



МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ И АНАЛИЗИ

Елена Йорданова Кузова

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА УСВОЯВАНЕТО НА ХРАНИТЕЛНИ ВЕЩЕСТВА

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност:
Професионално направление: 7.1. Медицина
Научна специалност: “Хранене и диететика“

Научни ръководители:
Проф. Цвета Петрова Георгиева, дм
Проф. д-р Веселка Лалева Дулева, дм

СОФИЯ, 2021 г.

Дисертационният труд е представен на 180 стандартни страници и е онагледен с 32 фигури и 22 таблици. Библиографията включва 178 литературни източника – 6 на кирилица и 172 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 4 статии.

Номерацията на таблиците и фигурите не отговаря на тези в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на 11.03.2021 г. на Колегиум на дирекция “Обществено здраве и здравен риск”, разширен с академичен състав от дирекция „Аналитични и лабораторни дейности“ в НЦОЗА.

Научният труд от части е финансиран от Комисия по финансиране на научно-изследователски проекти, МУ-Плевен, по съвместен проект №3/2016г. с тема „Проучване на генотипа (единични нуклеотидни полиморфизми в FADS1 гените) и липидния метаболизъм за модифициране на хранителния прием“.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 27.04.2021 г в НЦОЗА, бул. Акад. Иван Гешов № 15.

*Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Научния съвет към НЦОЗА, както и на сайта на НЦОЗА:
<http://ncpha.government.bg>*

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
IV. АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	14
4.1. Дизайн на проучването	14
4.2. Разработване и имплементиране на методология за анализ на rs174547 генетичен полиморфизъм	15
4.3. Клинични и биохимични показатели на участниците в проучването	23
4.4. Определяне на алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на rs174547 SNP полиморфизъм в гена FADS1 сред българската популация	27
4.5. Честота на консумация на обичайни групи храни, богати на полиненаситени мастни киселини	31
4.6. Изследване връзката между генотипа и биохимичните маркери за оценка на холестероловия профил	39
4.7. Влияние на еднонуклеотидния полиморфизъм rs174547 във десатуразния ген FADS1 върху изявата на метаболитен синдром	41
4.8. Взаимодействие между хранителния прием на мастни киселини, холестероловия профил и генотипа	42
V. ИЗВОДИ	51
VI. ПРИНОСИ	53
VII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ИЗЯВИ И ПРОЕКТИ	54
VIII. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ	57

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

КБС	коронарна болест на сърцето;
МСБ	мозъчно-съдови болести;
T2Д	диабет тип 2;
AA	Arachidonic Acid, арахидонова киселина;
ALA	alpha-Linoleic Acid, алфа-линоленова киселина;
BG	Blood Glucose, кръвна глюкоза;
BMI	Body Mass Index, индекс на телесна маса (ИТМ);
BMR	Basal Metabolic Rate, базално метаболитно ниво;
DHA	Dokosahexaenoic Acid, докозахексаенова киселина;
D5D (Δ5D)	delta-5-desaturase, делта-5-десатураза;
D6D (Δ6D)	delta-6-desaturase, делта-6-десатураза;
EPA	Eikosapentaenoic Acid, ейкозапентаенова киселина;
FADS	Fatty Acid Desaturase, десатураза на мастните киселини;
FFM	Free Fatty Mass, свободна мастна тъкан;
FFQ	Food Frequency Questionnaire, анкетна карта за честота на консумация на храна;
FM	Fatty Mass, мастна тъкан;
HDL	High Density Lipoproteins, липопротеини с висока плътност;
НОСО	High Oleic Conola Oil, масло от рапица с високо олеиново съдържание;
LA	Linolic Acid, линолова киселина;
LC-PUFA	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid, дълговерижна полиненаситена мастна киселина;
LDL	Low Density Lipoproteins, липопротеини с ниска плътност;
MAF	Minor Allele Frequency, честота на минорния алел;
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids, мононенаситени мастни киселини;
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid, полиненаситена мастна киселина;
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction, полимеразно-верижна реакция с откриване в реално време;
SCORE	Systematic Coronary Risk Evaluation, системна оценъчна скала за определяне на коронарен риск;
SFA	Saturated Fatty Acids, наситени мастни киселини;
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, единичен нуклеотиден полиморфизъм;
TAG	triacylglycerol, триацилглицерол;
TG	triglycerides, триглицериди.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Въвеждането на молекулярно-генетични биомаркери позволява индивидуална оценка на метаболитните пътища и поведението на основните ензими, отговорни за преобразуване на хранителните вещества. Това от своя страна обогатява нутригенетичния информационен фонд, а панелите от добре изучени генни варианти и тяхното взаимодействие с нутриентите, могат да послужат за изготвяне на прецизни персонализирани хранителни режими.

Гените FADS1 и FADS2 кодират десатуразите, които са основни ензими в метаболизма на полиненаситените мастни киселини. Идентифицирани са около 500 единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в двата гена, като за няколко SNPs е установено, че понижават активността на десатуразите и оттам занижават нивата на дълговерижните ненаситени мастни киселини (LC-PUFAs). При определени генотипове обаче, може да се наблюдава и по-висока десатуразна активност. Като следствие се получава по-голямо количество на LC-PUFAs (арахидонова или ейкозапентаенова и докозаhexаенова киселини) от техните прекурсори (съответно линолова или алфа-линоленова киселини).

В последното десетилетие постиженията на генетиката на храненето позволяват както развитието на хранителната епидемиология, така и индивидуалния подход при хора и групи от хора с определен риск от развитие на неблагоприятни здравословни състояния.

Проучвания на българската популация, доказват изключително нисък прием на омега 3-мастни киселини, поради ниска консумация на риба. Тези констатации и липсата на данни за България относно генетичните варианти на FADS1 са предпоставка за провеждане на задълбочени проучвания, както на рискови групи, например пациенти със сърдечно-съдови заболявания, дислипидемии или хранителен дефицит на LC-PUFAs, така и при здрави хора.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Целта на настоящия научен труд е да се разработи молекулярно-генетичен метод за детекция и да се определи значението на генетичния вариант rs174547 във FADS1 гена при метаболизма на наситените и ненаситените мастни киселини, постъпили с храната.

Да се определи потенциала на дадения единичен нуклеотиден полиморфизъм rs174547 като молекулярно-генетичен маркер, който да се включи в панел от нутригенетични изследвания, с цел изготвяне на персонализиран хранителен план.

ЗАДАЧИ

За изпълнението на поставената цел бяха определени следните задачи:

1. Да се разработи и валидира подходяща молекулярно-генетична методология за генотипиране на rs174547
2. Да се определи генотипа на доброволци спрямо генетичния вариант rs174547 във FADS1 гена.
3. Да се определи честотата и разпределението на генните варианти rs174547 на FADS1 гена сред българска популация.
4. Да се оцени хранителния прием на наситени и ненаситени мастни киселини, постъпили чрез храната.
5. Да се оцени влиянието на конкретния генетичен вариант на FADS1 гена върху метаболизма на мастните киселини, а оттам и върху липидния статус и потенциалните рискове за здравето.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 Изследвана група

Общо 123 доброволци от регионите Плевен и София, на възраст от 28 до 65 години, са изследвани за генния им вариант по отношение на *rs174547* във *FADS1* гена. От тях 43 са мъже (43/123, 35%) и съответно 80 жени (80/123, 65%). Оценено беше общото им здравословно състояние чрез снемане на антропометрични данни и попълване на анкета за начина на живот. Липидният профил включваше изследване на триглицериди, общ холестерол, HDL и LDL холестерол и кръвна захар. Чрез анкетни методи се събра информация за общия хранителен прием, данните бяха обработени с софтуерна програма и изчислени енергия, микро- и макро- нутриенти, витамини. В хода на дисертационният труд при една от доброволките се установи бременност. Съответно е проведен генетичен тест, както и са получени валидни данни за нейния общ здравен статус, хранителен прием и начин на живот, но не са налични валидни антропометрични и биохимични данни. Връзката с други две доброволки е загубена и в резултат при тях единствено е осъществено тестване на генетичните маркери. Съответно, техните резултати са включени в статистическия анализ за разпространение и разпределение на *rs174547* сред българска популация, но липсата на друга подробна информация за тях налага изключването им от анализа и обсъждането им в основното проучване. На всеки доброволец беше взета ДНК проба по неинвазивен метод, и чрез молекулярно-генетични подходи беше определен генния вариант при всеки индивид.

3.2 Методи за оценка на общо здравословно състояние и липиден профил

▪ Антропометрични данни

Измерват се ръст (m) и тегло в килограми (kg), изчислява се индекс на телесна маса (ИТМ) в kg/m². Ръстът и теглото се измерват двукратно при всички изследвани лица, записват се и двете стойности и се взима усреднената стойност, при наличие на разлики. Извършват се измервания на обиколките на талия (см) и ханш (см), двукратно като се взима средна стойност.

▪ **Бодиимпедансметрия**

За метода на биоелектричен импеданс анализ беше използван професионален телесен анализатор марка „Танита“ - ВСА–ТВF-300М.

Измерени бяха следните параметри:

- телесно тегло в kg,
- импеданс (биоелектричното съпротивление на тялото в Ω);
- мастна тъкан (FM) в kg
- мастна тъкан в %,
- свободна мастна маса (FFM) в kg,
- обща вода в организма (TBW) в kg,
- индекс на телесна маса (ИТМ)
- основна обмяна в килоджаули (kJ) и килокалории (kcal)

▪ **Клинико и биохимични изследвания**

За анализ и оценка на липидния профил са изследвани следните кръвни показатели, чиито референтни стойности са дадени в **Таблица 1**.

- Триглицериди (mmol/L)
- Общ холестерол (mmol/L)
- HDL холестерол (mmol/L)
- LDL холестерол (mmol/L)
- Кръвна захар (mmol/L)

Артериално налягане - двукратно, през 5 минутен интервал от квалифициран медицински персонал се извършва измерване на систолното и диастолно артериално налягане на пациентите в седнало положение на дясна ръка.

Таблица 1. Референтни стойности на биохимичните показатели в липиден профил

Показател	Референтни стойности, (mmol/l)	
	жени	мъже
Кръвна захар	7.0 mmol/l на гладно и 11.1 mmol/l след натоварване с глюкоза или хранене**	
Триглицериди	0.3-1.7	
Общ холестерол Chol total	3.5-5.2	
HDL	без риск > 1.68 умерен риск 1.15 – 1.68 висок риск <1.15	без риск >1.45 умерен риск- 0.90 – 1.45 висок риск <0.90
LDL	Оптимални нива Близо до оптималните Гранично високи Високи Много високи	< 2.59 2.59-3.36 3.37-4.13 4.14-4.89 ≥4.90

* Референтни стойности съгласно препоръките на Европейската общност по атеросклероза (1)

** Референтни стойности съгласно ръководство и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет (2)

3.3 Молекулярно генетични лабораторни методи

▪ Събиране на биологичен материал, съхранение и предварителна обработка на пробите

Проба от букална лигавица се събира от вътрешната страна на бузата посредством стерилен тампон (15.2 см., индивидуално опаковани Кат.№ 25-1506 1 PF 100, Progen ООД) и се поставя в 200 µl PBS буфер (рН 7.4) за по-нататъшно извличане на ДНК, като съхранението на така разтворената букална лигавица става в хладилни условия (1-4°C) за не повече от 2 дни. При невъзможност тампона с натривката от букална лигавица да

бъде размит в PBS буфер веднага, той се съхранява в оригиналната опаковка, за да се изсуши и да се избегне растежа на бактериална микрофлора, обитаваща нормално устната кухина.

▪ **Екстракция на ДНК от биологичен материал**

Екстракцията на ДНК се извършва с помощта на Gene GET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No:K0721) от проби от букална лигавица, в съответствие с препоръките на производителя. Наборът за екстракция Gene GET Genomic DNA Purification Kit избягва използването на органични разтворители като фенол и хлороформ и е подходящ за широк набор от клинични материали.

За целта тампонът с натривка от букална лигавица внимателно се потапя в 200 μ L PBS и с въртеливи движения се суспендират клетките за 30-60 секунди. Добавят се 400 μ L лизиращ агент и 200 μ L протеиназа K след което пробите бяха хомогенизирани за 10-15 s (vortex) и инкубирани на 560C за 10 минути за получаване на клетъчни суспензии. След съответните обработки съгласно протокола на фирмата производител, ДНК-преципитатите внимателно бяха прехвърляни и пречиствани с помощта на колонки GeneGET Genomic Purification Columns и поредица от измиващи и елюиращи буфери до крайното елюиране на екстрахираната ДНК от филтрите на колоната.

▪ **Количествена и качествена оценка на екстрахираната ДНК**

Концентрацията на ДНК беше измервана спектрофотометрично (Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System, Agilent Technologies) при дължина на вълната 260 nm и 280 nm. Това позволява контролиране и на чистотата (примеси на РНК, белтък, фенол и др.) на получените разтвори. Количествени стойности за концентрация на получената ДНК бяха получавани автоматично или пресмятани по формулата: $X (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times D$, където: X - концентрацията на ДНК в $\mu\text{g/ml}$; A_{260} - екстинкцията на ДНК, при дължина на вълната 260 nm; D е фактор на разреждане.

Така получените препарати от ДНК бяха довеждани до работни концентрации от 0.5-2.0 µg/µl, разпределяни на аликвоти с цел предпазване от контаминации и съхранявани във фризер до по-нататъшното им анализиране.

- **Секвенционни реакции**

Същността на секвенирането по метода на Sanger се състои в копиране на целевата ДНК много пъти, създавайки фрагменти с различни дължини. Флуоресцентни нуклеотиди "верижни прекъсвачи" маркират краищата на фрагментите и позволяват определянето на поредицата.

Специфичността на получените продукти в нашето изследване беше проверена чрез секвениране по Сангер в независима лаборатория в Холандия (Macrogen Europe, Amsterdam, Netherlands). За целта пробите бяха подготвени и етикетирани със специални стикери, според указанията на лабораторията изпълнител.

