



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОХИМИЯ“

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд за придобиване на образователната
и научна степен „Доктор“

**РОЛЯ НА ФАКТОРИ, МОДУЛИРАЩИ
ИНДИВИДУАЛНИЯ РЕПАРАТИВЕН КАПАЦИТЕТ
ВЪВ ФИЗИОЛОГИЧНИ
И ПАТОЛОГИЧНИ УСЛОВИЯ**

Докторант: Павлина Йорданова Челенкова
Научен ръководител: доц. д-р Стоян Александров Чакъров

Професионално направление: 4.3. Биологически науки
(Молекулярна биология - Рекombинантна ДНК)
Шифър на научна област: 01.06.04. (молекулярна биология)

София
2017

Дисертационният труд съдържа 167 страници, 4 фигури и 12 таблици. Цитирани са 287 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедра "Биохимия" при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски", състоял се на 10. 10. 2017 г. (протокол № 637/10. 10. 2017 г.).

Защитата на дисертационния труд ще се състои наот часа в Заседателната зала на Биологическия факултет на СУ "Св. Климент Охридски".

Копия от докторската дисертация се съхраняват в Национален център по информация и документация (НАЦИД), в Националната библиотека "Св. Св. Кирил и Методий" и в архива на СУ "Св. Климент Охридски".

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения	4
I. Въведение	5
II. Литературен обзор	5
III. Цел на настоящата работа и конкретизирани задачи за нейната реализация	10
IV. Материали и методи	12
V. Резултати и дискусия	13
VI. Основни резултати, получени в хода на изпълнението на задачите по дисертационния труд	43
VII. Основни изводи	45
VIII. Научни приноси	47
IX. Цитирана в автореферата литература	49
X. Списък на публикациите на докторанта, свързани с дисертационния труд	53
XI. Резюме на английски език	57

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АРОЕ - Apolipoprotein E, аполипопротеин E
CI - confidence interval, доверителен интервал
ERCC1 - excision repair cross-complementation group
LDL - low density lipoprotein particles, липопротеинови частици с ниска плътност
MTHFR - 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, 5,10-метилентетраhydrofolатредуктаза
OR - odds ratio, относителен риск
PAI - plasminogen activator inhibitor, инхибитор на активатора на плазминогена
PCR-RFLP - polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism, анализ на дължината на фрагменти, получени след обработка на амплифицирани фрагменти с рестрикционни ендонуклеази
PT - prothrombin, протромбин
TP53 - tumour protein p53, туморен белтък p53
XPC - xeroderma pigmentosum комплементационна група C
XPB - xeroderma pigmentosum комплементационна група D
XRCC - X-ray repair cross-complementing protein
ДНК - деоксирибонуклеинова киселина
ЕСК - ембрионални стволови клетки
ИРК - индивидуален репаративен капацитет
РНК - рибонуклеинова киселина

XI. РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

The thesis is dedicated to studies of the role of individual capacity for DNA repair and maintenance of genomic integrity in health and disease. It investigates the potential links between carriership of polymorphisms in key genes coding for proteins of DNA repair and risk for cerebral vascular disease and breast cancer in the Bulgarian population. Statistically significant correlations were identified between carriership of four markers of capacity for DNA repair, one marker for propensity to cerebral amyloidosis and the risk for cerebral vascular accidents were identified and potential directions for clinical applications in the future were outlined. The panel of markers was applied to cultured human cells (standardized cells lines and one Bulgarian hESC line) and data potentially relevant to research and prospective clinical applications were derived. Elements of the marker panel were used to test for selection in key DNA repair loci in mammary gland tumours and evidence for loss of heterozygosity on somatic levels was detected. Genetic analysis was supported by analysis of mean telomere length as a phenotypic marker in healthy controls and patients with stroke. Potentially significant correlations were identified. The results of this doctoral work may set a basis for future studies of individual repair capacity as an accessory diagnostic tool in assessment of risk, diagnostics, monitoring of therapies and prognostication of outcomes in common late-onset disease.

DNA repair proteins XPC, XPD and XRCC3 may modulate the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Постерна сесия, KD 24, стр. 41.

I. Въведение

Анализът на връзката между генотипа и фенотипа посредством генетично обусловени и/или фенотипни маркери е съвременен направление на индивидуализираната медицина. Този анализ поставя основата за създаване на надеждна система за оценка на потенциалните изходи от дадено заболяване или състояние, предварителна оценка за приложимост на терапии, и на риска от усложнения на терапии, включително и на риск от развитие на резистентност към определени терапевтични агенти. Дори между клинично здравите индивиди от един и същи вид могат да съществуват значими и измерими различия между способността за поправка на генотоксични увреждания, индукция на програмирана клетъчна смърт при увредени клетки и последващата им замяна с нови клетки. Дефекти в механизмите за поправка на ДНК участват в патогенезата на голяма част от много често срещаните заболявания с начало в средната и напреднала възраст като рак, метаболитен синдром/диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания, невродегенеративни заболявания. Способността уврежданията в ДНК да се поправят ефективно може да има ефект и върху хода и изхода на вече развили се заболявания. Настоящият дисертационен труд е посветен на създаване и първоначално изпитване на комплексен лабораторен инструмент за оценка на индивидуалния репаративен капацитет при човека, приложим в научно-изследователската практика за оценка на риска при клинично здрави индивиди. Впоследствие този инструмент би могъл да намери приложение при оценката на правилното прилагане и мониториране на терапевтични стратегии при пациенти с различни заболявания и състояния (както субклинични, така и клинично проявени).

II. Литературен обзор

Индивидуалният репаративен капацитет (ИРК) е комплексен израз на способността на клетките и тъканите да се справят с уврежданията, предизвикани от ежедневните генотоксични въздействия с ендегенен или екзогенен произход, както и на способността увредените клетки да се отстраняват от клетъчния пул и да се подменят с нови. Индивидуалният репаративен капацитет може да не бъде еднакъв в различните фази на живота на индивида. В различните тъкани на един и

същи организъм ИРК също може да се различава, понякога значително. Индивидуалните особености на репаративния капацитет имат различна „тежест“ при клинично здравите индивиди и при тези, при които вече се е развило дадено заболяване или състояние. При млади и клинично здрави индивиди, ефективността на механизмите на ДНК поправка е много висока. При наличие на заболяване, обаче, както и при агресивни терапии, тези малки различия могат да станат решаващи по отношение на изхода от заболяването, избора на терапия и/или риска от усложнения.

ДНК поправката играе роля за конституиране на риска на практически всички типове болести на напредналата възраст - рак, сърдечно-съдови заболявания, инсулинова резистентност/диабет тип 2, старческа катаракта, дегенеративни заболявания на ставите и съединителната тъкан, невродегенеративни заболявания, атеросклерозата и други [1-9]. Познаването на особеностите на репаративния капацитет при конкретния индивид може да осигури необходимата база за вземане на информирани решения по отношение на начина на живот при здрави индивиди, както и за формиране на адекватни, максимално ефективни и възможно най-нискотоксични терапевтични стратегии, когато заболяването или състоянието вече е възникнало, както и да се предвидят потенциалните усложнения, за да се осигури подходяща превенция на токсичните ефекти.

В литературата съществуват данни, че нарушенията в процесите на подновяване на клетките на ендотела на кръвоносните съдове и индукцията на апоптоза поради наличие на окислителни увреждания в тяхната ДНК са свързани с повишаване на риска от нарушения на целостта на съдовата стена и образуване на тромби, особено в места с атеросклеротични увреждания [10], което повишава риска от съдови инциденти. За оценка на ролята на индивидуалния репаративен капацитет при клинично здрави индивиди и при индивиди с патологични състояния (церебрално-съдови инциденти), в рамките на настоящото проучване бяха използвани маркери за оценка на индивидуалния капацитет за поправка на ДНК и самоподновяване на клетъчни популации от два основни типа: полиморфизми в гени, кодиращи продукти, които участват в

3. Chelenkova P, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S, Petkova R. The apolipoprotein E polymorphism alone may not be a reliable genetic predictor for the risk of hemorrhagic stroke and post-stroke cognitive decline in the Bulgarian population unless supported by other biomarkers. Младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, Р44, стр. 163.

4. Chelenkova P, Petkova R, Chakarov S. Individual capacity for maintenance of genomic integrity - a novel tool in the assessment of the risk for common adult-onset human diseases and conditions and their late complications. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, София, България. Направление "Биотехнологии и здраве". Доклад, сесия I, стр. 19.

5. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova-Glaveeva S, Tournev I, Chakarov S. Carriership of 'pro-apoptotic' and 'damage-sustaining' alleles of genes coding for proteins functioning in DNA repair may increase the risk for major vascular incidents by destabilising the endothelial wall. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, София, България. Постерна сесия, Направление "Биотехнологии и здраве". НВТН 20, стр. 62.

6. Chelenkova P, Petkova R, Georgieva E, Chakarov S. Predominance of *TP53* P72R Arg alleles in mammary gland tumour samples from Bulgarian patients. Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври 2014, София, България. Постерна сесия, Направление "Биотехнологии и здраве". НВТН 21, стр. 63.

7. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S. Common variant alleles of *APOE* modulate the risk for cerebrovascular incidents in a gender-dependent fashion in the Bulgarian population. Първа национална конференция по реинтродукция на консервационно значими видове и младежка научна конференция „Климентови дни“, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, 19-20 ноември, 2015, София, България. Направление "Молекулярна биология и биотехнологии". Доклад, сесия II, стр. 15.

8. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S. Polymorphisms in genes coding for major

(E2, E4) may be associated with gender-dependent modulation of the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. *Compt Rend Bulg Acad Sci.* 2016; 69(12):1533-40.

8. Petkova R, **Chelenkova P**, Tournev I, Chakarov S. The minus of a plus is a minus. Predisposition to mass death of selected neural cell populations in sporadic late-onset neurodegenerative disease may involve a genetic combination of subtly decreased capacity to repair oxidative lesions in DNA and increased propensity for damage-related apoptosis. *Biotechnol Equip.* 2016; 30(4), 623-43.

II. Доклади от конгреси, резюмета от които са публикувани в списания с импакт индекс, които имат независими цитирания

1. **Chelenkova P**, Petkova R, D' Ascanio I, Zhelev N, Chakarov S. In sickness and in health: a set of markers for individual repair capacity in risk assessment, monitoring and prognosis of human disease. (July 2013) - abstracts of the European Biotechnology Congress May 2013, Bratislava, Slovakia. Abstract published in: *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24(suppl. 1):S105.

III. Научни доклади и съобщения

1. Chicheva Z, **Chelenkova P**, Petkova R, Chamova T, Jelyazkova-Glaveeva S, Tournev I, Chakarov St. Repair plan vs. plan repair - a panel for assessment of individual repair capacity under physiological and pathological conditions. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, Poster session, P58, 22-23 ноември, 2012, София, България.

2. **Chelenkova P**, Petkova R, Chamova T, Jelyazkova S, Tournev I, Chakarov S. The XPCins83 polymorphism in its homozygous state may exert an independent protective effect against cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. Младежка научна конференция „Климентови дни”, Биологически Факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, 21-23 ноември, 2013, София, България. Постерна сесия, P31, стр. 64-65.

разпознаването на уврежданията в ДНК; поправката на ДНК и поддържането на интегритета на генома, от една страна, и, от друга страна - маркер, основан на генотип-фенотипно взаимодействие - определяне на дължина на теломери. За целите на настоящата дисертация избрахме да изследваме полиморфизми в гените, кодиращи белтъците, отговорни за поправката на ДНК и/или поддръжката на геномния интегритет *TP53* (Pro72Arg, rs1042522 - поддръжка на геномния интегритет), *XPC* (*XPCins83* - поправка с изрязване на нуклеотиди в нетранскрибираните региони на генома), *XPD* (*XPD (ERCC2)* Lys751Gln, rs13181 - поправка с изрязване на нуклеотиди), *ERCC1* (C8092A, (rs3212986 - поправка с изрязване на нуклеотиди), *XRCC1* (Arg399Gln, rs25487 - поправка с изрязване на бази) и *XRCC3* (Thr241Met, rs861539 - поправка на двуверижни скъсвания), тъй като за тях има значително количество предходно натрупана в литературата информация, потвърждаваща надеждността им като биомаркери (където беше възможно, бяха използвани данни от мета-анализи) [11-15]. Маркерът *MTHFR C677T* (rs1801133) беше включен в панела от маркери за ИПК, тъй като в литературата има данни, че носителството на вариантите му алели е свързано с повишен риск от карциногенеза [16-18].

Във връзка с изследванията, проведени върху пациенти с цереброваскуларни инциденти, за да се отдиференцира потенциалния ефект на други генетични фактори, водещи до повишено кръвосъсирване и съдови инциденти, бяха изследвани и най-често срещаните „класически” маркери за повишен риск от тромбози – *MTHFR C667T*, Factor V Leiden (rs1800595), *PTG20210A* (rs1799963) и *PAI 4G/5G* (rs1799889) [19-21]. Тъй като дислипидемията, свързана с полиморфизми в гена *APOE* също е доказан рисков фактор за възникване на съдови инциденти [23-25], триалелната маркерна система *APOE E2/E3/E4* беше също включена в панела.

Дължината на теломерите, най-общо казано, отразява състоянието на клетките и клетъчните популации (или, ако се разсъждава усреднено, на целия организъм) по отношение на капацитета за подновяване на тъканите. В литературата има значително количество информация за връзката между дължина на теломерите и темпа им на скъсяване и риска от възникване на

различни заболявания, включително сърдечно-съдови и неопластични [26-28]. Въз основа на това, като фенотипен маркер (отразяващ взаимодействието между генотипа и околната среда) в настоящата работа беше използвана оценката на средна дължина на теломери по метода на терминалните фрагменти.

Панелът от маркери беше приложен към група подбрани по пол (съотношение приблизително 1:1) пациенти на възраст 20-65 години, подбрана подходящо по пол и възраст група от клинично здрави индивиди, за да се изследва ролята на индивидуалния репаративен капацитет за риска от церебрално-съдови инциденти. Данни за връзката между нивата на окислителния стрес и риска от съдови инциденти съществуват в литературата [29,30], но изследвания на ролята на генетичните фактори за конституирането на този риск все още има много малко, както в световен план, така и специфично за българската популация [31-33].

Стабилизираните клетъчни линии се поддържат дълго време в култура и преминават през многобройни пасажи. В тази връзка, оценката на капацитета за поправка на увреждания в ДНК е особено важен за линиите от стволни клетки, тъй като появата на мутации, придаващи нежелани свойства на клетъчната линия може да създаде много бъдещи проблеми и със сигурност би елиминирала възможността за потенциално бъдещо клинично приложение на клетките. В тази връзка някои изследователи вече смятат, че охарактеризирането на поддържаните *in vitro* в недиференцирано състояние линии от ембрионални стволни клетки трябва да бъдат охарактеризирани и по отношение на генетично заложен риск от геномна нестабилност [34,35]. Данните за ИРК на линии човешки ембрионални стволни клетки все още са изключително ограничени в специализираната литература, а това може да се окаже важен показател за тяхната преживяемост, съхранението на пролиферативния им капацитет при последователно пасажирание, и за потенциалната им приложимост за клинични цели. Поради тези съображения, проведохме и включваме в настоящата работа включихме изследвания върху ИРК на една от двете получени в България линии човешки ЕСК в настоящия дисертационен труд [36].

Панелът от маркери, споменат по-горе беше приложен и за охарактеризиране на две от обезсмъртени човешки клетъчни

Х. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ НА ДОКТОРАНТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

І. Излезли от печат научни статии

1. Chicheva Z, **Chelenkova P**, Petkova R, Chakarov S. Children of the Sun, children of the Moon – a mini-panel for assessment of inter-individual variation between the capacity of healthy individuals to repair everyday genotoxic insults. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2012; 26(4):3142-7.

Забележка: Първият и вторият автор са отбелязани като равностойни.

2. **Chelenkova P**, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova-Glaveeva S, Tournev I, Chakarov S. Homozygous carriership of the wildtype allele of the XPCins83 polymorphism is an independent protective factor against cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. *Compt Rend Acad Bulg Sci.* 2014; 67(2):263-8.

3. Petkova R, **Chelenkova P**, Georgieva E, Chakarov S. What's your poison? Impact of individual repair capacity on the outcomes of genotoxic therapies in cancer. Part I – role of individual repair capacity in the constitution of risk for late-onset multifactorial disease. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2013; 27(6):4208-16.

4. Petkova R, **Chelenkova P**, Georgieva E, Chakarov S. What's your poison? Impact of individual repair capacity on the outcomes of genotoxic therapies in cancer. Part II – information content and validity of biomarkers for individual repair capacity in the assessment of outcomes of anticancer therapy. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2014; 28(1):2-7.

5. **Chelenkova P**, Petkova R, Chakarov S. Individual capacity for maintenance of genomic integrity - a novel tool in the assessment of the risk for common adult-onset human diseases and conditions and their late complications. *Ann Rev Sofia Univ.* 2015; 100(4):110-7.

6. **Chelenkova P**, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S. Polymorphisms in genes coding for major DNA repair proteins *XPC*, *XPB* and *XRCC3* may modulate the risk for cerebrovascular incidents in the Bulgarian population. *Ann Rev Sofia Univ.* 2016; 101(4):116-24.

7. **Chelenkova P**, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S. Carriership of the variant alleles of *APOE*

62. Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, Jongmans W, Cox DG, Pisani P, Gérard JP, Hall J. *Cancer Res.* 2003 Dec 15; 63(24):8717-25.
63. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Heegaard NH, Steffensen R, Sillesen H, Jensen G, Nordestgaard BG. *Circulation.* 2004 Jan 6; 109(1):59-65.
64. Ahn J, Ambrosone CB, Kanetsky PA, Tian C, Lehman TA, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Chang-Claude J. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(23):7063-70.
65. Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, Caan B, Potter JD, Slattery ML. *Gut.* 2009 May; 58(5):661-7.
66. Metzger R, Warnecke-Eberz U, Alakus H, Kütting F, Brabender J, Vallböhmer D, Grimminger PP, Mönig P, Drebber U, Hölscher AH, Bollschweiler E. *J Gastrointest Surg.* 2012 Jan; 16(1):26-34; discussion 34.
67. Sugawara K. *J Mol Histol.* 2006; 37:189-202.
68. Unal M, Güven M, Batar B, Ozaydin A, Sarici A, Devranoğlu K.. *Exp Eye Res.* 2007 Sep; 85(3):328-34.
69. de Lau LM, Leebeek FW, de Maat MP, Koudstaal PJ, Dippel DW. *Expert Rev Neurother.* 2010 Aug;10(8):1321-9.
70. Kim RJ, Becker RC. *Am Heart J.* 2003 Dec;146(6):948-57.
71. Aznar J, Mira Y, Vayá A, Corella D, Ferrando F, Villa P, Estellés A. *Thromb Haemost.* 2004 May; 91(5):1031-4.
72. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. *Carcinogenesis.* 2000 Apr; 21(4):551-5.
73. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K. *Carcinogenesis.* 2004 May; 25(5):757-63.
74. Derradji H, Bekaert S, Van Oostveldt P, Baatout S. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr; 25(2A): 1039-50.
75. Kapoor V, Telford W. *Methods Mol Biol.* 2004; 263:385-98.
76. 285. Sarzotti-Kelsoe M, Daniell XG, Whitesides JF, Buckley RH. *Immunol Res.* 2011 Apr; 49(1-3): 44-8.
77. Jiang X, Zhou L-T, Zhang S-C, Chen K. *Chin J Cancer Res.* 2012 Sep; 24(3):181-9.

