, ↑ стрес отговор
Урокортини	Анорексигенни	CRHR2	Gs → ↑ cAMP	↓ апетит
ССК	Анорексигенен	CCK-A (CCK1)	Gq → ↑ Ca ²⁺	Сигнал за ситост
GLP-1	Анорексигенен	GLP-1R	Gs → ↑ cAMP	↓ хранене
GLP-2	Анорексигенен	GLP-2R	Gs	↓ хранене
Галанин	Орексигенен	GALR1–3	Gi/o	↑ прием на мазнини
GALP	Орексигенен	(вероятно GALR)	↑ NPY, ↓ CART	↑ хранене
Ендоканабиноиди	Орексигенни	CB1	Gi → ↓ cAMP	↑ апетит
Ноцисептин	Орексигенен	ORL1 (NOP)	Gi/o	↑ хранене
Опиоидни пептиди	Орексигенни	μ, κ рецептори	Gi/o	↑ хранене (reward)
POMC	Анорексигенен	(прекурсор)	→ α-MSH → MC4R	↓ хранене
Глюкоза	Регулатор	(глюкозни сензори)	AMPK, КАТР канали	↓ глюкоза → ↑ хранене

Приложение 2В

Функционално ориентирана схема с включени рецептори и основни сигнални пътища на хипоталамусните ядра



Приложение 3

Информационен лист за пациента

Заглавие на проекта:

„ПРОУЧВАНЕ ЗА НОСИТЕЛСТВОТО НА ЛЕПТИН G-2548A И ЛЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР Q223R, ADIPONECTIN rs266729 ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ“

Обяснения и информация за пациента относно същността на проекта:

Уважаеми Господине/Госпожо/Госпожице,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие. Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори, моля, попълнете формуляра, като с това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от лекари от Медицински университет – Плевен.

По всички интересувачи Ви въпроси можете да се отнасяте към водещия изследовател, доц. Стефан Венелинов Трифонов към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, Медицински университет – Плевен;

Бихме искали да Ви помолим да участвате в проекта, за да получим отговор на въпроса дали заболяването Ви има генетична основа и дали повишението на определен вид мастни частици в кръвта, повишените нива на глюкоза на гладно, хипертоия и затлъстяването имат генетична основа. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за причините, водещи до това заболяване. Това би определило по-точно от сега съществуващите методи кои са рисковите пациенти, за да се определи най-подходящият лечебен подход за всеки пациент.

Проектът ще продължи 1 година.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно заболяванията, от които страдате сега или сте страдали в миналото, както и някои лични данни – рождена дата, адрес и телефони на Вас и на Ваши близки, за да може да се осъществява контакт с Вас и след като бъдете изписан(а) от болницата. Данните ще се нанасят в Карта на пациента – документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, задължително изисквани при болни с дегенеративна аортна стеноза, ще Ви бъдат взети допълнително около 10 мл венозна кръв, за ДНК-анализ за изследване. Вземането на кръв за това изследване не надвишава рисковете, свързани с вземане на венозна кръв за задължителните изследвания при пациенти с Вашето заболяване. Този риск ще бъде минимизиран поради това, че кръвната проба ще се взема от обучен персонал и при задължително спазване на утвърдените изисквания за вземане на венозна кръв.

Не са предвидени средства в проекта за обезпечаване на Вашите транспортни разходи, свързани с осъществяване на контролните прегледи.

Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна. Определени упълномощени лица – изследователи, участници в настоящия проект, ще имат достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност. Не са предвидени компенсации в случай на претърпени вреди от участие в изследването и допълнителните грижи, тъй като от участието Ви в научния проект не произтичат допълнителни рискове или те са минимални, при спазване на условията за безопасност и при вземането на кръвна проба от обучен персонал.

Формуляр за информирано съгласие

Заглавие на проекта:

„ПРОУЧВАНЕ ЗА НОСИТЕЛСТВОТО НА ЛЕПТИН G-2548A И ЛЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР Q223R ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ“

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения (**подчертава се вярното твърдение**).

Бях помолен да се съглася сам Да Не

Прочетох Информационния лист на пациента Да Не

Дадена ми бе възможност да задам всички
важни за мен въпроси и да обсъдя този проект Да Не

Получих удовлетворяващи ме отговори
на всички мои въпроси Да Не

Получих достатъчна информация относно проекта Да Не

Проектът ми беше обяснен, зададох въпросите си и получих отговори на тях
от.....

(име на изследователя)

.....

(Подпис на изследователя)

Разбирам, че съм свободен да се откажа от участие в проекта по всяко време, без да давам обяснения за отказа си и без това да повлияе на полагащите ми се в бъдеще медицински грижи.

Дата:.....

Име, презиме, фамилия на пациента:

.....

Подпис на пациента:.....

Приложение 4

Солева екстракция на ДНК

За извършването се използва венозна кръв с обем от 3 до 10 ml, взета в епруетка с EDTA(EDTA K₂ и VENOJECT 0II). Ако кръвта е хемолизирана, съсирена или в по-малък обем, тази методика не гарантира количеството и качеството на изолираната ДНК. Ако изолирането на ДНК не може да бъде осъществено веднага, кръвните проби могат да се съхраняват няколко часа на стайната температура, 48 часа при 4°C градуса и няколко месеца при -20°C. Използването на специалния епруетка на Beckton Dickenson позволява съхранението и транспорта на пробите при стайната температура до 72 часа.