- **Полимеразна верижна реакция в реално време (Real-Time PCR) чрез използване на флуоресцентно белязани сонди за аелна дискриминация**

Всички PCR реакции бяха проведени в 7300 Teal Time PCR System (Applied Biosystems), съгласно инструкциите на производителя. Реакционният обем е 25 µl и сместа съдържа 12.5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (кат. № 4304437), 1.25µl 20X TaqMan SNP Genotyping Assay - съдържащ двойка праймери и флуоресцентно белязана сонда (ThermoFisherScientific, кат. № PN4351379), 6.25 µl RNase/DNase Free Water (Fermentas) и 5 µl разрежена ДНК проба. Всички реакции бяха проведени в присъствието на две отрицателни контроли: 1. RNase/DNase Free Water (Non-template control, NTC); 2. Бактериална ДНК. За положителни контрола бяха използвани проби с ДНК, от доброволци с вече доказани и познати генотипове, получени след дизайна на собствената праймерна система и последващо секвениране. PCR амплифициране беше проведено с протокол, описан в **Таблица 2**.

Таблица 2. Основни стъпки и съответните условия за провеждане на полимеразна верижна реакция в реално време за откриване на rs174547 полиморфизъм във FADS1 ген

Стъпка	Условия
1	60°C за 120 секунди
2	95°C за 600 секунди
3	95°C за 15 секунди
4	60°C за 60 секунди
5	Отчитане на флуоресценция (plate read)
6	Стъпка No. 3, 4 и 5 се повтарят още 44 пъти (общо 45 цикъла за целия протокол)
8	Охлаждане и задържане на 4°C (край)

Метод на анкетното проучване

- **Метод Честота на консумация на храни (Food Frequency Questionnaire Method FFQ)**

Честота на консумация на храни е изследвана чрез стандартизиран въпросник (Food Frequency Questionnaire, FFQ). Разработената анкетна карта включва ранжирани по честотата на консумация храни/групи храни. Участниците отбелязват честотата, с която те консумират разнообразни храни в продължение на дълъг период от време, в случая една година, с цел оценка на обичаен хранителен прием. Броят на храните варира в зависимост от целта на проучването. Всички доброволци попълниха анкетна карта за честота на консумация на храни и напитки. За целите на проучването беше използвана модифицирана анкетна карта за честота на консумация (FFQ), използвана в Национално проучване на факторите на риска за здравето сред населението над 20-годишна възраст, проведено през 2014 г. Хранителни приеми се причисляват към една от 7 дискриминативни категории: по-рядко от 1 път месечно, 1-3 пъти месечно, 1 път седмично, 2-4 пъти седмично, 5-6 пъти седмично, 1 път дневно, повече от 1 път дневно. За по-удобно и разбираемо представяне на резултатите, при анализа на данните, тези седем категории бяха обединени в три: 1) 3 пъти месечно и по-рядко - категория показваща

сравнително нисък или дори никакъв прием на съответната храна/продукт; 2) 1-4 пъти седмично – категория показваща умерен прием на съответната храна и 3) повече от 5-6 пъти седмично – категория отчитаща сравнително висок приемна съответната храна.

▪ **Здравен статус и фактори на риска за хронични заболявания**

Използвана е модифицирана анкетна карта, попълвана при Националното проучване на факторите на риска на здравето при хора над 20 годишна възраст, в рамките на Националната програма за превенция на хроничните незаразни болести 2014-2010г., проведено от Националния център за обществено здраве и анализи и Министерство на Здравеопазването. Въпросникът се състои от няколко категории въпроси, касаещи личните данни, данни за здравето, навици на хранене, физическа активност, здравословен начин на живот и поведение, вредни навици като тютюнопушене или злоупотреба с алкохол. За целите на настоящето изследване бяха въведени няколко модификации и оптимизации на анкетната карта.

Статистически методи за анализ

Анализа на резултатите е направен с помощта на пакет за статистическа обработка на данни SPSS ver.17. за таблично и графично представяне на резултатите е използван MS Excel 2016.

Използвани са дескриптивна статистика за описание на данните: вариационен (за количествени променливи) и честотен анализ (за качествени променливи), графично представяне; за сравняване на пропорциите са използвани Тест χ^2 и Тест на Fisher; при сравняване на свързани извадки е използван Тест на Wilcoxon. Нормалност на разпределението на данните е статистически изследвано с тестове на Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk. За сравняване на две средни стойности при нормално разпределение е използван Т-Тест. За сравняване на повече от две средни стойности е използван тест ANOVA. Тест на Mann-Whitney за сравняване на средни стойности е използван при ненормално разпределение на количествени променливи.

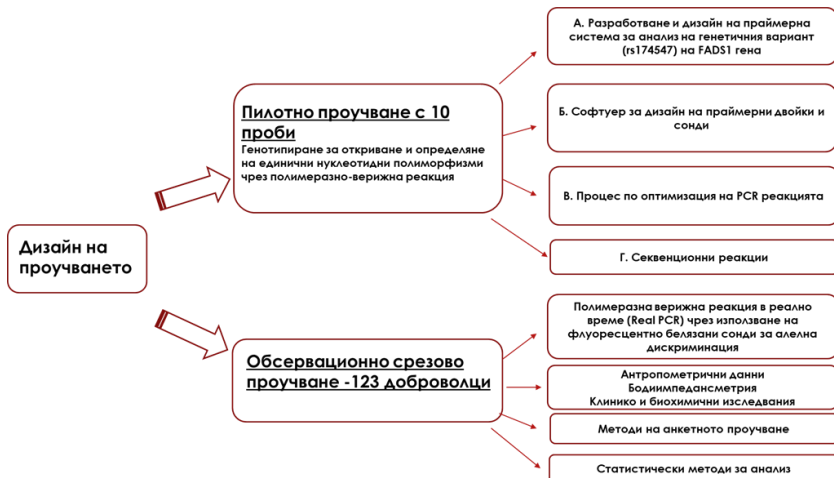
Използвани са също и регресионен и корелационен анализ, а при данните с ненормално разпределение е приложен непараметричен тест на Spearman.

IV. АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

4.1 Дизайн на проучването

Общо 123 доброволци от регионите Плевен и София, на възраст от 28 до 65 години, са изследвани за генния им вариант по отношение на rs174547 във FADS1 гена. За определянето на точния генен вариант на всеки доброволец е използван следният подход. Първоначално е разработена авторска система за провеждане на полимеразна верижна реакция, чрез която се намират ампликони, съдържащи търсения полиморфизъм във FADS1 гена, чрез праймерна двойка, конструирана от нас специално за тази цел. Следващата стъпка е потвърдителен секвенционен анализ в лаборатория в чужбина. След което, праймерната система е съпоставена със съществуващ на пазара готов амплификационен кит за детекция на rs174547. Системата е успешно валидирана, като се потвърди, че секвенираните ДНК ампликони, съдържат и двата варианта на този полиморфизъм. В по-нататъшната лабораторна дейност те служиха за надеждни и потвърдени позитивни контроли. (Фиг.1)

Фигура 1. Дизайн на проучването и използваните методи във всеки етап



Следващият етап от проучването бе набирането на достатъчен брой доброволци, с цел статистическа значимост на извадката, на които са оценени генотипа по отношение на интересувания ни полиморфизъм във FADS1 гена, хранителен прием и навици на хранене, антропометрични данни и биохимични маркери на мастния метаболизъм. Данните са обработени и систематизирани чрез методите на статистическия анализ.

4.2 Разработване и имплементиране на методология за анализ на rs174547 генетичен полиморфизъм.

А) Разработване и дизайн на праймерна система за анализ на генетичния вариант (rs174547) на FADS1 гена.

Целта на разработването, адаптирането и проверката на собствена праймерна двойка за откриване и анализ на генетични варианти на FADS1 (rs174547 SNP) беше да се тества в малък мащаб (пилотно проучване) методология, която в последствие да се приложи в по-мащабно проучване. От особена важност беше и чрез получените резултати да отдеференцираме и надеждни позитивни контроли, които да използваме в по-нататъшните експерименти. За тази цел, пилотна група от 10 субекта от български доброволци беше избрана на случаен принцип и тествана с цел да се проверят оптимизираните условия. След стандартно извличане на ДНК от букална лигавица бе провеждана полимеразна верижна реакция, намножаваща 243 bp фрагмент, с търсения С или Т SNP, съдържащ се вътре. Ампликонът се визуализира след 40 минутна хоризонтална електрофореза върху 2% агарозен гел. След това продуктите - ампликони, съдържащи интересувания ни генен участък, бяха анализирани на капиларен секвенатор (чрез секвениране по метода на Сангер) и получените данни бяха разчитани и анализирани със софтуера MEGA5.

Б) Софтуер за дизайн на праймерни двойки и сонди

За дизайн на праймери и сонди бе използван софтуер Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Техниката изисква въвеждане на човешка частична геномна последователност, получена от базата данни на dbSNP генома

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) чрез номер за присъединяване на целевия SNP (rs174547). При генерирането на праймер се определят няколко параметъра, като например: размера на ампликона; съдържанието на GC; и др. Когато завърши дизайна на сета от праймери, се генерира доклад с подробна информация за всяка двойка. Няколко последователности бяха избрани за синтез, като най-добрите първоначални резултати бяха получени с праймерна двойка, именувана FADS1-F и FADS1-R. Избраният специфичен праймерен сет, определен за целевия SNP регион, амплифицира 243 bp ДНК последователност. Един праймер се състои от 20 bp със следната последователност: **CAC TCC CTT CAC ATG GTT GC**; а другият бе също с дължина от 20 bp, с дадена последователност: **GGT TCC TGG AAA GCA ACT GG** (Таблица 3).

Таблица 3. Параметри на проектирания праймерен сет, съдържащ FADS1-F и FADS1-R праймери

Име на праймера	Стартова позиция	Дължина	T ⁰ m	GC% съдържание	5'-3' последователност
FADS1-F	408	20 bp	59.12	55.00	CACTCCCTTACATGGTTGC
FADS1-R	650	20 bp	59.04	55.00	GGTTCCTGGAAAGCAACTGG

В) Процес по оптимизация на PCR реакцията

Няколко параметъра като концентрация на праймери, реакционни температури и продължителност бяха оптимизирани в полимеразната верижна реакция (PCR). Най-доброто PCR амплифициране бе установено при използване на следния протокол: 5 минути при 95°C, последвани от 40 цикъла на термична денатурация (30 секунди при 94°C); хибридизация (30 секунди при 56.5°C) и синтез (30 секунди при 72°C). Всички PCR реакции бяха провеждани в 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Реакционният обем бе 25 µl и сместа съдържа 12.5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (кат. № 4304437), 1 µl FADS1-F праймер (10 pmol/µl), 1 µl FADS1-R праймер (10 pmol/µl), 5.5 µl RNase/DNase Free Water (Fermentas) и 5 µl разреждана ДНК проба. Всички реакции бяха проведени в присъствието на две отрицателни контроли: 1. RNase/DNase Free Water (Non-template control, NTC); 2. Бактериална ДНК; целящи проверка за нежелано замърсяване и неспецифично размножаване.

Г) Визуализация и документиране на резултатите, получени от конвенционалния PCR

Амплификационните продукти с таргетния C/T SNP вътре се визуализират след 40 минути хоризонтална електрофореза върху 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид, като се използва 6x Orange Loading Dye® и 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

За приготвяне на 1%, 1.5% или 2% агарозен гел беше използвана висококачествена агароза (Merck KGaA, Germany, Cat.No K3573739 705), разтапяна в 50 ml 1 x TBE буфер с помощта на микровълнова печка (Whirlpool JT359). След охлаждане на сместа до около 60°C беше добавян етидиев бромид (1%, 10 µl/100 l H₂O) за получаване на крайна концентрация от 0.5 mg/ml. Агарозата беше изливана внимателно, като не се позволява образуване на мехурчета, в мини-вана за хоризонтална електрофореза (SCIE-PLAS, HOLO HU10, UK) със съответен гребен за образуване на стартови позиции. След полимеризацията на агарозата (за 30-45 минути на стайна температура) бе добавян електрофоретичният буфер (1X TBE) и пробите бяха нанасяни на стартовите позиции в обем от 24 µl (20 µl проба + 4 µl 5X loading

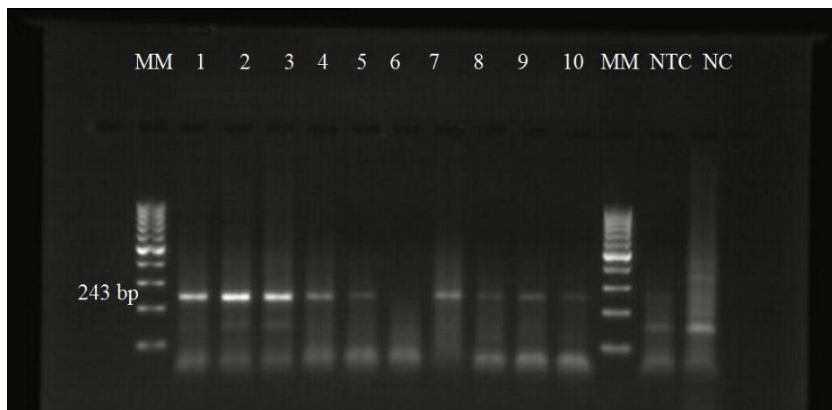
buffer). Електрофорезата бе провеждана за 40 минути при постоянна сила на тока и напрежение от 100 V

След приключване на електрофорезата агарозните гелове бяха документирани със системата за визуализация CN-1000 DarkRoom Chemiluminescence Imaging System с помощта на софтуер BioCapt ver.12.5.

Показано е, че при оптимизирани реакционни условия, проектираната от нас праймерна система продуцира ампликон (къса последователност от ДНК или РНК, която е източник и/или продукт на събития на амплификация или репликация.) с очаквания размер (243 bp) и съдържа фрагмент от FADS1 гена, с анализирания С/Т полиморфизъм.

Агарозен гел след електрофореза, проведена непосредствено след конвенционалния PCR анализ е показан на Фигура 2. Визуализирани са продуктите на реакцията и е отбелязан таргетния ампликон от 243 базови двойки (bp).