линии (T-1301, Jurkat E6). Те са рутинно използвани за контролни цели в практиката, но техните свойства по отношение на ИРК досега не са били изследвани, въпреки че и двете линии са ракови (Т-клетъчна левкемия). От гледна точка на изследователската дейност, добавянето на информация за капацитета за поправка на ДНК на ракови клетки към наличните данни за тези клетъчни линии може да бъде полезно от гледна точка на изясняване на генетичните основи на карциногенезата.

Често срещан феномен в процеса на карциногенезата е селективната мутагенеза на специфични генни локуси, съдържащи гени, които кодират белтъци с тумор-супресорна функция [37-39]. Типичен пример е локусът, в който се съдържа генът *TP53*. Той може да бъде делетиран (самостоятелно или заедно с прилежащи в близост области от генома, или в състава на цялото късо рамо на 17. хромозома) или да бъде мутагенизиран до туморно-специфичен *TP53* [40,41]. При *TP53* е описано и целенасочено делетиране на едното алелно копие и преференциално мутагенизиране на другото копие [42,43]. Това е подробно проучено при карциноми, предизвикани от инфекция с човешки папиломен вирус (human papillomavirus, HPV), където е намерено, че в групите на пациентите силно преобладават хомозиготни носители на алела 72Arg [43,44]. Във връзка с потенциалната роля на нестабилността на генома по отношение на специфични локуси, съдържащи гени на поправката на ДНК и/или поддръжката на геномния интегритет, в рамките на настоящото проучване анализирахме 4 маркера от панела за оценка на ИРК (*TP53* Pro72Arg, *XPC*ins83, *XRCC1* Arg399Gln, *XPD* (*ERCC2*) Lys751Gln) в туморна тъкан (карциноми на млечната жлеза) и кръвни проби от същите индивиди с цел да проследим евентуална загуба на хетерозиготност в ключови локуси на ДНК поправката при този тип тумори.

III. Цел на настоящата работа и конкретизирани задачи за нейната реализация:

Цел: Да се изследва ролята на фактори, модулиращи индивидуалния репаративен капацитет при човека във физиологични и патологични условия чрез ДНК анализ.

За постигане на тази цел си поставихме следните **конкретизирани задачи:**

1. Разширяване на съществуващи в лабораторията, в която се работи дисертационният труд ДНК банки от клинично здрави индивиди, индивиди със съдови заболявания и индивиди с онкологични заболявания;

2. Подбор на панел от маркери за оценка на ролята на индивидуалния репаративен капацитет в норма и при често срещани патологични състояния, които да обхващат наследствено-обусловените компоненти (ДНК полиморфизми в гени, кодиращи белтъци, участващи в разпознаването и поправката на увреждания в ДНК, сигнализацията, свързана с наличие на увреждане и поддръжката на интегритета на генома);

3. Оптимизиране на избраните маркери и валидирането им за използване в българската популация;

4. Подбор на надежден маркер за оценка на капацитета за самоподновяване на клетъчни популации (в процеса на диференциация и/или стареене на клетките) и подбор на конкретна експериментална методология.

5. Изпитване на приложимостта на панела от маркери при клинично здрави индивиди и създаване на първична база данни за вариантността на маркерите при тази група;

6. Изпитване на приложимостта на панела от маркери при индивиди с конкретни заболявания, за които има данни, че са свързани с намаление на индивидуалния капацитет за поправка на увреждания в ДНК (церебрално-съдови инциденти).

7. Извършване на първична оценка на средната дължина на теломери като фенотипен маркер за капацитета за самоподновяване на клетъчни популации при избрани групи от клинично здрави индивиди и при индивиди с церебрално-съдови инциденти;

8. Изследване на параметри на индивидуалния репаративен капацитет при контролни човешки клетъчни линии с висок пролиферативен капацитет;

40. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. *J Pathol.* 2011 Jan; 223(2):116-26.
41. Miller M, Shirole N, Tian R, Pal D, Sordella R. *J Cancer Biol Res.* 2016; 4(4): 1091.
42. Nelson HH, Wilkojmen M, Marsit CJ, Kelsey K. *Carcinogenesis.* 2005; 26(10):1770-73.
43. Mitra S, Banerjee S, Misra C, Singh RK, Roy A, Sengupta A, Panda CK, Roychoudhury S. *J Clin Pathol.* 2007 Sep; 60(9):1040-7.
44. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):608-11.
45. Chakarov S, Petkova R, Russev GCh. *Biodiscovery* 2014; 11: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.11.2.
46. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. *Am J Hum Genet.* 1991 Jan; 48(1):137-44.
47. Weir BS, Cockerham CC. *Evolution.* 1984; 38:1358-1370.
48. Robertson A, Hill WG. *Genetics.* 1984; 107:703-18.
49. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered.* 1994; 44(5): 266-70.
50. Pim D, Banks L. *Int J Cancer.* 2004; 108:196-9.
51. Alisov BP. 1954. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1954.
52. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb; 19(2):1092-100.
53. An SJ, Kim TJ, Yoon BW. *J Stroke.* 2017 Jan; 19(1):3-10.
54. Sychala MS, Honarpisheh P, McCullough LD. *J Neurosci Res.* 2017 Jan 2; 95(1-2):462-71.
55. Carlson LA, Ericsson M. *Atherosclerosis.* 1975 May-Jun; 21(3):417-33.
56. Kiel DP, Baron JA, Plymate SR, Chute CG. *Am J Med.* 1989 Jul; 87(1):35-9.
57. Breslow JL, Zannis VI, SanGiacomo TR, Third JL, Tracy T, Glueck CJ. *J Lipid Res.* 1982; 23(8):1224-35.
58. Ungar L, Altmann A, Greicius MD. *Brain Imaging Behav.* 2014 Jun; 8(2):262-73.
59. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J. *Radiother Oncol.* 2003 Nov; 69(2):127-35.
60. Padma G, Mamata M, Reddy KR, Padma T. *Mol Vis.* 2011; 17:127-33.
61. Bonafé M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C, Marzi E, Trapassi C, Storci G, Olivieri F, Franceschi C. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(13):4860-64.

18. Baroudi O, Benammar-Elgaaied A. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Nov; 107:72-81.
19. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velde PA, Reitsma PH. *Nature*. 1994; 369:64-7.
20. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. *Circulation*. 1996; 94:1812-4.
21. Boyanovsky B, Russeva M, Ganev V, Penev M, Baleva M. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001 Dec; 12(8):639-42.
22. Mansfield MW, Strickland MH, Grant PJ. *Thromb Haemost*. 1995; 74:1032-4.
23. Prelli F, Castaño E, Glenner GG, Frangione B. *J Neurochem*. 1988 Aug; 51(2):648-51.
24. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar; 61(3):282-93.
25. Yamada M. *Front Neurol*. 2012 Apr 25; 3:64.
26. Spyridopoulos I, Hoffmann J, Aicher A, Brümmendorf TH, Doerr HW, Zeiher AM, Dimmeler S. *Circulation*. 2009; 120:1364-72.
27. Bhattacharyya J, Mihara K, Bhattacharjee D, Mukherjee M. *Indian J Med Res*. 2017;145(6):730-737.
28. Aunan JR, Cho WC, Søreide K. *Aging Dis*. 2017;8(5):628-642.
29. Brito R, Castillo G, González J, Valls N, Rodrigo R. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015;123(6):325-35
30. Mozos I, Malainer C, Horbańczuk J, Gug C, Stoian D, Luca CT, Atanasov AG. *Front Immunol*. 2017;8:1058.
31. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova S, Tournev I, Chakarov S. *Ann Rev Sofia Univ*. 2015; 100(4): 110-17.
32. Ghosh S, Canugovi C, Yoon JS, Wilson DM 3rd, Croteau DL, Mattson MP, Bohr VA. *Neurobiol Aging*. 2015; 36(7):2319-30.
33. Orhan G, Elkama A, Mungan SÖ, Erucar E, Karahalil B. *Neurol Sci*. 2016 Jun; 37(6):955-61.
34. Sverdlov ED, Mineev K. *Trends Mol Med*. 2013 May; 19(5):273-80.
35. Reynolds L. *BioDiscovery* 2016; 19: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2016.19.1.
36. Arabadjiev B, Petkova R, Nonchev S, Chakarov S, Momchilova A, Pankov R. *Compt Rend Bulg Acad Sci*. 2010; 63(12):1765-70.
37. Steeg PS. *Suppressor genes in breast cancer: an overview*. *Cancer Treat Res*. 1992; 61:45-57.
38. Bièche I, Lidereau R. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 Dec; 14(4):227-51.
39. Abraham R, Pagano F, Gomella LG, Baffa R. *Front Biosci*. 2007 Jan 1; 12:826-38.