I. Получаване на клетъчно ядрен лизат.

В 50ml конична пластмасова епруетка се поставят от 3 до 10 ml венозна кръв с EDTA и еритроцит лизиращ буфер (1x Lysis Buffer) до 40 ml. Разбърква се добре, като епруетката се обръща няколко пъти и се оставя за 30 минути на лед и вода. Центрофугира се 10 минути при 3000 rpm оборота, при 4°C или 18°C. Ядрата на белите кръвни клетки се утаяват, а със супернатантата остават други клетъчни компоненти. Супернатантата се използва внимателно, утайката се суспендира добре в 20 ml студен еритроцитлизиращ буфер. Центрофугира се 10 минути при 3000 rpm при 4°C или 18°C градуса. Супернатантата се излива и към утайката от клетки се добавя 5 ml нуклеолизиращ буфер (SE Buffer). Утайката се ресуспендира.

II. Разграждане на примеси от белтъци и РНК лизатите.

Първо, в епруведка съдържаща суспендираните клетки се добавят 25 μ l протеиназа К, (10 mg /ml) и 400 μ l 10% SDS. Разбърква се леко и се инкубира при 37°C градуса цяла нощ или 12 часа, при 55°C градуса за 5 часа. Лизирането клетките се контролира визуално. При добър лизис разтворът се избистря и не опалесцира.

III. Пречистване на получената ДНК чрез изоляване.

Първо, в епруведката лизата се добавят 2 ml 6M NaCl и се разбърква на вортекс за 15 секунди. След това се центрофугира се 15 минути при 3000 rpm оборота в секунда. ДНК остава в супернатантата, а примесите се утаяват.

IV. Преципитация на очистената ДНК.

Супернатантът, съдържащ ДНК, се прехвърля в нова епруведка и се прибавят два обема студен абсолютен етанол. ДНК видимо преципитира, като се навива на кълбо и изплува на повърхността. Ако екстрахираната ДНК трябва да бъде съхранена в ДНК банка, на този етап тя се прехвърля в епруведка с 96% етанол.

Утаената ДНК с изваждаш чиста запоена пастъорова пипета и след промиване с 1 ml 80% етанол, се оставя да изсъхне на въздуха. Изолирант ДНК се разтваря в ТЕ буфер в обем между 300 μ L и 1,5 ml в зависимост от количеството и. Епруветката се запечатява добре с парафилм, надписва се и се оставя на клатачна на машина на стайна температура за една нощ за да се разтвори изолираната ДНК. Очакваният добив от 10 милилитра кръв, очакваният добив от 10 милилитра кръв е 300 до 800 μ g ДНК.

ДНК-Полиморфизми (индиректен ДНК анализ)

Индивидите се отличават помежду си по различните алели, които притежават за един и същ генен локус, в не кодиращи участъци от ДНК. Това осигурява, от една страна огромно генетично разнообразие в популациите, от друга страна генетична-уникалност на индивидите.

Различията между индивидите, по отношение на нуклеотидните последователности в не кодиращи участъци на ДНК характеризират явлениято ДНК-полиморфизъм.

Определение-Един генен локус се счита за полиморфен, ако честотата на най-редкия алел в него е по-голяма или равна на 1%, или честотата на най-честия алел е по-малка или равна на 99% за конкретната популация. Полиморфен генен локус (полиморфизъм), който е достъпен за анализ, може да бъде използван като генетичен маркер при диагностика на наследствени заболявания. При това най-ценни за ДНК анализ са тези генетични маркери, които са най-полиморфни, т.е. които притежават голям брой алели със значими честотити $\geq 1\%$, в съответната популация.

Разположение на ДНК полиморфизмите – извън нуклеотидните последователности на определен ген, в некодиращи участъци на ДНК, тези изменения имат характер на неутрални промени.

Вътре в нуклеотидните последователности на гена, в интронни участъци, тези изменения обикновено нямат функционално значение и затова не са свързани с фенотипен ефект. Много рядко ДНК-полиморфизми могат да бъдат разположени в кодиращи участъци, но също без да имат фенотипна изява.

Унаследяване. ДНК-полиморфизмите се унаследяват в потомството, като а кододоминантни белези, тоест детето наследява по един алел от всеки родител,

Значения на ДНК полиморфизмите. Осигуряват огромно генетично разнообразие в популациите. Осигуряват генетична уникалност на индивидите. Повечето полиморфизми нямат клиничен ефект, тоест не са свързани с клиничен фенотип. Независимо от това, те могат да се използват в качеството на генетични маркери, когато отговарят на определени изисквания. Висока полиморфност на маркера, разположение близо или вътре в интересувания ни ген.

Видове ДНК полиморфизми. Това са полиморфизми, свързани със замяна на един нуклеотид с друг (еднонуклеотидни замени).

- Характеристика – биалелни, всеки индивид носи по два алела за определен генен локус.
- Максимална хетерозиготност 50%, възможни генотипи +/+; +/-; -/-;.
- Информационно съдържание ниско.

SNP.

- не засягат рестрикционни места;
- анализират се най-често чрез директно секвениране.

RFLP – полиморфизъм по дължината на рестрикционния фрагмент

- засягат рестрикционно място;
- анализират се най-често с рестрикционен анализ.

Полиморфизми в тандемно повторени последователности или полиморфизми по дължината на повторите

- Синоними
- Характеристика-мултиалелни
- максимална хетерозиготност над 70 до 99%,
- информационно съдържание-високо полиморфни.