Фигура 2. *Гел електрофореза след проведена конвенционална PCR реакция за визуализация на целевия продукт. Очакваният ампликон е с размер от 243 bp, а на позиции от 1 до 10 са визуализирани продукти от непознати проби; MM-молекулен маркер (100 bp DNA Ladder); NTC (non template controls) - контроли без генетичен материал; NC (negative control)-отрицателна контрола (бактериална ДНК)*

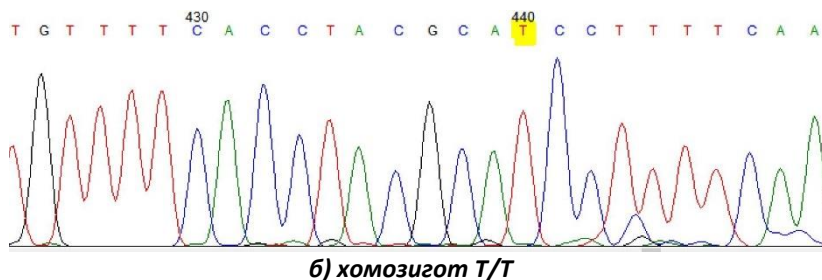
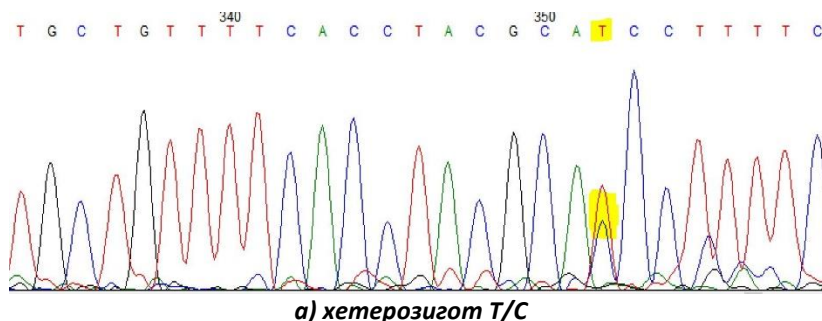


Резултатите от електрофорезата на агарозния гел показват много отличителна илюминираща ивица като PCR продукт, разположена между 200 и 300 bp в сравнение с молекулния маркер. Има и други продукти (ивици), които могат да се видят на агарозния гел между 100 и 200 bp, което показва наличието на друг PCR продукт с по-малка молекулна маса от целевата. Качеството на целевия продукт обаче не е компрометирано, и за това можем да съдим по силата на сигнала, продуциран от системата за изобразяване на хемилуминесценцията.

Специфичността на получените продукти беше проверена чрез секвениране по Сангер в независима лаборатория в Холандия (Macrogen Europe, Amsterdam, Netherlands). За целта пробите бяха подготвени и етикетирани със специални стикери, според указанията на лабораторията изпълнител. Получените данни бяха прочетени със софтуера MEGA5, като беше създадено консенсусно изравняване и беше определен С/Т полиморфизма за всяка проба.

Представителни секвенции след процеса на секвениране, показващи анализирания полиморфизъм rs174547 в хетерозиготен и хомозиготен вариант са дадени на **Фигура 3**. Отбелязано е мястото, на което се появяват два секвенционни пика (с червен и син цвят), отговарящи съответно на нуклеотидните бази Т и С (хетерозиготен вариант) или се установява само единия алел, в случая Т (хомозиготен вариант.) На отбелязаното място ясно личи само един секвенционен пик (с червен цвят), отговарящ на нуклеотидната база Т.

Фигура 3 *Представителни секвенции, показващи анализирания полиморфизъм rs174547:*



- а) хетерозиготен вариант (т.е притежава и двата алела С и Т). Мястото, на което се появяват два секвенционни пика (отбелязани с червен и син цвят), отговарят съответно на нуклеотидните бази Т и С;
- б) хомозиготен вариант - наблюдава се само единия алел отбелязан с червен цвят, отговарящ на нуклеотидната база Т;

С помощта на програма за четене на секвенции и молекулярно-генетични анализи MEGA5 Software, са открити точните позиции на единичния нуклеотиден полиморфизъм, който ни интересува и е съставено т.нар. секвенционно подравняване за сравняване на последователностите и диференциране на съответния олигонуклеотид в ДНК последователността.

Фигура 15. Представената фигура е част от секвенционно подравняване (sequences alignment). S1 до S10 са изследваните проби; rs174547 е частична геномна последователност на човека, получена от dbSNP геномна база данни. В секвенционното подравняване пробите S1 и S2 са хетерозиготни (C/T) т.е. съдържат и C и T алелен вариант.

1. rs174547	T G T T T T C A C C T A C G C A	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
2. S1	T G T T T T C A C C T A C G C A C	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
3. S2	T G T T T T C A C C T A C G C A C	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
4. S3	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
5. S4	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
6. S5	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
7. S6	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
8. S7	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
9. S8	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
10. S9	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A
11. S10	T G T T T T C A C C T A C G C A T	C C T T T T C A A T A G T T G T G T T A

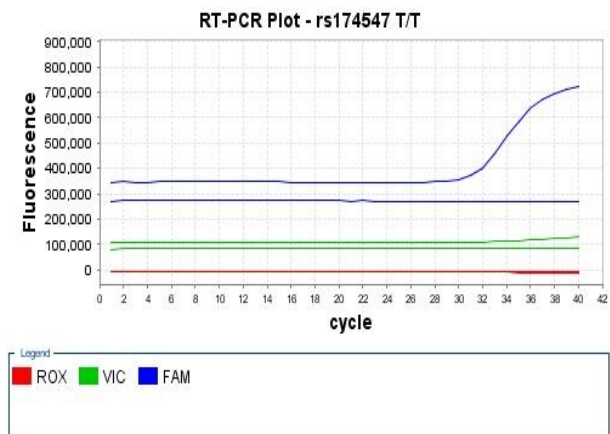
Резултатите показват, че в първите две проби S1 и S2 се откриват и двата алелни варианта, защото на тази позиция има обособени два секвенционни пика и следователно носителите на този генетичен вариант са хетерозиготни. Останалите секвенции от S3 до S10 имат само по един пик – за нуклеотидната база тимин (T), което значи, че носителите на този генетичен вариант са хомозиготни и имат само T алелен вариант. Както се вижда от резултативните данни от секвенирането в тези 10 проби няма хомозиготни представители на C варианта т.е C/C. Това се потвърждава и в следващите етапи на проучването, където броят на изследваните проби е 113 и показва, че този вариант на полиморфизма rs174547 е сравнително рядък в популацията, от която е направена извадката.

Представителни резултативни амплификационни плотове, след проведена Real-Time PCR реакция са показани на **Фигура 4**. Получените флуоресцентни криви на непознатите ДНК проби, са съпоставени спрямо данните от негативна контрола. За

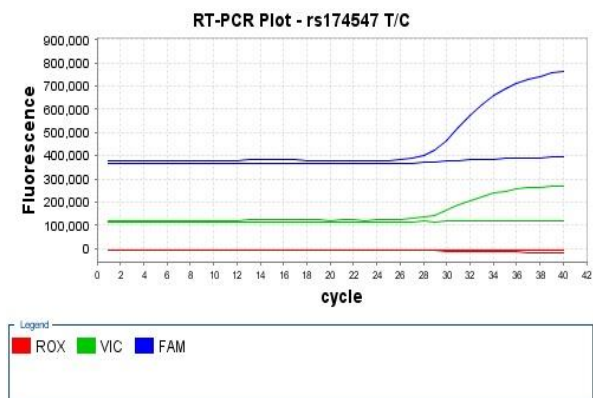
провеждане на дадените Real-Time PCR реакции са използвани готови комерсиални китове, които включват специфично проектирани флуоресцентно белязани сонди (детектори). При протичане на реакцията детекторите генерират сигнал, който се отчита в съответен цвят (канал с филтри за детекция на флуоресценция с точно определени параметри). Генерираният сигнал съответства на намножен (амплифициран) участък от ДНК, който ни интересува и по този начин се получава PCR амплификационната крива на съответната непозната ДНК проба.

Фигура 4. Real Time PCR амплификационна графика

а)



б)



На Фигура 4 отчетливо е визуализирано логаритмично нарастване само на една амплификационна крива (син цвят, Фиг. 4а) спрямо използваната негативната контрола при хомозиготите и подобно логаритмично нарастване и на двете криви (син и зелен цвят, Фиг. 4б) при пробите на лица с полиморфизъм определен като хетерозиготен.

В заключение, с получените резултати демонстрираме, че проектираната FADS1 двойка праймери е специфичен и надежден инструмент за получаване на целевия ампликон. Последващото секвениране по Сангер разкрива точната нуклеотидна вариация, класифицирайки неизвестните проби като хомозиготи и хетерозиготи.

4.3 Клинични и биохимични показатели на участниците в проучването

Измерването на липидите и липопротеините се използва за оценка на риска от артеросклеротично кардиоваскуларно заболяване (Atherosclerotic cardiovascular disease - ASCVD) и като ръководство за терапевтично вземане на решения от специалистите. Количествена оценка на плазмените липиди може да се извърши с кръвна плазма, а количествено определяне на липопротеините се постига чрез измерване на техния протеинов компонент. Липопротеините се класифицират въз основа на тяхната плътност (вж. Таблица 4).

За референтни граници на биохимичните показатели са приети граници съгласно препоръките на Европейската общност по атеросклероза (за липидния профил)(1) и съгласно Ръководство и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет (за кръвна глюкоза) (2). Все повече и по-систематични стават доказателствата за причинно-следствените ефекти на липидите и липопротеините върху риска от атеросклеротични сърдечно-съдови заболявания.

Таблица 4. Физически и химически характеристики на плазмените липопротеини при човека

	Density (g/mL)	Diameter (nm)	TGs (%)	Cholesteryl esters (%)	PLs (%)	Cholesterol (%)	Major apolipoproteins
Chylomicrons	<0.95	80-100	90-95	2-4	2-6	1	ApoB-48
VLDL	0.95-1.006	30-80	50-65	8-14	12-16	4-7	ApoB-100
IDL	1.006-1.019	25-30	25-40	20-35	16-24	7-11	ApoB-100
LDL	1.019-1.063	20-25	4-6	34-35	22-26	6-15	ApoB-100
HDL	1.063-1.210	8-13	7	10-20	55	5	ApoA-I
Lp(a)	1.006-1.125	25-30	4-8	35-46	17-24	6-9	Apo(a)

Apo = apolipoprotein; HDL = high-density lipoprotein; IDL = intermediate-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; Lp(a) = lipoprotein(a); PLs = phospholipids; TGs= triglycerides; VLDL = very low-density lipoprotein

Резултатите от обобщените данни за биохимичните лабораторни показатели на доброволците от настоящето проучване са показани на Таблица 5.

Средната стойност в нивата на общия холестерол при доброволците е 6.0 mmol/l (SD=1.2 Me=5.8), като не се различава при мъжете и жените, при референтни граници от 3.5-5.2 mmol/l.

Средната стойност на триглицеридните нива сред изследваната група е 1.92 (SD=1.20 Me=1.70), като при жените TG=1.90 (SD=1.26 Me=1.68), а при мъжете TG=1.95 (SD=1.09 Me=1.77). За референтни граници са приети стойности на TG между 0.3-1.7 mmol/l. Както се вижда средната стойност на този

показател е по-висока от референтната горна граница на нормата за триглицериди.

Таблица 5. Клинични и биохимични показатели (mmol/l) на участниците, с разпределение по пол

Биохимичен показател	Общо			Жени			Мъже		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Триглицериди	1.92	1.20	1.70	1.90	1.26	1.68	1.95	1.09	1.77
Общ холестерол	6.0	1.2	5.8	6.0	1.3	5.7	6.0	1.2	6.0
HDL-choI	1.45	0.48	1.34	1.49	0.48	1.43	1.37	0.48	1.29
LDL-choI	3.66	1.14	3.60	3.66	1.17	3.55	3.65	1.09	3.70
Кръвна захар	5.68	1.25	5.32	5.66	1.30	5.29	5.72	1.18	5.47

Богатите на триглицериди VLDL частици и техните остатъци носят по-голямата част от циркулиращите триглицериди в кръвта. Следователно, плазмената концентрация на TG отразява концентрацията на циркулиращи АроВ-съдържащи липопротеини, богати на TG. Повишените нива на TG в плазмата са свързани с нарастващ риск от ASCVD, но тази асоциация става нула след корекция за не-HDL-с, оценка на общата концентрация на всички АроВ съдържащи липопротеини (3). Изследователите предполагат, че всички съдържащи АроВ липопротеини имат идентичен ефект върху риска от кардиоваскуларни инциденти (4). Заедно, тези проучванията категорично предполагат, че причинно-следствения ефект на богатите на TG липопротеини и

техните остатъци върху риска от ASCVD се определят от концентрацията на циркулиращите АроВ-съдържащи частици, а не от самото съдържание на TG.

При доброволците от настоящето проучване средните стойности на липопротеините с ниска плътност LDL-с е 3.66 mmol/l (SD=1.14 Me=3.60), като не се наблюдават значими различия между жените (LDL-с=3.66 SD=1.17 Me=3,55) и мъжете (LDL-с=3.65 SD=1.09 Me=3.70). Според Европейската общност по атеросклероза като оптимални се приемат нивата, които са по-ниски от 2.59 mmol/l.

Определената средна стойност на липопротеините с висока плътност (HDL-Chol) при изследваните в това проучване лица е 1.45 mmol/l (SD=0.48 Me=1.34). Наблюдават се леки различия между средните стойности на мъжете HDL-с=1.37 mmol/l (SD=0.48 Me=1.29) и жените HDL-с=1.49 (SD=0.48 Me=1.43). Според Европейската общност по атеросклероза без повишен риск са жени с HDL-с над 1.68 mmol/l и мъже с HDL-с над 1.45 mmol/l.

Средното ниво на кръвна глюкоза, взета на гладно при участниците е 5.68 mmol/l (SD=1.25 Me=5.32). Отново не се наблюдава съществена разлика между половете: средна кръвна глюкоза при жените е 5.66 mmol/l (SD=1.30 Me=5.29), а при мъжете 5.72 mmol/l (SD=1.18 Me=5.47) като разликата е в рамките на лабораторната грешка. Относителния дял на лицата с повишени нива на кръвна глюкоза на гладно в настоящето проучване е 13.3% (n=13), спрямо 86.7% (5) на хората без отклонение в този показател. Референтни стойности съгласно Ръководството и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет е 7.0 mmol/l (126 mg/dl), на гладно и 11.1 mmol/l (200 mg/dl), след натоварване с глюкоза или хранене. Кръвната глюкоза е лесен за измерване кръвен показател, който участва в оценката на въглехидратния метаболизъм и диагностицирането на диабет, метаболитен синдром и затлъстяване. Често именно хората с дадените метаболитни нарушения са стратифицирани във високо-рискови групи по отношение развитието на атеросклеротични кардиоваскуларни инциденти. Затова включването в проучването и измерванията на показателя кръвна

глюкоза води до по-цялостен панела от лабораторни показатели и по-адекватна оценка в състоянието на изследваните лица.