9. Изследване на параметрите на индивидуалния репаративен капацитет на линия от човешки ембрионални стволови клетки, създадена в България и поддържана в недиференцирано състояние;

10. Провеждане на малко пилотно проучване на вариантността на гени, обуславящи индивидуалния репаративен капацитет в туморни тъкани и сравнителен анализ с нетуморна тъкан от същия индивид;

11. Общ и асоциационен анализ на резултатите, вкл. чрез стандартни програмни пакети за изчисляване на базовите параметри на вариантността на маркерите в изследваните групи;

12. Съпоставка на получените конкретни резултати със съответните литературни данни, когато такива са налице.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Набиране и селекция на клиничен материал
2. Получаване и пречистване на нуклеинови киселини
 - 2.1. Получаване на високомолекулна ДНК (~ 80 - 100 kb) от еукариотни клетки в суспензия и от тъканни проби
 - 2.2. Получаване на ДНК от еукариотни клетки в суспензия по еднопруветков метод, основан на адсорбция/елуция
 - 2.3. Изолиране и пречистване на тотална РНК
3. Спектрофотометричен анализ на нуклеинови киселини
4. Електрофоретичен анализ на нуклеинови киселини
 - 4.1. Непрекъсната потопена електрофореза на ДНК
 - 4.2. Прекъсната акриламидна електрофореза на ДНК
5. Хидролиза на геномна ДНК с рестрикционни ендонуклеази и рестрикционен анализ
6. Подбор на маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет и капацитета за поддръжка на геномния интегритет
7. Подбор на маркери за оценка на капацитета за самоподновяване на клетъчни популации
8. Дизайн на PCR праймери
9. Оптимизиране на условията на амплификация на ДНК с полимеразна верижна реакция (PCR)
10. Хидролиза на ДНК фрагменти, получени чрез PCR с рестрикционни ендонуклеази и рестрикционен анализ (PCR-RFLP)
11. RT-PCR за целите на експресионния анализ
12. Хибридизационен анализ по Southern с олигонуклеотидни сонди за целите на определяне на дължина на теломери по метода на терминалните фрагменти
13. Статистически анализ на резултатите с помощта на специализиран софтуер
14. Интерпретация на получените данни и оценка на потенциала за използване на резултатите в научно-изследователската дейност и клиничната практика.

IX. ЦИТИРАНА В АВТОРЕФЕРАТА ЛИТЕРАТУРА

1. Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M. *Mutat Res.* 2007 Aug 1; 621(1-2):75-86.
2. Salmanoglu M, Kucukardali Y, Kucukodaci Z, Fenercioglu A, Solmazgul E, Onem Y, Baloglu H, Ozata M. *J Endocrinol Invest.* 2012 Apr; 35(4):401-6.
3. Zhang Y, Zhang L, Song Z, Sun DL, Liu HR, Fu SB, Liu DR, Liu P. *Ophthalmology.* 2012 May; 119(5):900-6.
4. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, Rachek LI. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54059.
5. Karahalil B, Orhan G, Ak F. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Dec; 139:288-94.
6. Mohamed RH, El-Shal AS, El-Shahawy EE, Abdel Galil SM. *Gene.* 2016 Mar 1; 578(1):112-6.
7. Uryga A, Gray K, Bennett M. *Annu Rev Physiol.* 2016 Feb 10; 78:45-66.
8. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. *Circulation.* 2002 Aug 20; 106(8):927-32.
9. Chelenkova P, Petkova R, Chamova T, Zheliazkova-Glaveeva S, Tournev I, Chakarov S. *Compt Rend Acad Bulg Sci.* 2014; 67(20):263-68.
10. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Lesèche G, Tedgui A. *Circulation.* 2000 May 30; 101(21):2450-3.
11. Khan SG, Metter EJ, Tarone RE, Bohr VA, Grossman L, Hedayati M, Bale SJ, Emmert S, Kraemer KH. *Carcinogenesis.* 2000 Oct; 21(10):1821-5.
12. Krüger S, Bier A, Engel C, Mangold E, Pagenstecher C, von Knebel Doeberitz M, Holinski-Feder E, Moeslein G, Schulmann K, Plaschke J, Rüschoff J, Schackert HK; German Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Med Genet.* 2005 Oct; 42(10):769-73.
13. López-Cima MF, González-Arriaga P, García-Castro L, Pascual T, Marrón MG, Puente XS, Tardón A. *BMC Cancer.* 2007 Aug 16; 7:162.
14. Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Mijke R, Kelsey K, Lee M, Liu J, Wrensch M. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Aug; 9(8):843-7.
15. Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HH, Andrade JM, Takahashi CS. *Genet Mol Biol.* 2010 Oct; 33(4):637-40.
16. Kumar P, Yadav U, Rai V. *Meta Gene.* 2015 Oct 1; 6:72-84.
17. Liew SC, Gupta ED. *Eur J Med Genet.* 2015 Jan; 58(1):1-10.

- Потвърдени са предходно налични данни за ролята на носителството на мутациите Factor V Leiden и PT G20210A за повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти.

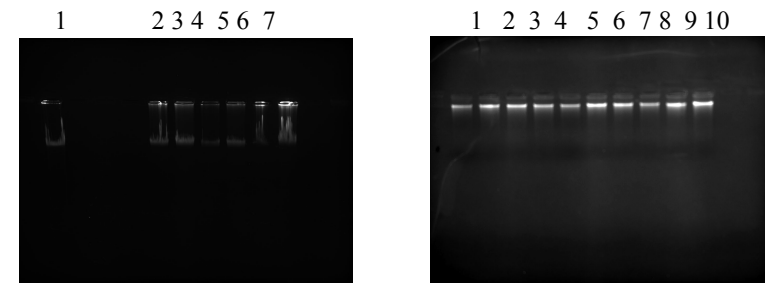
- Потвърдени са предходно налични данни за преференциална инактивация на определени алели на гени, кодиращи ключови белтъци на поправката на ДНК и поддръжката на геномния интегритет.

V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Развитие на банки и бази данни

Бяха допълнени предходно съществуващи ДНК банки от ДНК от клинично здрави индивиди на възраст от 20-65 години и банката от ДНК от индивиди със съдови инциденти, създадена първично с подкрепата на Фонд „Научни изследвания“ (проект № ДМУ-03-112 и ДФНИ 01/2). Беше създадена първична ДНК банка от туморни тъкани (карциноми на млечната жлеза и карциноми на пикочния мехур). Всички банкирани проби са в представителни количества, охарактеризирани са електрофоретично и спектрофотометрично и има изготвени регистри. Аналитичните процедури са надлежно документирани.

Типични електрофоретични профили на изолираната ДНК в 0.6 % агарозен гелове са показани на фиг. 1 а) и б).



Фиг. 1. Електрофоретичен профил в 0.6 % агарозен гел на изолирана в хода на работата ДНК.

а) Високомолекулна ДНК, изолирана чрез депотеинизация с протеиназа K/ фенолна екстракция и етанолна преципитация. Пътека 1: Интактна λ ДНК, 500 ng; пътеки 2-7: банкирани проби

б) ДНК, изолирана чрез STS one-tube kit (Scientific Technological Service, Sofia). Пътека 1: еталон 100 ng; пътеки 2-10: банкирани проби.

2. Анализ на полиморфизми в гени, кодиращи продукти, участващи в разпознаването на ДНК увреждането, поправката на ДНК и поддръжката на интегритета на генома

В хода на работата по настоящия дисертационен труд ние съставихме панел от маркери за оценка на индивидуалния

репаративен капацитет, които обхващат както чисто наследствената компонента (ДНК полиморфизми в гени, кодиращи белтъци, участващи в разпознаването и поправката на увреждания в ДНК, сигнализацията, свързана с наличие на увреждане и поддръжката на интегритета на генома); така и маркер за оценка на темповете на намаляване на капацитета за самоподновяване на клетъчни популации (в процеса на диференциация и/или стареене на клетките). Маркерите за индивидуален капацитет за поправка на ДНК бяха подбрани от значително по-голямото разнообразие от маркери за индивидуален репаративен капацитет [45] от гледна точка на това да обхващат както отделните фази на разпознаване на увреждането и поправката му и поддръжката на капацитета на генома, така и да представляват различни типове поправка на ДНК.

Амплификационните условия за съответните ампликони бяха оптимизирани с цел получаване на недвусмислено интерпретируем резултат. Последователността на праймерите, температурите на хибридизация на праймерите към матрицата за отделните ампликони и дължините на амплификационните продукти са представени в табл. IV.

Табл. IV. Оптимална температура за хибридизация на праймерите към матрицата и дължина на получените фрагменти ДНК за използваните в настоящото изследване маркери (след окончателен подбор).

Ампликон	Оптимизирана T_{ann} [°C]	Дължина на фрагмента [bp]
<i>TP53 Pro72Arg</i>	62	412
<i>XPCins83</i>	58	266, 344
<i>ERCC1 3'-UTR C8092A</i>	64	255
<i>XRCC3 Thr241Met</i> (основен)	62	136
<i>XRCC3 Thr241Met</i> (потвърдителен)	58	455
<i>XRCC1Arg399Gln</i>	64	871
<i>XPD (ERCC2) Lys751Gln</i>	68	436
Мутация Фактор V		

VIII. НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер

- Идентифициран е един основен и три допълнителни генетични фактора, свързани с повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти в българската популация;

- Намерени са полово-зависими различия в модулацията на риска, свързан с носителството на вариантни алели на маркера *APOE*;

- Направен е анализ на индивидуалния репаративен капацитет на двете обезсмъртени клетъчни линии Jurkat E6-1 и T-1301, какъвто до този момент не е публикуван в специализираната литература, въпреки че се използват много често за изследователска дейност;

- Анализирани са основни параметри на индивидуалния репаративен капацитет на създадена в България стабилизирана линия чЕСК и е направена оценка на нейната евентуална приложимост за научно-изследователска дейност.

- Настоящият дисертационен труд поставя основите на въвеждане на рутинно изследване на репаративния капацитет на плурипотентни клетъчни линии от гледна точка на оценка на риска за поява на мутации в клетъчни продукти, които биха могли да бъдат прилагани в бъдеще *in vivo* при хора;

- Идентифициран е генетично-обусловен рисков фактор на индивидуалния репаративен капацитет, свързан с повишаване на риска от развитие на карцином на млечната жлеза;

- Намерени са данни за преференциална алел-зависима мутагенеза в локуса *TP53* при български пациенти с карцином на млечната жлеза.

- Намерени са различия между дължината на теломерите при клинично здрави индивиди и при индивиди с церебрално-съдови инциденти в българската популация, което потенциално може да се използва с цел мониторинг и прогностикация на хода и изхода от състояния, свързани със съдова болест;

2. Приноси с потвърдителен характер

- Потвърдени са предходно налични данни за честотата на разпространение на най-често срещаните протромботични фактори в българската популация;

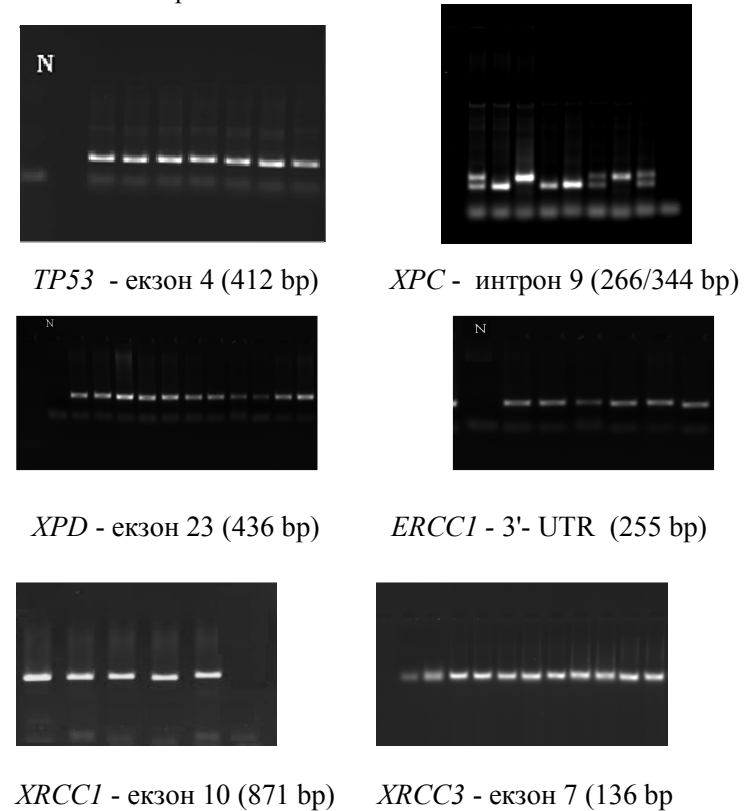
наблюдават фактори, повишаващи риска от развитие на геномна нестабилност и, евентуално, туморигенеза. При T-1301 и Jurkat E6-1 това не е неочаквано, с оглед на произхода им. Линията чЕСК е подходяща за използване за научно-изследователски цели.

3. Налице са различия в дължината на теломерите като фенотипен маркер за способността за самоподновяване на клетъчни популации при клинично здрави индивиди и при пациенти с церебрално-съдови инциденти;

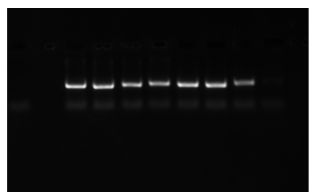
4. Наличието на информация за персоналният статус по отношение на ИРК може да подпомогне значително оценката на риска, диагностиката, мониторинга и прогностиката на изхода при заболявания, характерни за средната и напредналата възраст, информираното въвеждане на промени в начина на живот и избора на терапевтични подходи и конкретни терапии.

Leiden (G1691A)	62	317
Мутация РТ G20210A	58	345
Полиморфизъм С677Т в екзон 4 на гена MTHFR	58	246
РАI 4G/5G	58 (и за трите паралелни реакции)	257
Триалелна система АРОЕ E2/E3/E4	68 (двустъпален PCR)	218

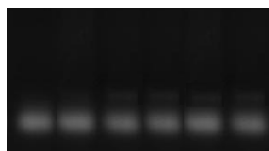
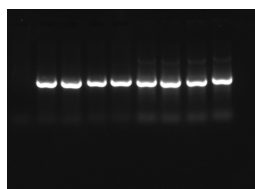
Типични електрофоретични профили на амплификационните продукти на избраните маркери са показани на фиг. 2.



(основен метод)



XRCC3 - екзон 7 (455 bp), *MTHFR* - екзон 4 (246 bp)



PT - 3'-UTR (345 bp) *APOE* (218 bp)



PAI1 - промоторна последователност (255 bp за общата последователност (Comm) и 160 bp за алел-специфичния PCR)

Фиг. 2. Типични електрофоретични профили в 1.5 % агарозен гел на продукти, получени чрез *in vitro* амплификация на геномните региони, заграждащи изследваните полиморфизми.

Типични електрофоретични профили на маркерите, които се анализират чрез PCR-RFLP анализ са представени на фиг. 3.

VII. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. При анализа на изследваните маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет в българската популация се установяват следните генотип-фенотипни корелации:

- В българската популация носителството на хомозиготен (del/del) генотип по маркера *XPC ins83* може да намалява риска от различни болести и състояния, настъпващи в зрялата и напреднала възраст, а именно церебрално-съдови инциденти и карцином на млечната жлеза;

- Носителството на хетерозиготен (ins/del) генотип по маркера *XPC ins83* в българската популация само по себе си или в комбинация с хетерозиготно носителство на вариантите алели на маркерите *XRCC3* - Thr241Met и *XPB (ERCC2) Lys751Gln* може да е свързано с повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти;

- Хомозиготното носителство на "про-апоптотичния" 72Arg алел може да е свързано с повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти независимо от носителството на инсерционния алел на полиморфизма *XPC ins83*;

- В българската популация е възможно носителството на мутацията *PT G20210A* е свързано с повишаване на риска от церебрално-съдови инциденти;

- В българската популация е възможно хомозиготното носителство на 5G алела на полиморфизма *PAI1 4G/5G* да понижава риска от церебрално-съдови инциденти;

- В българската популация, мъжете-носители на един *APOE4* алел в генотип E3/E4 имат леко повишен риск от церебрално-съдови инциденти в сравнение със неносителите и с жените-носителки на същия генотип;

- Носителството на генотипа E2/E3 при мъже от българската популация е свързано с леко намаляване на риска от церебрално-съдови инциденти в сравнение с неносителите и с жените-носителки на същия генотип;

- Възможно е при българските пациенти с рак на млечната жлеза да се наблюдава преференциално делетиране на 72Pro алела на полиморфизма *TP53 Pro72Arg* в туморната тъкан, възникнало на соматично ниво.

2. При обезсмъртените клетъчни линии T-1301 и Jurkat E6-1 и при създадената в България стабилизирана линия ЧЕСК се

зависими различия във формирането на риска от церебрално-съдов инцидент при носителите на вариантни форми на *APOE* гена.

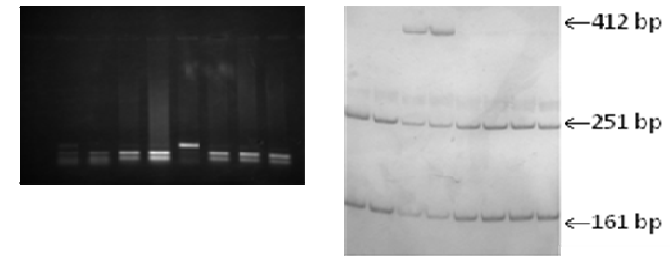
7. Оценена е средната дължина на теломери като фенотипен маркер за капацитета за самоподновяване на клетъчни популации при здрави индивиди във възрастовия диапазон 20-65 години в българската популация.

8. Извършена е първична оценка на средната дължина на теломери като фенотипен маркер за капацитета за самоподновяване на клетъчни популации при извадка от индивиди с история за поне един церебрално-съдов инцидент в българската популация.

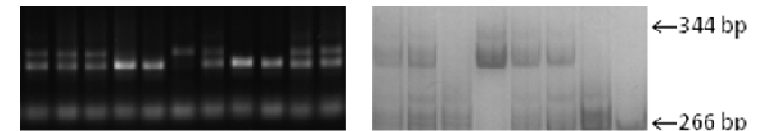
9. Изследвани са параметрите на индивидуалния репаративен капацитет и е съставена обща генетична характеристика на две стандартни обезсмъртени клетъчни линии и на човешката стволово-клетъчна линия и е извършен критичен анализ на находките;

10. Панелът е апробиран в рамките на малко пилотно проучване, включващо четири маркера върху ДНК проби от пациенти с карцином на млечната жлеза - туморна тъкан и кръв от същия индивид.