4.4 Определяне на алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1* сред българската популация

Сред задачите на настоящият труд е да се определят: алелната честота на полиморфизма *rs174547* и разпространението на индивидуалните хаплотиповете сред хора от българска популация.

Генетичните вариации в популациите могат да бъдат анализирани и количествено определени от алелната честота. Две фундаментални изчисления са от основно значение за популационната генетика: честотите на алелите и честотите на генотипа. Честотата на генотипа в популация е броят на индивидите с даден генотип, разделен на общия брой индивиди в популацията. Въпреки, че двата термина алелна честота и честота на генотип са свързани, важно е те ясно да се разграничат. Честотата на алелите винаги може да бъде изчислена от честотата на генотипа, докато обратното изисква да се приложи уравнението на Харди-Вайнберг и да се вземат под внимание условията на случайно кръстосване.

Фигура 5. Процентно разпределение на генотипа *rs174547* сред изследваната популационна група



За първи път бе определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред хора от българска популация по отношение на rs174547 SNP полиморфизъм в гена FADS1. (Фиг.5) Данните показват, че в цялата изследвана популационна група в настоящето проучване, хомозиготните Т/Т носители (на един и същи алел Т и в двете копия на гена) са определени като 49.6% (61/123), а хетерозиготните С/Т носители (носители на Т алел в едното копие на гена и С алел в другото копие) са съответно останалите 50.4% (62/123). Респективно хомозиготни С/С носители не бяха регистрирани в изследваната от нас група

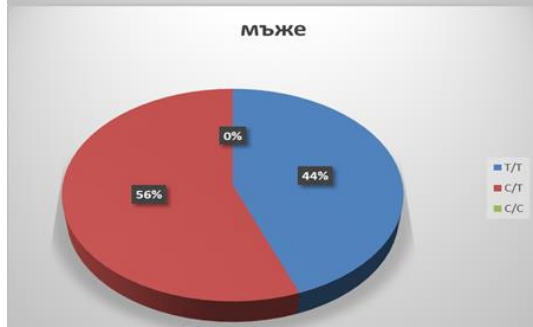
Получените резултати за разпространението и честотата на генотипа сред двата пола са показани на **Фигура 6** а) и б). Разпределението на индивидуалните генотипове по пол показва, че сред изследваните жени малко по-разпространен е Т/Т генотипа (51%), а сред мъжете - С/Т (56%).

Фигура 6. *Разпределение на генотипа rs174547 сред жени а) и мъже б)*

а)



б)



Честотата на Т алела въз основа на получените данни е изчислена като 0.75, аналогично на съотношение Т:С от 3:1 (184:62; изразено процентно - 75%:25% в полза на Т-алела). Съответно честотата на С алела е 0.25 (62/246, 25%).(Таблица 6). В получените резултати изненадващо е както почти равностойното разпределение между индивидуалните генотипове С/Т и Т/Т, така и липсата на лица с определен хомозиготен генотип само по С алела (С/С). Възможно е получените резултати да са следствие от броя на индивидите в изследваната група (ограничен до 123 доброволци), но като цяло те са в унисон и отразяват по-ниската честота на С алела в световен мащаб.

Този алел се приема за прародителски вариант, като според базата данни Ensembl (www.Ensembl.org) средната му честота е изчислена на $MAF=0.30$ (С), а най-висока регистрирана популационна стойност е $MAF=0.588$. В глобален план алелната честота е $T=0.702$ (3516), $C=0.298$ (1492), а честотата на съответния генотип $T/T=0.560$ (1401), $C/C=0.155$ (389) и $C/T=0.285$ (714). Прави впечатление обаче относително малкия брой на изследваните лица, което обособява и нужда изследванията да продължат като се добавят повече индивиди от съответните популационни групи.

Сравнено с данните от други проучвания на същия полиморфизъм, алелната честота на С алела е по-ниска при Африканци, Афроамериканци и Южноазиатци (Таблица 6). Не е известно да са налични данни за този конкретен полиморфизъм за други съседни Балкански държави.

От получените резултати се вижда, че сред Българската популация по-разпространен е Т алелът - 75%, който според Fengqiong et al. е по-неблагоприятния генетичен вариант на FADS1, тъй като представлява рисков фактор за коронарно-артериална болест. Важно е да се отбележи, че Т-алелът се свързва с по-висок риск от КАБ само сред индивиди с по-ниски хранителни приема на ЕРА и ДНА, но не и при тези с по-висок прием на тези дълговерижни полиненаситени мастни киселини.

Таблица 6. Алелна и генотипна честота на FADS1 rs174547 T>C SNP в изследваната българска популация, съпоставени с други популации и държави

Държава / популация	извадка (N)	алелна честота - C алел	алелна честота - T алел	генотип-честота			Източник на данните
				T/T n (%)	C/T n (%)	C/C n (%)	
България	123	0.250	0.750	61 (49.60)	62 (50.40)	0 (0.00)	Настоящото проучване
Китай	951	0.343	0.657	326 (34.30)	437 (45.90)	188 (19.80)	Данни за Китай PubMed ID: 28359317
Северноамериканци (с произход Европа)	24	0.333	0.667	9 (37.50)	14 (58.30)	1 (4.20)	Данни от dbSNP PubMed: ss24050300
Афроамериканци	23	0.065	0.935	20 (86.96)	3 (13.04)	0 (0.00)	Данни от dbSNP - PubMed: ss24050300
Северноамериканци (с произход Китай)	24	0.500	0.500	8 (33.33)	8 (33.33)	8 (33.33)	Данни от dbSNP - PubMed: ss24050300
Американци	347	0.588 (408)	0.412	69 (19.90)	148 (42.70)	130 (37.50)	Данни от Ensembl; Ref. SNP rs174547
Африканци	661	0.023 (30)	0.977	631 (95.50)	30 (4.50)	0 (0.00)	Данни от Ensembl; 1000 Genome Project Ph 3 Ref. SNP rs174547
Източноазиатци	504	0.566 (571)	0.434	116 (23.00)	205 (40.70)	183 (36.30)	Данни от Ensembl; 1000 Genome Project Ph 3 Ref. SNP rs174547
Южноазиатци	489	0.137 (134)	0.863	365 (74.60)	114 (23.30)	10 (2.00)	Данни от Ensembl; 1000 Genome Project Ph 3 Ref. SNP rs174547
Европейци	503	0.347 (349)	0.653	220 (43.70)	217 (43.10)	66 (13.10)	Данни от Ensembl; 1000 Genome Project Ph 3 Ref. SNP rs174547
Осреднено за света	2504	0.298 (1492)	0.702	1401 (56.00)	714 (28.50)	389 (15.50)	Данни от Ensembl; 1000 Genome Project Ph 3 Ref. SNP rs174547

4.5 Честота на консумация на обичайни групи храни и храни, богати на полиненаситени мастни киселини

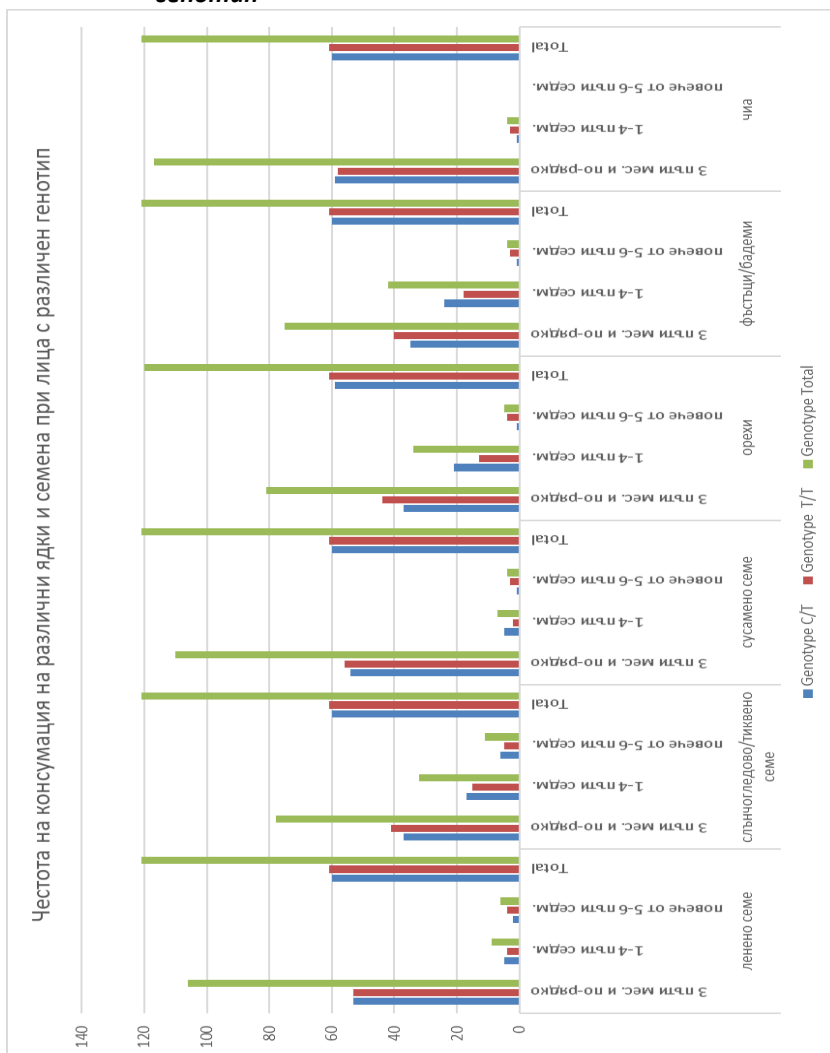
В настоящата глава са представени и обсъдени резултати от оценка честотата на консумация на различни групи храни. От всички групи храни, включени в анкетната карта в настоящето изследване са анализирани само храни и хранителни продукти, богати на хранителни мазнини (наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини) и имащи пряко отношение към мастния метаболизъм и холестероловия профил.

Резултатите от анкетата за честота на консумация на различни видове ядки и семена са представени на Фигура 23. Те показват, като цяло, рядка консумация на ядки и семена. За всички изброени в анкетата видове ядки и семена, най-висок е процентът на хората отговорили, че консумират съответната храна 3 пъти месечно или по-рядко. Не се забелязва значителна разлика в честотата на консумация на различните видове ядки и семена при хората с различни генотипове- Т/Т или С/Т.

От анкетираните ленено семе консумират рядко (3 пъти месечно и по-рядко) 87.6%, средно (1-4 пъти/седмично) едва 7.4% и често (повече от 5-6 пъти/седмично) едва 5.0%, без разлика към кой генотип спадат. F-критерият на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и честотата на консумация на ленено семе в популацията, от която е направена извадката – $P=0.836$.

Тенденцията се запазва подобна при консумацията на сусамено семе-90.9% от анкетираните са отговорили , че го консумират 3 пъти месечно и по-рядко, 5.8% от хората имат средна консумация, повече от 5-6 пъти седмично, само 3.3%. Няма статистически значима зависимост между двата генотипа и честотата на консумация на сусамено семе в популацията, за която е извадката - $P=0.381$. Резултатите от анализа на данните показват, че слънчогледовото и тиквеното семе са по-предпочитаните семена от българите, като 64.5% отбелязват, че ги консумират рядко, 26.4% ги консумират с умерена честота, а 9.1% съобщават за по-честа консумация. Отново не се наблюдават значителни разлики в честотата на консумация по генотип,- $P=0.848$.

Фигура 7. Честота на консумация на различни ядки и семена, богати на мастни киселини, при лица с различен генотип



Резултатите за честотата на консумация на различни видове риба и морски дарове, разделени по генотип са представени на Фигура 8.

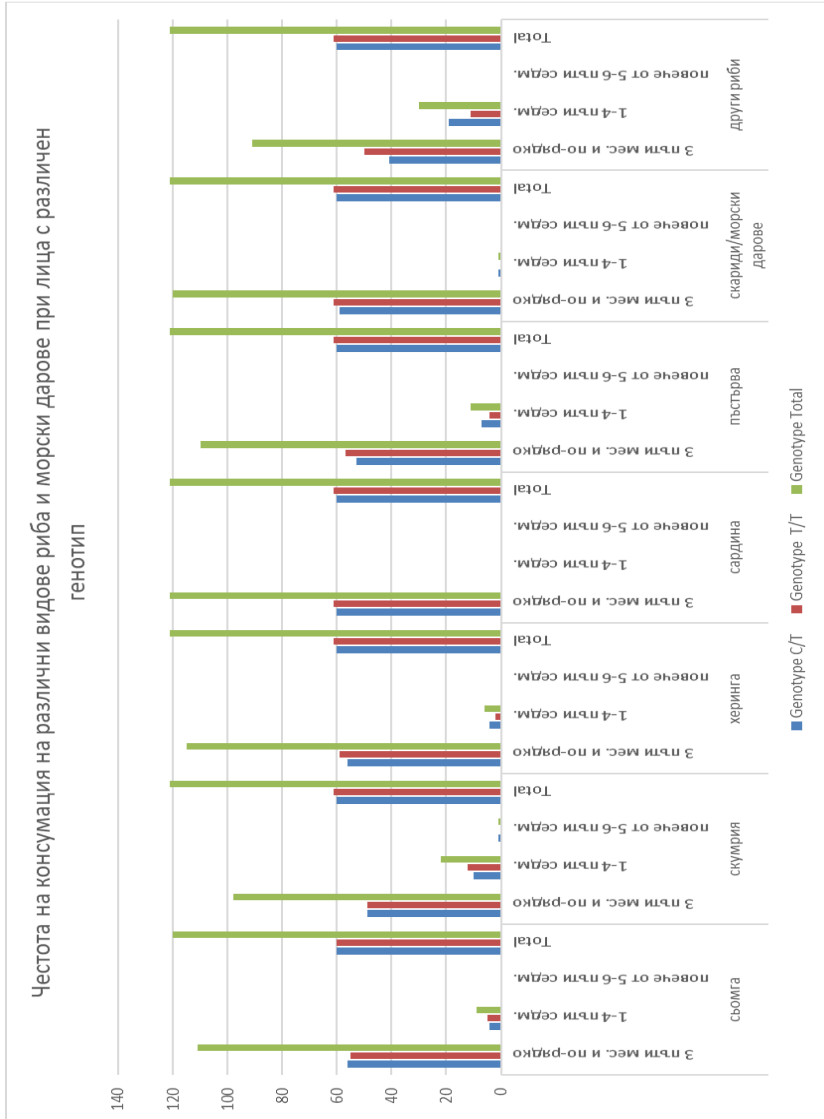
Данните показват, че като цяло честотата на консумация на риба и рибни продукти е доста ниска за цялата изследвана популация. За всички, представени в анкетата видове риба, най-честия посочен отговор е „3 пъти месечно и по-рядко“. Не се отчита значителна разлика в честотата на консумация между двете групи с различен генотип.