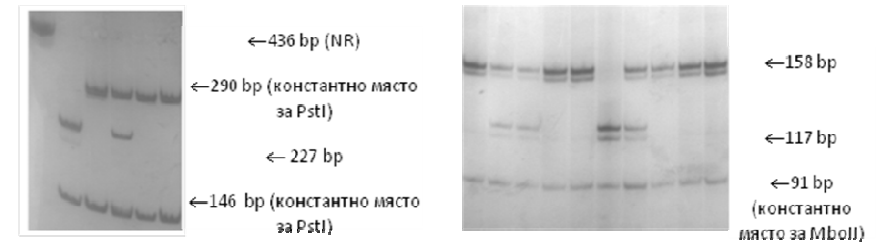
Установени са статистически значими различия между параметрите на вариантноста на един от изследваните маркери между двата типа изследвани тъкани, както и евентуален рисков генетично-обусловен фактор за развитие на рак на гърдата в българската популация.



а) *TP53 Pro72Arg*, агарозен гел б) *TP53 Pro72Arg*, полиакриламиден гел

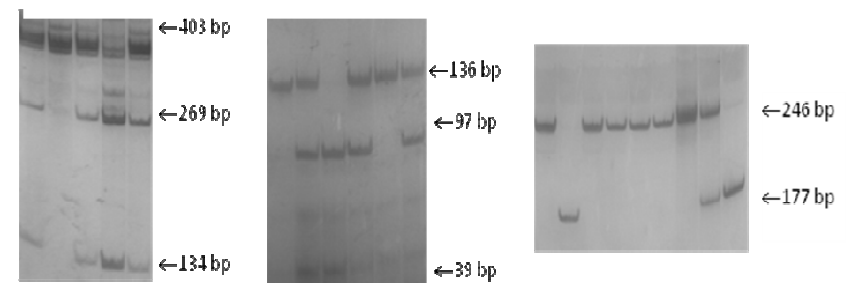


в) *XPCins83*, агарозен гел г) *XPins83*, полиакриламиден гел

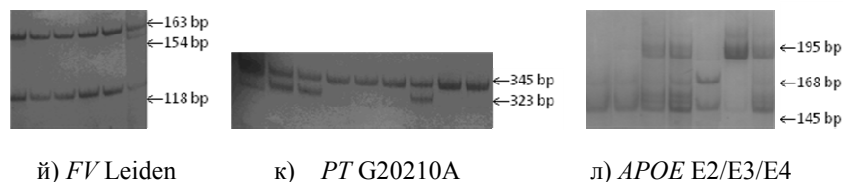


д) *XPD (ERCC2) Lys751Gln*

е) *ERCC1 C8092A*



ж) *XRCC1 Arg399Gln* з) *XRCC3 Thr241Met* и) *MTHFR C677T*



Фиг. 3. Типични електрофоретични профили в неденатуриращи полиакриламидни гелове, оцветени по Budowle на продукти, получени от хидролиза с рестрикционни ендонуклеази на получените чрез *in vitro* амплификация геномни фрагменти. NR - нехидролизирана ДНК (вътрешна контрола).

а) и б) Маркер *TP53 Pro72Arg* (а) - 2 % агарозен гел, оцветен с етидиев бромид; б) 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат по Budowle [46])

в) и г) - Маркер *XPCins83* - (в) 2 % агарозен гел, оцветен с етидиев бромид ; г) 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат).

д) Маркер *XPD (ERCC2) Lys751Gln* - 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментите с дължина 63 bp (от полиморфното място за *PstI*) бързо излизат извън оптималните зони за електрофоретично разделяне;

е) Маркер *ERCC1 C8092A* - 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментите с дължина 41 bp (от полиморфното място за *MboII*) и 6 bp (от константното място за *MboII*) бързо излизат извън оптималните зони за електрофоретично разделяне;

ж) Маркер *XRCC1 Arg399Gln* - 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат;

з) Маркер *XRCC3 Thr241Met* 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат;

и) Маркер *MTHFR C677T* - 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментите с дължина 69 bp (от полиморфното място за *HinfI*) бързо излизат извън оптималните зони за електрофоретично разделяне;

й) Маркер *Factor V Leiden* - 8 % полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментът с дължина 36 bp бързо излиза извън оптималните зони за електрофоретично разделяне;

к) Маркер *PT G20210A* - 8 % полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментът с дължина 23 bp обикновено бързо излиза извън оптималните зони за електрофоретично разделяне;

VI. ОСНОВНИ РЕЗУЛТАТИ, ПОЛУЧЕНИ В ХОДА НА ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ЗАДАЧИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Разширени са предходно налични ДНК банки от клинично здрави индивиди и от пациенти със церебрално-съдови съдови и онкологични заболявания. Допълнително са банкирани ДНК проби от две туморни клетъчни линии и от линия от човешки ембрионални стволови клетки, поддържана в недиференцирано състояние.

2. Извършени са литературни и теоретични проучвания, в резултат на което е избран панел от 11 генетични маркера (полиморфизми в гени, кодиращи продукти, участващи в поправката на ДНК и поддържане на интегритета на генома) с цел изследване на индивидуалния репаративен капацитет при човека.

3. Маркерите за индивидуален репаративен капацитет са оптимизирани и валидирани за използване в българската популация;

4. Подбран е маркер за оценка на капацитета на самоподновяване на клетъчни популации - средна дължина на теломери в смесени клетъчни популации;

5. Проведени са експериментални изследвания и анализи с маркерите от панела върху подбрана група от клинично здрави индивиди и са установени параметрите на нормалната вариантност на изследваните маркери за индивидуален репаративен капацитет в българската популация. Съставен е най-често срещан композитен генотип при клинично здравите индивиди в българската популация.

6. Панелът от маркери за оценка на индивидуалния репаративен капацитет е приложен и към подбрана група пациенти с история за поне един церебрално-съдов инцидент. Установени са параметрите на вариантността на маркерите в тази група. Установени са статистически значими различия между разпределението на алелните честоти при клинично здравите индивиди и пациентската група. Съставен е най-често срещан композитен генотип при пациентската група. Идентифициран е един основен и няколко допълнителни фактора за повишаване на риска от церебрално-съдов инцидент във възрастовата група 20-65 години в българската популация. Установени са полово-

периферна кръв беше практически неразличима от вече получената стойност за клинично здравите индивиди (около 67 %), при пробите от туморна тъкан тя нарастваше до около 75 %, което е около 12 % разлика. Коефициентът на инбридинг в пробите от туморна тъкан беше положителен, свидетелстващ за излишък на хомозиготи, докато при пробите от периферна кръв F_{is} беше слабо отрицателен. В пробите от туморна тъкан преобладаваха пробите, които дават сигнал за присъствие само на аргинилов алел. Това би могло да се дължи на селективна загуба на 72Pro алела и задържане на 72Arg алела, с последваща евентуална мутагенизация. С използваните в настоящата дисертация методи не може да бъде околичествена алелната доза, за да бъде потвърдена тази хипотеза, но въз основа на получените от нас данни могат да бъдат проведени допълнителни изследвания, за да се провери дали наистина става дума за загуба на хетерозиготност.

л) Маркер *APOE* E2/E3/E4 - 8 % неденатуриращ полиакриламиден гел (29:1), оцветен със сребърен нитрат. Забележка: Фрагментите с дължина 50 и 23 bp бързо излизат извън оптималните зони за електрофоретично разделяне.

С помощта на така съставения панел от маркери отначало беше изследвана ДНК банката от клинично здрави индивиди, за да бъдат установени границите на нормалната вариация в капацитета за поправка на ДНК в българската популация и, съответно, беше съставена първична база данни. Панелът от маркери беше приложен последователно и към ДНК банката от пациенти с церебрално-съдови инциденти, контролните ракови клетъчни линии и линията от човешки ембрионални стволови клетки с цел по-пълно охарактеризиране на капацитета за поправка на ДНК и поддържане на пролиферативния им капацитет. Резултатите от тези изследвания са представени по-долу.

2.1. Оценка на нормалната вариантност на изследваните маркери в групата от клинично здрави индивиди

В числен вид основните параметри на нормалната вариантност на изследваните маркери в българската популация от клинично здрави индивиди е представена в табл. V (а) и б)) и VI (а) и б)). За граница на статистическата значимост беше приета стойност на $P \leq 0.05$.

Табл. V. Основни параметри на нормалната вариантност на изследваните маркери в българската популация от клинично здрави индивиди - алелни честоти и хетерозиготност. H_{exp} - експериментално наблюдавана хетерозиготност, H_{obs} - теоретично изчислена хетерозиготност.

Маркер	Алелна честота			H_{obs}	H_{exp}
	Оригинален	Вариантен 1	Вариантен 2		
<i>TP53</i> Pro72Arg	Алел Pro 0.327	Алел Arg 0.673		0.417	0.443
<i>XPC</i> ins83	Алел del 0.657	Алел ins 0.343		0.257	0.454
<i>ERCC1</i> C8092A	Алел C 0.754	Алел A 0.246		0.377	0.374
<i>XRCC3</i> Thr241Met	Алел Thr 0.530	Алел Met 0.470		0.606	0.502
<i>XRCC1</i> Arg399Gln	Алел Arg 0.570	Алел Gln 0.430		0.547	0.494
<i>XPD</i> Lys751Gln	Алел Lys 0.603	Алел Gln 0.397		0.540	0.483
<i>MTHFR</i> C677T	Алел C 0.634	Алел T 0.366		0.452	0.466
<i>FV</i> Leiden	Алел G 0.952	Алел A 0.048		0.097	0.093
<i>PT</i> G20210A	Алел G 0.984	Алел A 0.016		0.033	0.032
<i>PAII</i> 4G/5G	Алел 4G 0.550	Алел 5G 0.450		0.437	0.498
<i>APOE</i> E2/E3/E4	Алел E3 0.812	Алел E2 0.091	Алел E4 0.097	0.376	0.325

Табл. XII. Основни параметри на вариантността на изследваните маркери в периферна кръв от индивидите, от които са взети туморните проби.