От анкетираните лица, съомга консумират рядко (3 пъти месечно и по-рядко) 92.5%; сравнително средна по честота консумация имат 7.5%; а никой от анкетираните (0%) са отговорили, че консумират съомга повече от 5-6 пъти седмично. Разлики в процентното съотношение между двата генотипа почти няма. F-критерия на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двете променливи в популацията, за която е направена извадката ($P=1.000$). Това означава, че процентните структури (разпределения) на обичайната честота на консумация на съомга при двата генотипа не се различават статистически значимо в популацията.

Скумрията се оказва по-достъпна за българина, като относителния дял на консумиращите рядко скумрия е 81%, сравнително средна консумация се наблюдава при 18.2% от хората, а честа консумация при 0.8%. Анализът показва, че няма значима разлика при представителите на двата генотипа. Проведения тест на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между обичайната честота на консумация на скумрия и генотипа в популацията, за която е направена извадката ($P=1.000$).

Херинга, сардина, пъстърва и морски дарове се консумират изключително рядко, като няма анкетиран, който да е посочил консумация повече от 5-6 пъти седмично. Повечето от доброволците попадат в групата на рядка консумация (3 пъти месечно и по-рядко). Отново разпределени равномерно между генотиповете. Един до четири пъти седмично консумират херинга (5%), пъстърва (9.1%), скариди и морски дарове (0.8%) и други риби (24.8%). F-критерия на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между генотип и честота на консумация в популацията, от която е направена извадката.

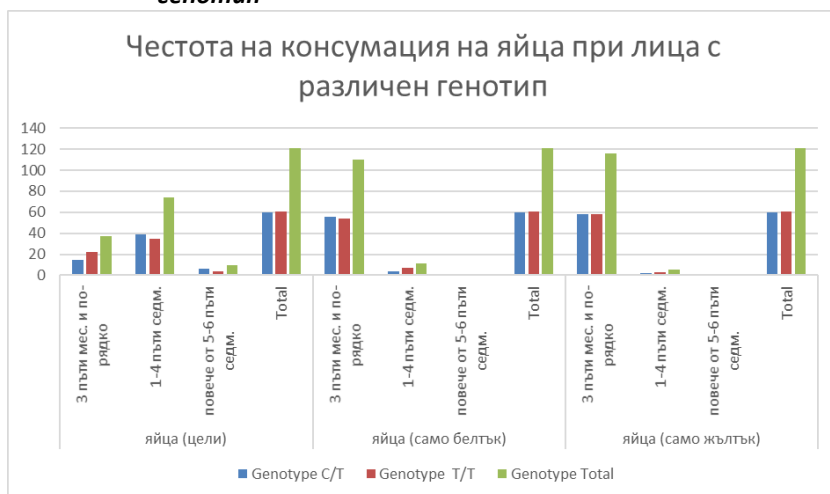
Фигура 8. Честота на консумация на различни видове риба и морски дарове, при лица с различен генотип



Резултатите от анкетата за честотата на консумация на яйца, са представени на Фигура 9. От графиката се вижда, че яйцата в общия случай се консумират цели, въпреки ширещото се в миналото убеждение, че хора с повишен холестерол не трябва да

консумират жълтъка на яйцето. Най-висока е умерената консумация на цели яйца – 61.2% от участниците в проучването, 30.6% консумират 3 пъти месечно или по-рядко, а повече от 5-6 пъти седмично – само 8.3%. Отново не се наблюдава разлика в честотата на консумация на яйца между групите на двата генотипа. Статистическите анализи показват, че критерия на Фишер е $P=0.343$ за цели яйца, $P=0.529$ за консумация само на белтък и $P=1.000$ за честотата на консумация само на жълтък.

Фигура 9. Честота на консумация на яйца, при лица с различен генотип



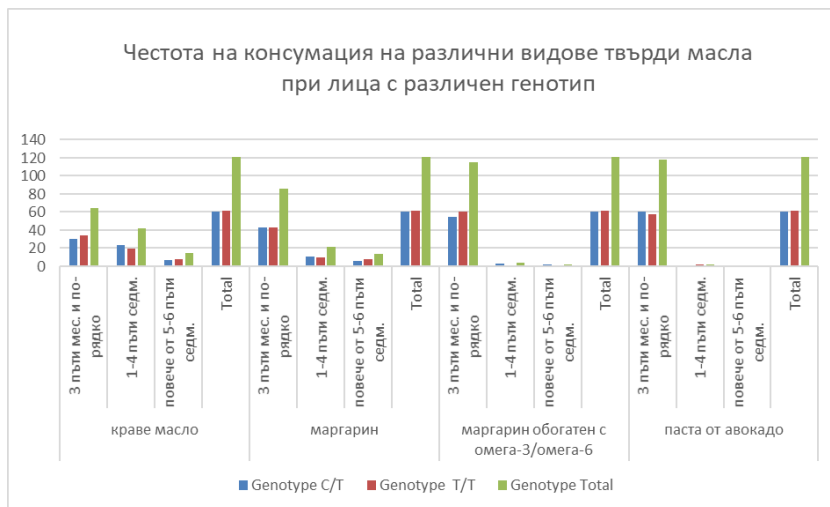
В тази версия на анкетната карта яйцата бяха разделени на „белтък“, „жълтък“ и „цели яйца“. Това бе направено с цел по-детайлно изследване приема на различни мастни киселини с яйцето, тъй като в различните му части се съдържат различно количество и вид мастни киселини.

От друга страна сред общопрактикуващите лекари в България все още съществува разбирането, че жълтъка на яйцето не трябва да бъде консумиран от хора с високи кръвни нива на тоталния холестерол, защото е богат на хранителен холестерол и би могъл да повиши значително кръвния показател. Тази теория има своите привърженици, но все повече научни публикации сочат, че

приетия с храната холестерол сам по себе си не е отговорен за повишен плазмен холестерол (6)

Отчетените резултати за честотата на консумация на различни видове твърди масла са представени на Фигура 10. Данните показват, че най-голям процент от хората – 52.9% консумират краве масло 3 пъти месечно или по-рядко. Умерена консумация на масло (от 1 до 4 пъти седмично) отбелязват 34.7%, а повече от 5-6 пъти седмично масло консумират едва 12.4%. Критерият на Фишер ($P=0.813$) показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и обичайната честота на консумация на краве масло в популацията, от която е направена извадката.

Фигура 10. Честота на консумация на различни видове твърди масла, при лица с различен генотип



Маргаринът се консумира още по-рядко от маслото като 71.1% от анкетираните са отбелязали, консумация 3 пъти месечно или по-рядко, 17.4% умерена честота на консумация, и едва 11.6% консумират маргарин 5-6 пъти седмично. F-критерия сочи, че няма статистически значима зависимост между двете променливи в популацията, от която е направена извадката – $P=0.917$.

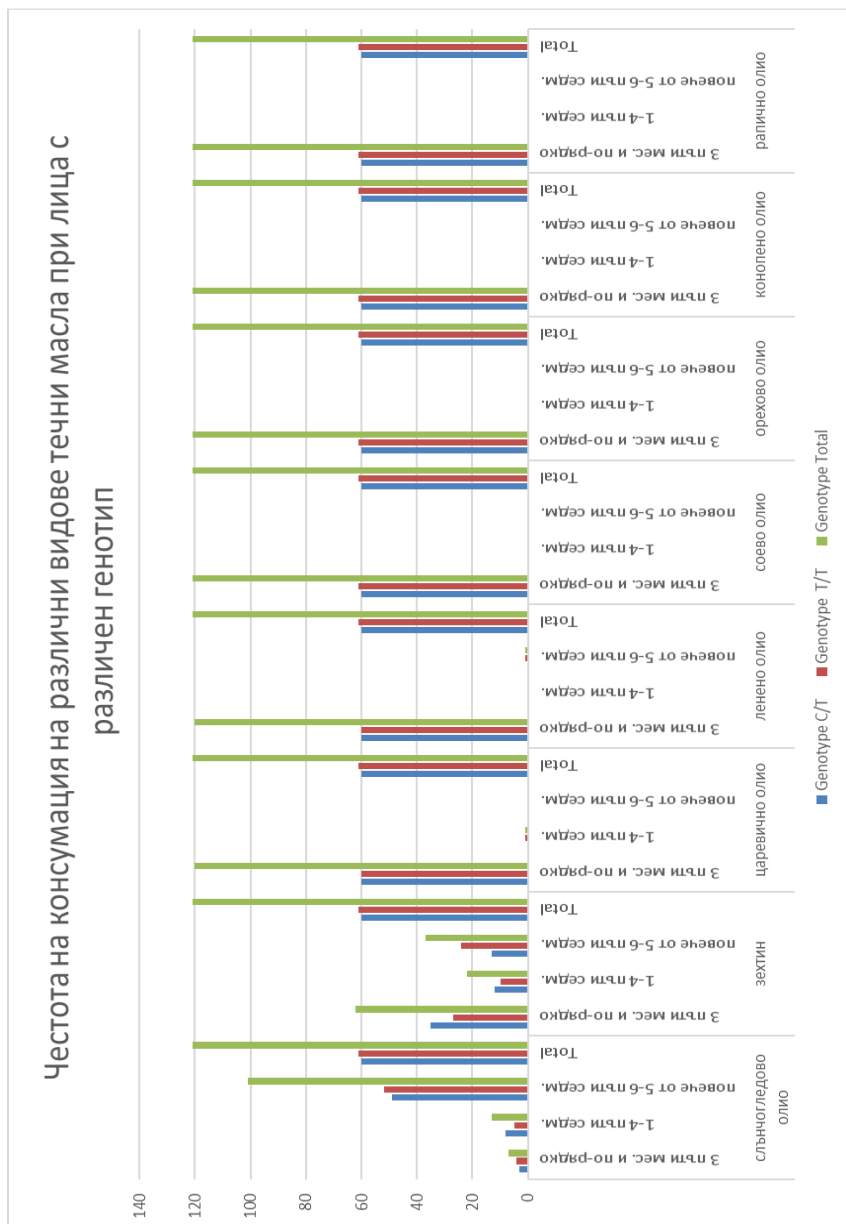
Още по-ниска е честотата на консумация на маргарин, обогатен с омега-3 и омега-6 мастни киселини. Повечето хора (95.0%) в проучването отбелязват, че рядко консумират „обогатен“ маргарин, 3.3% посочват умерена консумация, и 1.7% често (повече от 5-6 пъти седмично). Няма статистически значима зависимост между изследваните генотипове и честотата на консумация в популацията, от която е направена извадката – критерий на Фишер е $P=0.238$.

Тези резултати са интересни от гледна точка на нарастващото изобилие на новоразработени хранителни продукти, на базата на твърдите масла с добавени високоверижни полиненаситени мастни киселини.

Обобщените резултати за честотата на консумация на друга голяма група храни, носители на хранителни мастни киселини за човека, а именно различните видове течни мазнини (олио), употребявани както в сурово състояние (дресинги за салати, добавки към смутита и др.), така и след преминаване на термична обработка са представени на Фигура 11. В анкетата бяха включени и по-нетрадиционни, но все по-често използвани от хора, стремящи се към здравословен начин на живот, течни масла като например ленено, соево, рапично, конопено и орехово масло (олио).

Достъпността на подобни различни растителни масла нарасна значително в последните години, особено сред хора, посветени на здравословното хранене и посещаващи специализирани „био“ и „здравословни“ магазини като всяко от тях има различна наситеност на LA и ALA и пропорция между двете мастни киселини.

Фигура 11. Честота на консумация на различни видове течни масла (олио), при лица с различен генотип



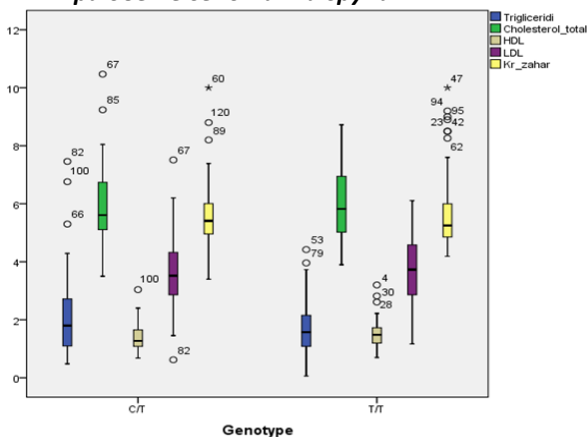
От анализа на обобщените данни, представени на Фигура 11 ясно може да се види, че предпочитаните за консумация (в суров вид и след топлинна обработка) течни масла са слънчогледовото олио и зехтинът (маслиново олио). Данните сочат, че почти не се консумират или се консумират много рядко царевичното, лененото, соевото, ореховото, конопеното и рапичното олио. F-критерия на Фишер за всички тези течни масла е $P=1.000$ и показва, че няма статистически значима зависимост между двете променливи в популацията, от която е направена извадката.

4.6. Изследване връзката между генотипа и биохимичните маркери за оценка на холестероловия профил (Cholesterol Total, HDL, LDL, TG) и кръвна захар.

Настоящата секция разглежда зависимостите между генотипа и елементите на холестероловия профил (Cholesterol Total, HDL, LDL, TG) както и кръвната захар. За целта проверяваме дали разпределението на тези променливи в двете генотипни групи е нормално, чрез няколко статистически теста - Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk тестове за нормалност на извадката.

На следващата Фигура 12 са показани графично разпределенията на различните променливи - биохимични маркери на холестероловия профил и кръвна захар

Фигура 12. Честотно разпределение на всички биохимични маркери при двете генотипни групи



Резултатите от теста показват, че само за една променлива (LDL), разпределението в двете генотипни групи е нормално - $P=0.116$ за C/T генотип и $P=0.929$ за T/T генотип. За другите променливи, поне в една от групите разпределението не е нормално ($P>0.005$). Начините на разпределение на променливите определя вида на статистическите тестове, които ще бъдат използвани, за откриване на значими разлики в изследваните променливи.

Чрез непараметричния критерий на Mann-Whitney (при ненормално разпределение на променливите поне в едната група) или чрез T-критерия на Student (когато и в двете групи разпределението е нормално), за независими извадки са сравнени характеристиките на променливите в двете групи на генотипа. Резултатите са представени на Таблица 7.

Таблица 17. Разлики в биохимичните маркери за оценка на холестеролия профил и кръвна глюкоза между двата генотипа

Генотип		Триглицериди	Общ холестерол	HDL	LDL	Кръвна глюкоза
C/T	Mean	2.14	5.9	1.38	3.63	5.65
	SD	1.44	1.3	0.49	1.17	1.12
	Median	1.80	5.8	1.27	3.53	5.43
T/T	Mean	1.70	6.0	1.51	3.69	5.72
	SD	0.86	1.2	0.47	1.12	1.38
	Median	1.58	5.8	1.48	3.73	5.25
Sig. (P-value)		0.170	0.855	0.044	0.715	0.584

Резултатите от проведените статистически тестове показват, че статистически значима разлика между двата генотипа има само при нивата на HDL холестерола ($P=0.044$, при $P<0,05$) като при носителите на C/T генотип се наблюдават по-ниски стойности на медианата (1.27 mmol/l) на средната концентрация на HDL холестерола, отколкото при носителите на T/T вариант- (1.48 mmol/l) Няма статистически значима разлика в нивата на триглицеридите, общия холестерол, LDL холестерола и кръвната глюкоза ($P>0.05$) между носителите на двата генотипа.

4.7 Влияние на еднонуклеотидния полиморфизъм *rs174547* във десатуразния ген *FADS1* върху изявата на метаболитен синдром

От 120 изследвани лица, 29 лица от настоящето проучване са идентифицирани с метаболитен синдром. Тези подбрани лица покриват поне 3 от критериите за метаболитен синдром:

1. Повишена плазмена глюкоза на гладно > 6 mmol/l.
2. Съотношение талия/ханш >0.90 при мъже и >0.85 при жени или ИТМ >30.
3. Серумни триглицериди >1.7 mmol/l.
4. HDL-холестерол <0.9 mmol/l при мъже и <1.0 mmol/l при жени.
5. Артериално кръвно налягане $\geq 140/90$ mmHg.

От участващите в изследването, 18 лица (15%) отговарят на три от критериите за метаболитен синдром, 10 лица (8.3%) отговарят на 4 от посочените критерии и само един човек (0.8%) има и петте показания за това метаболитно състояние.

Таблица 8. Връзка между генотипната честота на *rs174547* в *FADS1* гена и изявата метаболитен синдром

	Генотип Т/Т брой лица (%)	Генотип Т/С брой лица (%)	Статистическа значимост (P-value)
Лица без метаболитен синдром	44 (48.4%)	47 (51.6%)	P=0.522
Лица със метаболитен синдром	16 (55.2%)	13 (44.8%)	

В нашето проучване 91 (75.8%) от изследваните 120 лица са без метаболитен синдром. Това са хора, които нямат или имат по-малко от три от изброените показатели за метаболитен синдром. Обособени са две групи лица: идентифицирани с метаболитен синдром и такива без метаболитен синдром. Изследвана е връзката на *rs174547* полиморфизъм с изявата на метаболитен синдром. Резултатите са представени на Таблица 8. От лицата, с метаболитен синдром, по горните критерии, 16 (55.2%) са с

генотип Т/Т, а 13 (44.8%) са с генотип Т/С. При сравняването на двете изследвани групи настоящето проучване, не установихме статистически значима разлика между генотиповете при изявата на метаболитен синдром ($p=0.522$).

4.8 Взаимодействие между хранителния прием на мастни киселини, холестероловия профил и генотипа

Кръвните нива на полиненаситените мастни киселини (PUFAs) са под контрол на ендогенния синтез чрез $\Delta 5$ - и $\Delta 6$ -десатурази, кодирани съответно от гените FADS1 и FADS2 и от диетата. Асоциативни проучвания на целия геном (GWAS) съобщават за връзки между полиморфизмите в FADS1-FADS2 и вариациите в плазмените концентрации на PUFAs, HDL- и LDL-холестерол и триглицериди. Не е еднозначно установено обаче дали приемът на PUFAs в храната модулира тези асоциации. Част от целите на настоящето проучване е да оценим дали наситените (SFAs), мононенаситените (MUFAs) и полиненаситените (PUFAs) мастни киселини приети с храната модулират връзката между полиморфизма FADS1 rs174547 и липидния профил.

Много кандидат-гени и асоциативни проучвания на целия геном (GWAS) свързват минорните алели на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) в гените FADS1-FADS2 с по-ниски концентрации на LC-PUFA в кръвта. Минорния алел на нуклеотидния полиморфизъм rs174547 е често свързан с по-високи концентрации на субстрати на десатурационните процеси (като хранителните LA и ALA) и по-ниски концентрации на продуктите на десатурация (като AA, EPA и DHA) (7-12). Въз основа на данните от тези проучвания е направено заключението, че субектите, носещи FADS минорни алели, могат да проявят по-ниска десатуразна активност. Освен това, мета-анализи на данните от някои GWAS проучвания също съобщават за връзки между FADS клъстерни SNP и плазмените нива на триглицериди и общ, HDL- и LDL-холестерол (13,14).

Въпреки че много епидемиологични проучвания свързват хранителния прием на PUFAs със сърдечно-съдови рискови фактори като плазмени липиди и затлъстяване (15-17), малко проучвания изследват взаимодействието между приетите с

храната PUFAs и вариабилността на генния клъстер на FADS върху тези рискови фактори (18-20). Ето защо целта на настоящето проучване е да се оцени дали и как приемът на SFA, MUFA и PUFA с диетата променя връзката между полиморфизма FADS1 rs174547 и метаболитните холестеролови маркери в българска популация.

Доброволците взели участие в проучването попълниха детайлни въпросници за начина на хранене и като цяло начина има на живот, като също така трябваше да водят записки на всичко, което консумират като храни и напитки и алкохол за предходните 24 часа в два различни дни от седмицата, като препоръчително беше единият да е работен ден, а другият почивен. Така беше оценен хранителният им прием по отношение на консумацията на SFA, MUFA и PUFA. Обработени и обобщени данни от средните стойности на биохимичните показатели, разделени по пол и генотип са представени на Таблица 9.

Таблица 9. Средна стойност, стандартно отклонение и статистическа значимост на разликите на биохимичните плазмени показатели разделени по генотип и пол

Пол	Генотип		TG	Chol-total	HDL	LDL	BG
Мъже	С/Т	N	23	23	23	23	23
		Mean	1.82	5.57	1.19	3.58	5.9
		SD	1.20	1.11	0.37	1.01	1.09
	Т/Т	N	21	21	21	21	21
		Mean	2.08	6.41	1.56	3.73	5.53
		SD	0.98	1.09	0.51	1.19	1.26
P value (sig.)			0.189	0.012	0.008	0.259	0.112
Жени	С/Т	N	37	37	37	37	37
		Mean	2.34	6.18	1.50	3.66	5.49
		SD	1.55	1.36	0.52	1.27	1.12
	Т/Т	N	39	39	39	39	39
		Mean	1.49	5.76	1.48	3.67	5.82
		SD	0.73	1.15	0.45	1.09	1.45
P value (sig.)			0.007	0.121	0.950	0.975	0.678

Данните за HDL при мъжете показват средна стойност от 1.19 ± 0.37 mmol/l при участниците с генотип C/T и 1.56 ± 0.51 mmol/l при тези с T/T генотип. За мъжете стойности между 0.90 - 1.45 mmol/l носят умерен риск, над 1.45 mmol/l са без риск, а под 0.9 mmol/l са с висок риск от сърдечно съдови инциденти.

Обобщените данни за LDL холестерола показват средна стойност от 3.58 ± 1.01 mmol/l при мъже носители на C/T генотип и 3.73 ± 1.19 mmol/l при носителите на T/T генотип. Според референтните стойности, посочени от Европейската общност по атеросклероза, тези стойности попадат в графата гранично високи (от 3.37 до 4.13 mmol/l) и показват увеличен риск от дислипидемии и сърдечно-съдови заболявания.

При жените с генотип C/T средната стойност на триглицеридите е 2.34 ± 1.55 mmol/l, а при генотип T/T е 1.49 ± 0.73 mmol/l. Отклонение от референтните стойности (0.3-1.7 mmol/l) показват само носителките на C/T генотип.

Общия холестерол в групата на жените с C/T генотип е 6.18 ± 1.36 mmol/l, а в групата на носителките на T/T генотип – 5.76 ± 1.15 mmol/l. Забелязва се повишение на средните стойности и при двете групи, спрямо препоръчаните референтни (3.5-5.2 mmol/l) за този показател.

Средната стойност на HDL холестерола в групата на доброволките с C/T генотип е 1.5 ± 0.52 mmol/l и 1.48 ± 0.45 mmol/l за носителките на T/T генотип. За жените стойности между 1.15-1.68 mmol/l носят умерен риск, над 1.68 mmol/l са без риск, а под 1.15 mmol/l са с висок риск от сърдечно съдови инциденти.

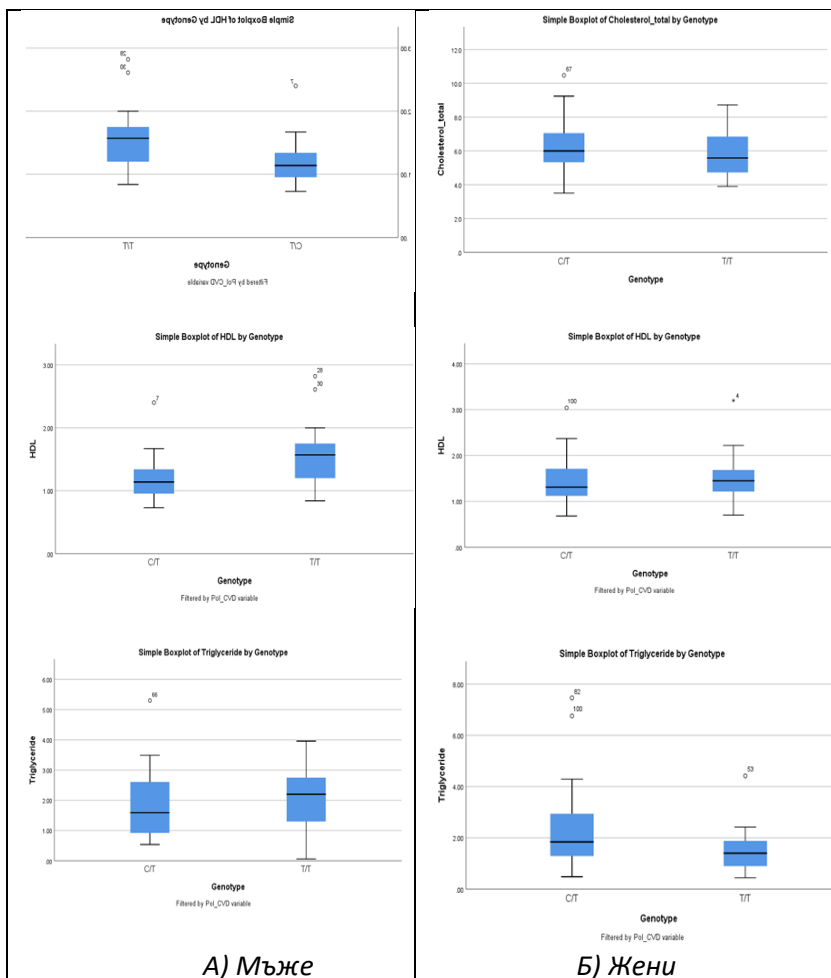
Средните стойности на LDL холестерола при доброволките с C/T генотип е 3.66 ± 1.27 mmol/l, а на тези с T/T носителство 3.67 ± 1.09 mmol/l. Съпоставено с референтните стойности за LDL при жени и при двете групи този показател е с гранично високи стойности (реф: 3.37-4.13 mmol/l.)

За да анализираме дали има статистически значима разлика между средните нива на триглицеридите (TG), различните фракции на холестерола (HDL, LDL, Chol-total), кръвната захар при носителите на двата генотипа (C/T и T/T), отново беше проведен тест на Mann-Whitney за сравнение на средни стойности между

две независими извадки, при ненормално разпределени количествени променливи.

Резултатите от статистическите тестове са представени в Таблица 9 и графично на Фигура 13.

Фигура 13. Графично представяне на разликите в средните нива на общ холестерол (Cholesterol total), LDL холестерол и триглицеридите (Triglycerides) при различните генотипове (C/T и T/T) разделени по пол: А) мъже; Б) жени



От проведения статистически анализ може да се отчете, че сред мъжете има статистически значими различия в средните нива на общия холестерол ($P=0.012$) и HDL холестерол ($P=0.008$) между двата генотипа. Разликата в средните стойности на триглицеридите между двете групи е $P=0.189$, а в средните стойности на LDL холестерола е $P=0.259$. И при двата последни показателя не се покрива критерия за статистическа значимост.

Разликата в средните стойности на кръвната глюкоза между двете изследвани групи, разделени по пол също не е статистически значима ($P=0.112$).

Сред жените има статистически значима разлика между двата генотипа само по отношение на средните нива на триглицеридите ($P=0.007$, при $P<0.05$). Разликите в общия холестерол ($P=0.121$), HDL холестерола ($P=0.950$), LDL холестерола ($P=0.975$) и кръвната глюкоза ($P=0.678$) не удовлетворяват критерия за сигнификантност ($P<0.05$).

Статистическия анализ за значима разлика между среднодневния прием на различни мастни киселини (SFA, MUFA и PUFA) при носителите на двата генотипа (C/T и T/T), беше осъществен чрез тест на Mann-Whitney за сравнение на средни стойности между две независими извадки, при ненормално разпределени количествени променливи. Резултатите от тестовете са представени в Таблица 11 и графично на Фигура 14.