Маркер	Алелна честота		H_{obs}	H_{exp}	F_{is} (W&C)	F_{is} (R&H)
	Оригинален	Вариантен				
<i>TP53</i> Pro72Arg	Алел Pro 0.333	Алел Arg 0.667	0.410	0.444	-0.030	-0.031
<i>XPC</i> ins83	Алел del 0.570	Алел ins 0.430	0.570	0.456	-0.042	-0.043
<i>XRCC1</i> Arg399Gln	Алел Arg 0.560	Алел Gln 0.440	0.417	0.451	-0.078	-0.079
<i>XPD</i> Lys751Gln	Алел Lys 0.597	Алел Gln 0.403	0.463	0.498	-0.082	-0.085

Разпределението на алелните честоти на маркера *XPC* ins83 както в туморните проби, така и в периферната кръв на пациентите показваше различия в сравнение с предходно установените алелни честоти за клинично здравите индивиди. По-точно, честотата на "репаративно-дефектния" инсерционен алел беше повишена с около 28 % спрямо тази при клинично здравите индивиди, и стойността на коефициента на инбридинг беше леко отрицателна, свидетелстваща за излишък на хетерозиготи (докато при здравите индивиди, изследвани от нас, имаше позитивиране на коефициента на инбридинг поради преобладаване на хомозиготите по делеционния ("репаративно-компетентен" алел). Възможно е носителството на инсерционния алел на полиморфизма *XPC* ins83 да е свързано, освен с повишен риск от развитие на съдова болест, и с повишаване на риска от развитие на карцином на млечната жлеза. В специализираната литература има данни за връзката на носителството на полиморфизма *XPC* ins83 с риска от различни типове рак [77].

Не по-малко интересна от изследователска гледна точка беше находката, че алелните честоти на полиморфизма Pro72Arg в гена *TP53* бяха статистически значимо различни при туморната тъкан и при периферната кръв от един и същи индивид. По-точно, докато честотата на аргиниловия алел в пробите от

За да се установи доколко тези различия са статистически значими, трябва да се проведат допълнителни изследвания в по-големи извадки от пациенти с различни заболявания.

7. Анализ на вариантността на гени, обуславящи индивидуалния репаративен капацитет в туморни тъкани и сравнителен анализ с нетуморна тъкан в рамките на малко пилотно проучване

С цел да проверим дали в изследваните пациенти с карцином на млечната жлеза се наблюдава соматична загуба на хетерозиготност в локуси, в които се намират ключови гени на поправката на ДНК, изследвахме туморна тъкан и периферна кръв от едни и същи пациенти по четири маркера от панела за оценка на индивидуален репаративен капацитет, а именно *TP53 Pro72Arg*, *XPC ins83*, *XRCC1 Arg399Gln* и *XPD Lys751Gln*. В числен вид основните параметри на вариантността на изследваните маркери в анализираниите туморни проби и в периферна кръв от същите индивиди е представена в табл. XI и XII.

Табл. XI. Основни параметри на вариантността на изследваните маркери в анализираниите туморни проби.

Маркер	Алелна честота		H _{obs}	H _{exp}	F _{is} (W&C)	F _{is} (R&H)
	Оригина- лен	Вариан- тен				
<i>TP53 Pro72Arg</i>	Алел Pro	Алел Arg	0.280	0.375	0.247	0.248
	0.250	0.750				
<i>XPC ins83</i>	Алел del	Алел ins	0.590	0.460	-0.043	-0.048
	0.562	0.438				
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	Алел Arg	Алел Gln	0.415	0.455	-0.073	-0.075
	0.565	0.435				
<i>XPD Lys751Gln</i>	Алел Lys	Алел Gln	0.463	0.498	-0.082	-0.085
	0.597	0.403				

Табл. VI. Индекс на инбридинг в консолидираната група от клинично здрави индивиди от български произход. F_{is} [W & C] - индекс на инбридинг, изчислен по формулата на Weir & Cockerham [47]; F_{is} (R & H) - индекс на инбридинг, изчислен по формулата на Robertson & Hill [48].

Маркер	P-value	Стандартна грешка [SE = (μ - 1)/(2×1.96)]	F _{is} (W & C)	F _{is} (R & H)
<i>TP53 Pro72Arg</i>	0.6227	0.0033	0.0599	0.0603
<i>XPC ins83</i>	0.0007	0.0002	0.4352	0.4397
<i>ERCC1 C8092A</i>	1.0000	0.0000	-0.0074	-0.0075
<i>XRCC3 Thr241Met</i>	0.1344	0.0028	-0.2093	-0.2106
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	0.4453	0.0038	-0.1080	-0.1088
<i>XPD Lys751Gln</i>	0.4371	0.0037	-0.1195	-0.1203
<i>MTHFR C677T</i>	0.8251	0.0018	0.0318	0.0320
<i>FV Leiden</i>	1.0000	0.0000	-0.0455	-0.0457
<i>PTG20210A</i>	1.0000	0.0000	-0.0111	-0.0112
<i>PAI 4G/5G</i>	0.2863	0.0046	0.1176	0.1184
<i>APOE E2/E3/E4</i>	0.3046	0.0055	-0.1591	-0.1111

Честотата на двата полиморфни алела на полиморфизма *TP53 Pro72Arg* беше, както следва: за Pro алела - 0.327 и за Arg алела - 0.673. Аргиниловият алел е по-често срещан в българската популация, което не е необичайно във връзка с естествения градиент, който се наблюдава в глобален мащаб [49,50]. България се намира в умерената климатична зона според класификацията на Алисов [51], така че разпределението на полиморфните алелни форми, наблюдавано от нас в българската популация не е необичайно. И двете алелни форми на полиморфизма *TP53 Pro72Arg* се считат за "див тип", макар че кодират белтъци, които притежават различни свойства във функционално отношение - носителството на *72Arg* алела

придава на клетките повишена склонност към индукция на апоптоза при наличие на увреждания, докато *72Pro* алелът е свързан с повишена склонност към спиране на клетъчния цикъл и предприемане на действия по поправка на уврежданията [52].

В извадката от клинично здрави индивиди хомозиготният *72Arg/Arg* генотип беше най-често срещан (46 %), следван от хетерозиготния *72Pro/Arg* генотип (42 %). *72Pro/Pro* генотипът беше по-рядко срещан – 11.9 %. Тази наблюдавана честота на срещане на "про-репаративния" генотип по полиморфизма *TP53 Pro72Arg* беше напълно сравнима с очакваната честота на срещане при наблюдаваните алелни честоти (10.7 %).

Честотите на двата полиморфни алела на полиморфизма *XPCins83* бяха, както следва: за *del* алела (делеционен, „репаративно-компетентен“) – 0.657 и за *ins* алела (инсерционен, „репаративно-дефектен“) – 0.343. Впечатление правеше драстичната (с над 76 %) разлика между очакваната (H_{exp}) и наблюдаваната хетерозиготност (H_{obs}) на маркера при здравите индивиди ($H_{exp} = 0.454$, $H_{obs} = 0.257$, $P=0.0007$). Относителният дял на идентифицираните в процеса на работата клинично здрави индивиди с генотип *del/del* беше 52 %, което надвишаваше с 21 % очакваното при цитираните по-горе честоти на срещане на двата алела (43 %). Това намираще израз и в коефициента на инбридинг (силно положителен, $F_{is} \approx 0.44$), т.е. относителният дял на хетерозиготите беше намален за сметка на увеличаване на дяла на хомозиготите *del/del*. Относителният дял на хомозиготите по "репаративно-дефектния" инсерционен алел в групата от клинично здрави индивиди също беше около два пъти повишен спрямо теоретично изчисленото (16 % наблюдавани срещу 8 % по изчисления), така че в консолидираната група на здравите индивиди като цяло преобладаваха хомозиготните генотипове.

Разпределението на алелните форми на полиморфизма *ERCC1 C8092A* в извадка от клинично здрави индивиди от българската популация беше, както следва, за *C*-алела - 0.754 и за *A*-алела - 0.343. Не беше наблюдавано съществено отклонение от разпределението, зададено от закона на Харди-Вайнберг.

Честотите на срещане на двата полиморфни алела на полиморфизма *XRCC3 Thr241Met* в българската популация от клинично здрави индивиди беше, както следва, за *Thr* алела - 0.530 и за *Met* алела - 0.470. Прави впечатление превалирането на

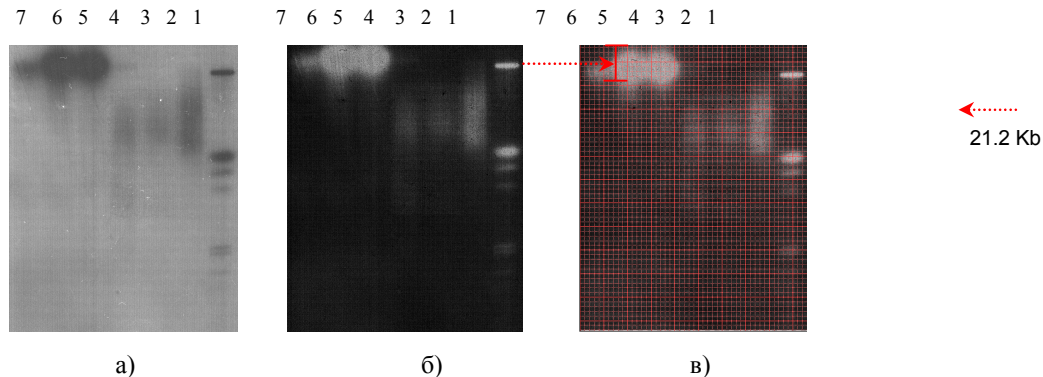
субтеломерните последователности, средно между 4 и 10 Kb [75,76].