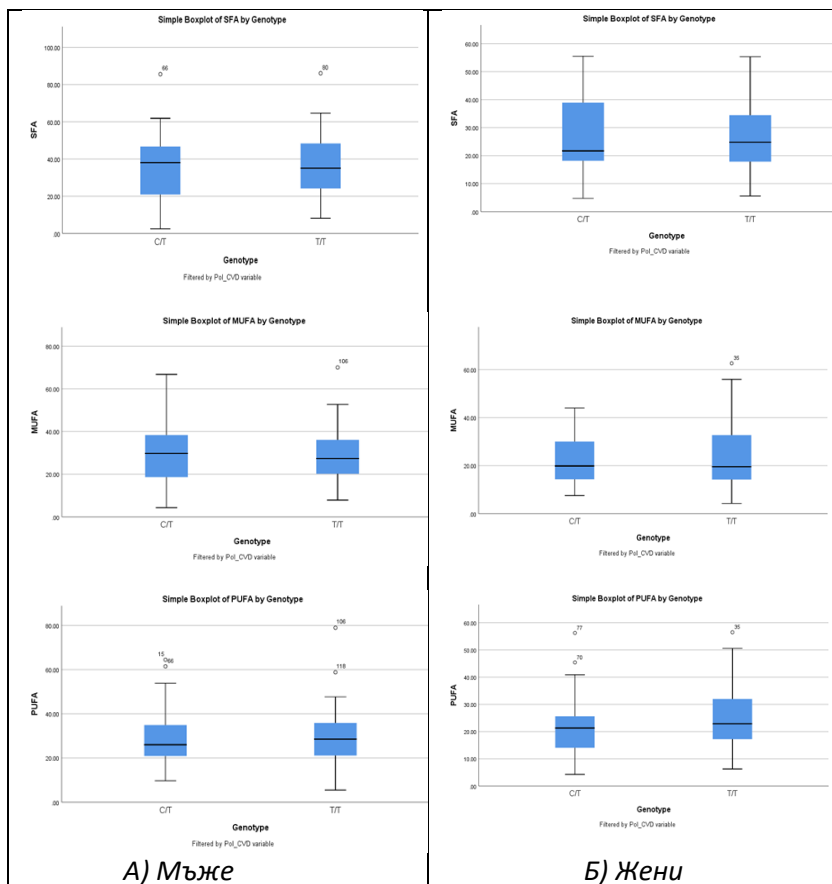
Разликата в среднодневния прием на наситени мастни киселини, постъпили с храната между носители на C/T генотип (36.91 ± 18.57) и T/T генотип (37.25 ± 19.74) при мъжете е $P=0.647$, а при жените (27.16 ± 13.38 за C/T и 26.47 ± 11.06 за T/T) е $P=0.059$. (при значимост $P<0.05$). Разликите в среднодневния приема на мононенаситени мастни киселини между носителите на двата генотипа е $P=0.842$ при мъжете (31.51 ± 16.56 за C/T и 30.81 ± 14.36 за T/T) и $P=0.054$ при жените (22.03 ± 9.46 за C/T и 24.38 ± 13.30 за T/T). И при средно дневния прием на полиненаситени мастни киселини отново не се достига статистически значима разлика между представителите на C/T (30.00 ± 15.17 за мъже и 22.13 ± 10.86 за жени) и T/T (31.08 ± 16.12 за мъже и 24.76 ± 11.59 за жени) генотип ($P=0.647$ в групата на мъжете и $P=0.111$ при жените при значимост $P<0.05$).

Таблица 11. Средна стойност, стандартно отклонение и статистическа значимост на разликите в среднодневния прием на мастни киселини, разделени по генотип и пол

Пол	Геноти п		SFA	MUFA	PUFA
Мъже	C/T	N	23	23	23
		Mean	36.91	31.51	30.00
		SD	18.57	16.56	15.17
	T/T	N	21	21	21
		Mean	37.25	30.81	31.08
		SD	19.74	14.36	16.12
P value (sig.)			0.647	0.842	0.647
Жени	C/T	N	37	37	37
		Mean	27.16	22.03	22.13
		SD	13.38	9.46	10.86
	T/T	N	39	39	39
		Mean	26.47	24.38	24.76
		SD	11.06	13.30	11.59
P value (sig.)			0.059	0.054	0.111

От проведените статистически тестове не беше открита статистически значима разлика в среднодневния прием на различни мастни киселини (наситени, мононенаситени и полиненаситени) между носителите на двата генотипа C/T и T/T. Както може да се види от Табл. 11, нито един от изследваните параметри не покри критерия за статистическа значимост $P < 0.05$ между двете изследвани групи. Трябва да се отбележи, че разликите са още по-незначителни, ако двете групи са разделени само по генотип, но не и по пол. Този факт сочи, че е възможно да съществуват полово обусловени разлики при приема на различните мастни киселини.

Фигура 14. Разлики в среднодневния прием на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини, приети с храната, при различните генотипове (C/T и T/T) и разпределени по пол: А) мъже; Б) жени



За да изследваме корелационната зависимост между лабораторните кръвни показатели на холестероловия профил (средните нива на триглицеридите, различните фракции на холестерола - HDL, LDL, Chol-total и BG), среднодневния прием на мастни киселини (SFA, MUFA и PUFA) и генотипа (C/T и T/T) разделени по пол, беше използван непараметричен тест на Spearman за корелационен анализ за данни с ненормално разпределение.

Таблица 12. Корелационната зависимост между лабораторните кръвни показатели на холестеролия профил, среднодневния прием на мастни киселини и генотипа (С/Т и Т/Т)

Пол	Генотип	Двойка показатели	Корелационен коефициент	Ниво на достоверност (Sig.)
Мъже	С/Т	TG-SFA	0.034	0.879
		TG-MUFA	0.167	0.457
		TG-PUFA	0.089	0.693
		Chol-TotalSFA	-0.004	0.986
		Chol-TotalMUFA	-0.042	0.851
		Chol-TotalPUFA	-0.241	0.268
		HDL-SFA	0.119	0.388
		HDL-MUFA	0.159	0.468
		HDL-PUFA	0.146	0.507
		LDL-SFA	-0.191	0.383
	LDL-MUFA	-0.206	0.347	
	LDL-PUFA	-0.242	0.266	
	TG-SFA	0.182	0.430	
	TG-MUFA	0.057	0.806	
TG-PUFA	0.016	0.947		
Т/Т	Chol-TotalSFA	-0.408	0.067	
	Chol-TotalMUFA	-0.887	0.025	
	Chol-TotalPUFA	-0.213	0.0354	
	HDL-SFA	-0.088	0.703	
HDL-MUFA	-0.195	0.397		
HDL-PUFA	-0.395	0.077		
LDL-SFA	-0.618	0.001		
LDL-MUFA	-0.677	0.001		
LDL-PUFA	-0.329	0.146		
Жени	С/Т	TG-SFA	-0.181	0.283
		TG-MUFA	-0.249	0.138
		TG-PUFA	-0.180	0.285
		Chol-TotalSFA	-0.055	0.748
		Chol-TotalMUFA	-0.157	0.353
		Chol-TotalPUFA	-0.169	0.319
		HDL-SFA	0.144	0.394
		HDL-MUFA	0.045	0.790
		HDL-PUFA	-0.167	0.323
		LDL-SFA	-0.175	0.301
	LDL-MUFA	-0.130	0.442	
	LDL-PUFA	-0.033	0.848	
	TG-SFA	0.000	0.999	
	TG-MUFA	0.060	0.715	
TG-PUFA	0.126	0.443		
Т/Т	Chol-TotalSFA	-0.208	0.208	
	Chol-TotalMUFA	-0.065	0.692	
	Chol-TotalPUFA	0.084	0.610	
	HDL-SFA	-0.052	0.752	
HDL-MUFA	0.008	0.961		
HDL-PUFA	0.038	0.820		
LDL-SFA	-0.203	0.215		
LDL-MUFA	-0.115	0.485		
LDL-PUFA	-0.021	0.898		

* ниво на достоверност p<0.05

След проведения статистически тест се установиха следните корелационни зависимости, при ниво на достоверност $p < 0.05$:

- ✓ При мъжете с T/T генотип има статистически значима обратно пропорционална корелация ($r = -0.487$, $p = 0.025$) между среднодневният прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и тоталния холестерол в плазмата.
- ✓ Не се намира подобна корелация при жените с T/T генотип ($r = -0.065$, $r = 0.692$), както и при мъжете с C/T генотип ($r = -0.042$, $p = 0.851$).
- ✓ При мъжете с T/T генотип има статистически значима отрицателна корелация ($r = -0.618$, $r = 0.003$) между среднодневния прием на наситени мастни киселини (SFA) и LDL плазмен холестерол.
- ✓ Не се установява подобна значима корелация между среднодневния прием на наситени мастни киселини (SFA) и LDL плазмен холестерол при жените от същия T/T генотип. ($r = 0.203$, $p = 0.215$).
- ✓ Не се установява подобна значима корелация между среднодневния прием на наситени мастни киселини (SFA) и LDL плазмен холестерол при мъжете от C/T генотип ($r = -0.191$, $p = 0.383$).
- ✓ При мъжете с T/T генотип има статистически значима отрицателна корелация ($r = -0.677$, $r = 0.001$) между среднодневния прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и LDL плазмен холестерол.
- ✓ Не се наблюдава статистически значима корелация между среднодневния прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и LDL плазмен холестерол при жените с T/T генотип ($r = -0.115$, $p = 0.485$).

- ✓ Не е установена и статистически значима корелация между среднодневния прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и LDL плазмен холестерол при мъжете с C/T генотип ($r=-0.206$, $p=0.347$).
- ✓ Не се намира и статистически значима корелация между плазмените нива на фракциите на холестерола (HDL, LDL, Total-Chol) и триглицеридите и среднодневния прием на полиненаситени мастни киселини (PUFA), нито по пол нито по генотип.
- ✓ Проведения регресионен анализ показва, че променливите генотип, прием на мононенаситени и полиненаситени мастни киселини имат влияние, но обясняват едва 1.9% от стойността на общия холестерол, което е ясна индикация, че вариабилността в холестероловия профил е сложен и многопластов процес, който има множество детерминанти, както генетични, така и епигенетични.

V. ИЗВОДИ

- ✓ Разработена и валидирана е надеждна методология за откриване и анализ на генетични варианти *rs174547* във *FADS1*, високо специфична за анализирания C/T SNP.
- ✓ За първи път е определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред българска популация по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1*.
- ✓ Установено е, че молекулярният биомаркер *rs174547* позволява да се направи индивидуална оценка на метаболизма на мастните киселини и да се проучи взаимодействието между генетичната предразположеност, индивидуалния метаболизъм и приема на храна.

- ✓ Установена е ниска честотата на консумация на храни, богати на полиненаситени мастни киселини сред изследваната група. Няма статистически значима разлика в честотата на консумация на тези храни между различните генотипове Т/Т и С/Т, регистрирани в проучването.
- ✓ В комбинация с ниската консумация на полиненаситени мастни киселини, изследвания генетичен терен (*rs174547*) може да бъде сериозна предпоставка за повишен риск от сърдечно-съдови инциденти, дислипидемия и висока смъртност.
- ✓ Вариабилността *rs174547* в *FADS1* гена би могла да допринася за податливостта на кардиоваскуларни инциденти и дислипидемии чрез промяна на нивата на HDL-C и TG.
- ✓ Не са установени категорични доказателства за ролята на носителство на изследвания полиморфизъм *rs174547* и излявата на затлъстяване и метаболитен синдром.
- ✓ Установи се, че хранителният прием на различни видове мастни киселини (SFA, MUFA, PUFA) може да модулира връзката между вариантите на гена *FADS1* и концентрацията на някои от фракциите на холестерола и триглицеридите, което е полово обусловено и при мъжете се отразява на повече компоненти на холестероловия профил.
- ✓ Установените взаимодействия между генните варианти С/Т и Т/Т и мастните киселини, приемани с храната, дават възможност за персонализиране и оптимизиране на хранителния модел с цел бъдещи здравни ползи.

VI. ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ПРИЛОЖНО - МЕТОДОЛОГИЧЕН ХАРАКТЕР

- ✓ Разработена и въведена е бърза, точна и надеждна молекулярно-генетичен методология за алелна дискриминация на единичен нуклеотиден полиморфизъм *rs174547* във *FADS1* гена и определяне на съответния генотип - C/T, T/T или C/C.
- ✓ Използвайки предложената методология, веднъж открит и определен SNP *rs174547* може да предостави ценна информация относно метаболизма на мастните киселини и може да бъде ценен инструмент за диетолозите, при индивидуална преценка на хранителните изисквания и препоръки за хранене.
- ✓ Разработен и публикуван е информационно-обучителен материал, на тема „Нутригенетични тестове за научна и комерсиална употреба“, който може да бъде намерен на следния линк: <https://ncpha.government.bg/bg/publications-for-profesionals/nutrigenetichni-testove-za-nauchna-i-komersialna-upotreba>

ПРИНОСИ С НАУЧНО - ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР

- ✓ За първи път е определена и охарактеризирана алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1* сред българската популация.
- ✓ Определен е делът на носителите на T-алел на полиморфизма *rs174547* във *FADS1* гена, и е доказано, че той е доста висок (75%) сред българското население, като има научни доказателства, че този вариант е по-неблагоприятния що се отнася до риска от дислипидемия коронарна артериална болест.
- ✓ Охарактеризирано е нутригенетичното взаимодействие на *rs174547* с холестероловия профил и как то се модифицира от приема на различни видове мастни киселини, постъпващи с диетата.

VII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ИЗЯВИ И ПРОЕКТИ

Публикувани статии във връзка с дисертационният труд:

- **Е. Кузова**, Т. Георгиева. *Значението на FADS1 и FADS2 гените за усвояването на омега-3 мастните киселини, постъпили с диетата*. Науката за хранене. С авторитетно настояще и престижно бъдеще. Стр.16-22, 2016. ISBN: 978-954-9977-68-4
- **Е. Kuzova**, Т. Georgieva, V. Duleva. *Development of methodology for analysis of the FADS1 genetic variants – first pilot study in Bulgaria*. Hrana i ishrana, 57 (1): 23-28, 2016. DOI: 10.5937/Hralsh1601023K
- **Е. Кузова**. *Нутригенетика – индивидуалния генетичен терен и как той взаимодейства с нутриентните стимули.*, Българско списание за обществено здраве. Volume.11(3), p:46-57, 2019.
- **Е. Кузова**, Т. Георгиева, В. Дулева. *Генетична вариабилност rs174547 в десатуразния ген FADS1 и честотата на консумация на храни, богати на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини сред българска популация*. Материалът е приет за публикуване в кн.1/2021 на Българско списание за обществено здраве.

Участия в научни прояви и конференции:

- Елена Кузова, Цвета Георгиева. X-ти НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО ХРАНЕНЕ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ, на тема „Значението на *FADS1* и *FADS2* гените за усвояването на омега-3 мастните киселини, постъпили с диетата“ проведен в периода 27 до 30 май 2015 г. в Международен дом на учените „Фредерик Жолио - Кюри“, к.к. „Св. Константин и Елена“, гр. Варна.
- E. Kuzova, V. Duleva, Tz. Georgieva. 13th Congress of Nutrition-Food and Nutrition-a Road Map to Better Health with poster presentation “Development of methodology for analysis of the *FADS1* genetic variants – first pilot study in Bulgaria”. The congress was organized by Serbian Nutrition Society under auspices of Federation of European Nutrition Societies (FENS). 26-28 October 2016, Belgrade, Serbia
- Е.Кузова, Цв.Георгиева, В. Дулева, С.Арсова, З.Радионова, В.Бирданова, И.Химчева. VIII Национална Конференция по Хранене, с постер на тема „Разпространение и честота на единичен нуклеотиден полиморфизъм *rs174547*, локализиран във *FADS1* гена, сред българска популация“. 01-03 Юни 2017г., МДУ „Фредерик Жолио-Кюри“, Варна, България
- E. Kuzova, Tz. Georgieva, V. Duleva, Z.Radionova, V. Birdanova, I. Himcheva. NuGo week 2017-“Molecular nutrition- understanding how food influences health”. Poster “Association between fatty acid desaturase 1 gene polymorphism and blood cholesterol biomarkers in Bulgarian elderly”. Varna, Bulgaria, 28-31 August 2017.
- E.Kuzova, D. Dimbareva, Tz. Georgieva, V. Duleva. 16th World Congress on public Health 2020: Public health for the future of humanity: analysis, advocacy and action”, virtual edition, 12-16 October 2020. Poster with main theme “SNP frequency *rs174547* localized in the *FADS1* gene, in the Bulgarian population”

Участия в изследователски проекти:

- Участие в изследователски екип по изпълнение на Проект 3/2016, спечелил грант от конкурс за финансиране на научно-изследователски проекти към Медицински университет-Плевен и съгласно Договор № ДД-02/14.01.2016 за съвместна научна дейност, на тема: „Проучване на генотипа (единични нуклеотидни полиморфизми в FADS1 гените) и липидния метаболизъм за модифициране на хранителния прием“.
- Участие в изследователски екип по Проект 15/2017 с осигурен финансов грант, предоставян от Медицински университет-Плевен, съвместно с екип от специалисти от същия университет и съгласно Договор № ДД-02/14.01.2016 за съвместна научна дейност с научна тематика: „Проучване на хранителния прием, физическата активност и FADS1 (rs174547) генотипа при лица с метаболитен синдром“.

VIII. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1. Mach, F., C. Baigent, A. L. Catapano, K. C. Koskinas, M. Casula, L. Badimon, M. J. Chapman, G. G. De Backer, V. Delgado, B. A. Ference, I. M. Graham, A. Halliday, U. Landmesser, B. Mihaylova, T. R. Pedersen, G. Riccardi, D. J. Richter, M. S. Sabatine, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglou, O. Wiklund, C. Mueller, H. Drexel, V. Aboyans, A. Corsini, W. Doehner, M. Farnier, B. Gigante, M. Kayikcioglu, G. Krstacic, E. Lambrinou, B. S. Lewis, J. Masip, P. Moulin, S. Petersen, A. S. Petronio, M. F. Piepoli, X. Pintó, L. Räber, K. K. Ray, Ž. Reiner, W. F. Riesen, M. Roffi, J.-P. Schmid, E. Shlyakhto, I. A. Simpson, E. Stroes, I. Sudano, A. D. Tselepis, M. Viigimaa, C. Vindis, A. Vonbank, M. Vrablik, M. Vrsalovic, J. L. Zamorano, J.-P. Collet, K. C. Koskinas, M. Casula, L. Badimon, M. John Chapman, G. G. De Backer, V. Delgado, B. A. Ference, I. M. Graham, A. Halliday, U. Landmesser, B. Mihaylova, T. R. Pedersen, G. Riccardi, D. J. Richter, M. S. Sabatine, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglou, O. Wiklund, S. Windecker, V. Aboyans, C. Baigent, J.-P. Collet, V. Dean, V. Delgado, D. Fitzsimons, C. P. Gale, D. Grobbee, S. Halvorsen, G. Hindricks, B. Iung, P. Jüni, H. A. Katus, U. Landmesser, C. Leclercq, M. Lettino, B. S. Lewis, B. Merkely, C. Mueller, S. Petersen, A. S. Petronio, D. J. Richter, M. Roffi, E. Shlyakhto, I. A. Simpson, M. Sousa-Uva, R. M. Touyz, D. Nibouche, P. H. Zelveian, P. Siostrzonek, R. Najafov, P. Van De Borne, B. Pojskic, A. Postadzhiyan, L. Kypris, J. Špinar, M. L. Larsen, H. S. Eldin, M. Viigimaa, T. E. Strandberg, J. Ferrières, R. Agladze, U. Laufs, L. Rallidis, L. Bajnok, T. Gudjónsson, V. Maher, Y. Henkin, M. M. Gulizia, A. Mussagaliyeva, G. Bajraktari, A. Kerimkulova, G. Latkovskis, O. Hamoui, R. Slapikas, L. Visser, P. Dingli, V. Ivanov, A. Boskovic, M. Nazzi, F. Visseren, I. Mitevska, K. Retterstøl, P. Jankowski, R. Fontes-Carvalho, D. Gaita, M. Ezhov, M. Foscoli, V. Giga, D. Pella, Z. Fras, L. P. De Isla, E. Hagström, R. Lehmann, L. Abid, O. Ozdogan, O. Mitchenko, R. S. Patel. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European heart journal*. 2020;41(1):111-188.
2. Parrott, M., J. M. McDonald, N. K. Maclaren, D. E. Goldstein, D. E. Bruns, D. B. Sacks. *Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus*. *Clinical Chemistry*. 2002;48(3):436-472.
3. Collaboration, T. E. R. F. *Lipid-Related Markers and Cardiovascular Disease Prediction*. *Jama*. 2012;307(23).
4. Ference, B. A., J. J. P. Kastelein, K. K. Ray, H. N. Ginsberg, M. J. Chapman, C. J. Packard, U. Laufs, C. Oliver-Williams, A. M. Wood, A. S. Butterworth, E. Di Angelantonio, J. Danesh, S. J. Nicholls, D. L. Bhatt, M. S. Sabatine, A. L. Catapano. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *Jama*. 2019;321(4):364.
5. Malerba, G., L. Schaeffer, L. Xumerle, N. Klopp, E. Trabetti, M. Biscuola, U. Cavallari, R. Galavotti, N. Martinelli, P. Guarini, D. Girelli, O. Olivieri, R. Corrocher, J. Heinrich, P. F. Pignatti, T. Illig. SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids*. 2008;43(4):289-99.

6. Kuang, H., F. Yang, Y. Zhang, T. Wang, G. Chen. *The Impact of Egg Nutrient Composition and Its Consumption on Cholesterol Homeostasis. Cholesterol. 2018;2018:1-22.*
7. Bokor, S., J. Dumont, A. Spinneker, M. Gonzalez-Gross, E. Nova, K. Widhalm, G. Moschonis, P. Stehle, P. Amouyel, S. De Henauw, D. Molnar, L. A. Moreno, A. Meirhaeghe, J. Dallongeville, H. S. Group. *Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. Journal of lipid research. 2010;51(8):2325-33. PMID: 2903808.*
8. Dorajoo, R., Y. Sun, Y. Han, T. Ke, A. Burger, X. Chang, H. Q. Low, W. Guan, R. N. Lemaitre, C.-C. Khor, J.-M. Yuan, W.-P. Koh, C. N. Ong, E. S. Tai, J. Liu, R. M. Van Dam, C.-K. Heng, Y. Friedlander. *A genome-wide association study of n-3 and n-6 plasma fatty acids in a Singaporean Chinese population. Genes & nutrition. 2015;10(6).*
9. Guan, W., B. T. Steffen, R. N. Lemaitre, J. H. Y. Wu, T. Tanaka, A. Manichaikul, M. Foy, S. S. Rich, L. Wang, J. A. Nettleton, W. Tang, X. Gu, S. Bandinelli, I. B. King, B. Mcknight, B. M. Psaty, D. Siscovick, L. Djousse, Y.-D. I. Chen, L. Ferrucci, M. Fornage, D. Mozafarian, M. Y. Tsai, L. M. Steffen. *Genome-Wide Association Study of Plasma N6 Polyunsaturated Fatty Acids Within the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium. Circulation: Cardiovascular Genetics. 2014;7(3):321-331.*
10. Mccarthy, M. I., R. N. Lemaitre, T. Tanaka, W. Tang, A. Manichaikul, M. Foy, E. K. Kabagambe, J. A. Nettleton, I. B. King, L.-C. Weng, S. Bhattacharya, S. Bandinelli, J. C. Bis, S. S. Rich, D. R. Jacobs, A. Cherubini, B. Mcknight, S. Liang, X. Gu, K. Rice, C. C. Laurie, T. Lumley, B. L. Browning, B. M. Psaty, Y.-D. I. Chen, Y. Friedlander, L. Djousse, J. H. Y. Wu, D. S. Siscovick, A. G. Uitterlinden, D. K. Arnett, L. Ferrucci, M. Fornage, M. Y. Tsai, D. Mozaffarian, L. M. Steffen. *Genetic Loci Associated with Plasma Phospholipid n-3 Fatty Acids: A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies from the CHARGE Consortium. PLoS genetics. 2011;7(7):e1002193.*
11. Rzehak, P., J. Heinrich, N. Klopp, L. Schaeffer, S. Hoff, G. Wolfram, T. Illig, J. Linseisen. *Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (FADS1 FADS2) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. The British journal of nutrition. 2009;101(1):20-6.*
12. Schaeffer, L., H. Gohlke, M. Muller, I. M. Heid, L. J. Palmer, I. Kompauer, H. Demmelair, T. Illig, B. Koletzko, J. Heinrich. *Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. Human molecular genetics. 2006;15(11):1745-56.*
13. Consortium, G. L. G. *Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. Nature genetics. 2013;45(11):1274-1283.*

14. Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, C. T. Johansen, S. W. Fouchier, A. Isaacs, G. M. Peloso, M. Barbalic, S. L. Ricketts, J. C. Bis, Y. S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M. F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J. Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Twee-Hee Ong, D. C. Croteau-Chonka, L. A. Lange, J. D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R. Y. Zee, A. F. Wright, J. C. Witteman, J. F. Wilson, G. Willemsen, H. E. Wichmann, J. B. Whitfield, D. M. Waterworth, N. J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B. F. Voight, V. Vitart, A. G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J. R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H. M. Stringham, T. D. Spector, N. Soranzo, J. H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E. J. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L. M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B. M. Psaty, P. P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B. W. Penninx, N. L. Pedersen, C. Pattaro, A. N. Parker, G. Pare, B. A. Oostra, C. J. O'donnell, M. S. Nieminen, D. A. Nickerson, G. W. Montgomery, T. Meitinger, R. Mcpherson, M. I. Mccarthy, W. Mcardle, D. Masson, N. G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P. K. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R. J. Loos, M. L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L. J. Launer, E. G. Lakatta, R. Laaksonen, K. O. Kyvik, F. Kronenberg, I. R. Konig, K. T. Khaw, J. Kaprio, L. M. Kaplan, A. Johansson, M. R. Jarvelin, A. C. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J. J. Hottenga, A. Hofman, A. A. Hicks, C. Hengstenberg, I. M. Heid, C. Hayward, A. S. Havulinna, N. D. Hastie, T. B. Harris, T. Haritunians, A. S. Hall, U. Gyllenstein, C. Guiducci, L. C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N. B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K. G. Ejebe, A. Doring, A. F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E. J. De Geus, U. De Faire, G. Crawford, F. S. Collins, Y. D. Chen, M. J. Caulfield, H. Campbell, N. P. Burt, L. L. Bonnycastle, D. I. Boomsma, S. M. Boekholdt, R. N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C. M. Ballantyne, T. L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T. Y. Wong, E. S. Tai, A. B. Feranil, C. W. Kuzawa, L. S. Adair, H. A. Taylor, Jr., I. B. Borecki, S. B. Gabriel, J. G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R. M. Krauss, K. L. Mohlke, J. M. Ordovas, P. B. Munroe, J. S. Kooner, A. R. Tall, R. A. Hegele, J. J. Kastelein, E. E. Schadt, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, D. P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M. P. Reilly, N. J. Samani, H. Schunkert, L. A. Cupples, M. S. Sandhu, P. M. Ridker, D. J. Rader, C. M. Van Duijn, L. Peltonen, G. R. Abecasis, M. Boehnke, S. Kathiresan. *Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature.* 2010;466(7307):707-13. PMID: PMC3039276.
15. Bender, N., M. Portmann, Z. Heg, K. Hofmann, M. Zwahlen, M. Egger. *Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. Obesity Reviews.* 2014;15(8):657-665.
16. Ooi, E., G. Watts, T. Ng, P. Barrett. *Effect of Dietary Fatty Acids on Human Lipoprotein Metabolism: A Comprehensive Update. Nutrients.* 2015;7(6):4416-4425.
17. Russo, G. L. *Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. Biochemical pharmacology.* 2009;77(6):937-946.

18. Dumont, J., I. Huybrechts, A. Spinneker, F. Gottrand, E. Grammatikaki, N. Bevilacqua, K. Vyncke, K. Widhalm, A. Kafatos, D. Molnar, I. Labayen, M. Gonzalez-Gross, P. Amouyel, L. A. Moreno, A. Meirhaeghe, J. Dallongeville. *FADS1 Genetic Variability Interacts with Dietary α -Linolenic Acid Intake to Affect Serum Non-HDL-Cholesterol Concentrations in European Adolescents. The Journal of nutrition.* 2011;141(7):1247-1253
19. Hellstrand, S., E. Sonestedt, U. Ericson, B. Gullberg, E. Wirfalt, B. Hedblad, M. Orho-Melander. *Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. Journal of lipid research.* 2012;53(6):1183-9. PMID: 3351825.
20. Lu, Y., E. J. M. Feskens, M. E. T. Dollé, S. Imholz, W. M. M. Verschuren, M. Müller, J. M. A. Boer. *Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. The American journal of clinical nutrition.* 2010;92(1):258-265.