Средната дължина на контролните проби от смесени клетъчни популации (периферни левкоцити) в групата от клинично здрави индивиди беше 5.61 Kb, със стандартно отклонение ± 0.696 . Средната дължина на теломерите в отделните проби варираше от 6.91 до 4.45 Kb. Наблюдаваше се обща тенденция да се скъсява с възрастта. Най-голямата средна дължина (6.91 Kb) беше измерена при индивид на възраст 29 години, а най-късата (4.45 Kb) – при индивид на възраст 65 години. Разбира се, от това имаше и изключения, така че в отделни проби се наблюдаваха по-висока средна дължина на теломерите при по-възрастни клинично здрави индивиди и, обратното, по-ниска средна дължина при по-млади индивиди.

6. Оценка на дължината на теломерите в извадка от групата пациенти с церебро-васкуларни инциденти

Средната дължина на теломерите на смесени левкоцитни популации беше оценена по описаната по-горе методология и в извадка (10 индивида) от консолидираната група от индивиди с церебро-васкуларни инциденти. Средната дължина на теломерите в тази група беше 5.48 Kb, със стандартно отклонение ± 0.251 . Средната дължина на теломерите в отделните проби варираше от 6.01 до 5.05 Kb. Както се вижда, разликата в средната дължина на теломерите в групата от клинично здрави индивиди и индивидите с церебро-васкуларни инциденти е малка (5.61 Kb при здравите индивиди срещу 5.48 Kb в пациентската група). Абсолютната стойност на най-голямата измерена дължина в пациентската група (6.01 Kb) беше по-ниска от най-голямата измерена дължина в групата от клинично здрави индивиди (6.91 Kb), а най-малката измерена дължина в пациентската група (5.05 Kb) беше по-висока от най-малката измерена дължина в групата от клинично здрави индивиди (4.45 Kb). Възможно е тази разлика да се дължи на преобладаване на хромозоми с дължина на теломерите около средните стойности в пациентската група (по-висока хомогенност на дължината на теломерите) в сравнение с групата на здравите индивиди (по-висока хетерогенност на дължината на теломерите).

дължини има принос в определянето на средната стойност. Поради това, изображението, което се получава при използване на метода на терминалните фрагменти за определяне на дължина на теломери е под формата на петно (при ограничена вариация на дължините в изследваната клетъчна популация) или смир (при по-широко разпределение на дължините в изследваните клетки). Типично изображение е показано на фиг. 4.



Фиг. 4. а) Типично рентгенографско изображение на изследваните проби („сива скала”); б) „обърнато” копие, в) – копие, разделено на сегменти с цел количествен анализ на денситометрирания образ. Пътека 1 - DIG-белязан маркер, пътеки 2-3- проби от ДНК, изолирана от левкоцити от периферна кръв на здрави индивиди (3 μ г ДНК, хидролизирана по RsaI/Hinf I), пътека 4 – Jurkat E6-1 (3 μ г ДНК, хидролизирана по RsaI/Hinf I), пътеки 5-7 – Т-1301 – 3, 1.5 и 0.15 μ г ДНК, хидролизирана по RsaI/Hinf I).

За разлика от дължините на теломерите в естествените клетъчни популации, в клетъчната линия Т-1301 средната дължина на теломерите е около 23.5 Kb [74]. Рутинно използваните маркери за определяне на дължина на теломери чрез хибридизационен анализ рядко имат ивица с дължина над 21.5 Kb, така че определянето на числен израз при дължина на теломерите над 21 Kb е трудно осъществимо. Стойността на средната дължина на Jurkat клетките, измерени в рамките на настоящото изследване беше 4.16 Kb, заедно със субтеломерния участък, което съвпада с данните от литературата (в зависимост от методологията, и, съответно, включване на различен дял от

хетерозиготните генотипове (61 %, което е 22 % над очакваното (около 50 %). Последното се отразява като повишаване на наблюдаваната хетерозиготност над очакваната и, съответно, негативиране на коефициента на инбридинг (около -0.21).

Разпределението на полиморфните форми на полиморфизма *XRCC1 Arg399Gln* не показва съществени отклонения от разпределението, зададено от закона на Харди-Вайнберг. Arg-алелът се срещаше с честота 0.570, а Gln алелът - 0.430.

Честотите на срещане на алелите на полиморфизма *XPD (ERCC2) Lys751Gln* в консолидираната група от здрави индивиди беше, както следва, за 751Lys алела - 0.603 и за 751Gln алела - 0.397. Наблюдаваше се излишък на хетерозиготи - около 12 % повече, отколкото би могло да се очаква при дадените алелни честоти.

По отношение на полиморфизма *MTHFR C677T* в контролната група честотата на двата полиморфни алела беше, както следва, за С-алела - 0.634 и за Т-алела - 0.366. Не бяха наблюдавани съществени отклонения в разпределението на алелните честоти.

Хетерозиготите по мутацията Фактор V Leiden се срещаша с честота около 10 %, което е сравнимо с теоретично изчислената хетерозиготност. Същото важеше и за мутацията *PT G20210A* - честота на алела около 1.5 %, и честота на срещане около 3 % в хетерозиготно състояние в изследваната група, което съответства на теоретично изчисленото. В групата на клинично здравите индивиди не бяха намерени хомозиготи по нито една от двете мутации, нито компаунд-хетерозиготи, което е и очаквано, като се има предвид, че носителството на повече от една протромботична мутация обикновено значително повишава риска от неблагоприятни здравни последици.

Значителни отклонения не се наблюдаваха и при маркера *PAII 4G/5G*, (алел 4G - 0.550, алел 5G - 0.450) с изключение на умерено (13 %) намаление на броя на наблюдаваните хетерозиготи за сметка на хомозиготите и от двата типа, което води до леко позитивиране на коефициента на инбридинг.

Триалелната полиморфна система *APOE E2/E3/E4* беше проследена в 184 независими хромозоми в консолидираната група от клинично здрави индивиди, и в 138 независими

хромозоми в консолидираната група от пациенти с цереброваскуларни инциденти, тъй като по една проба във всяка група изследвани индивиди не можеше да бъде анализирана чрез използваната от нас методология, вероятно поради носителство на редки алели (т.е. нито E2, нито E3 или E4). Честотата на "нормалния" (най-често срещан, необвързан с никакви фенотипни особености) алел E3 беше 0.812, а честотата на двата полиморфни алела беше практически еднаква (0.091 за алела E2 и 0.097 за алела E4). Нито един от двата вариантни алела не беше намерен в хомозиготно състояние в изследваната консолидирана група от здрави индивиди. *Fis* заемаше отрицателна стойност, съответстваща на лек излишък на хетерозиготи, и действително относителният дял на наблюдаваните в извадката хетерозиготи E2/E3 беше около 30 % спрямо очакваното, а на хетерозиготите E3/E4 - около 22 %.

3. Първични данни за особеностите на разпределението на изследваните генетични полиморфизми при индивиди със заболявания и състояния с мултифакторна генеза

Обобщените резултати от проведените до този момент изследвания върху разпределението на вариантността на изследваните ДНК полиморфизми при индивиди с история за поне един цереброваскуларен инцидент са представени в числен вид в табл. VII и VIII.

Табл. VII. Основни параметри на вариантността на изследваните маркери в консолидираната група от индивиди от български произход с история за поне един церебро-васкуларен инцидент - алелни честоти и хетерозиготност. N_{exp} - експериментално наблюдавана хетерозиготност, N_{obs} - теоретично изчислена хетерозиготност.

Маркер	Алелна честота			N_{obs}	N_{exp}
	Оригина-лен	Вариантен 1	Вариантен 2		
TP53 Pro72Arg	Алел Pro	Алел Arg		0.333	0.373
	0.329	0.671			
	Алел del	Алел ins		0.538	0.501

така че характеристиките на стволково-клетъчната линия в тази връзка съвпадат със средното за българската популация.

Хетерозиготното носителство в изследваната линия чЕСК се наблюдава по отношение на маркера *TP53 Pro72Arg* (което е често срещано в българската популация), както и маркерите *XPCins83* и *XRCC3 Thr241Met*. Както вече обсъждахме по-горе, инсерционният алел на маркера *XPCins83* е свързан с по-нисък капацитет за разпознаване на увреждания в нетранскрибиращи се участъци на генома. Според получените от нас резултати, носителството му, особено когато е в хетерозиготно състояние, е свързано с повишен риск от възникване на церебро - васкуларни инциденти. Наличието на данни за носителство на "високорискови" алели в стволково-клетъчен препарат е, от една страна, много ценна информация, тъй като това прави клетъчната линия много подходяща за допълнителни изследвания в областта на генетичните предиспозиции към мултифакторни заболявания при човека. От гледна точка на потенциалните клинични приложения, обаче, наличието на носителството на алели, свързани с повишен риск за заболявания на индивида, е фактор, който би намалил вероятността съответната клетъчна линия да има евентуални приложения в директната клинична практика.

Във връзка с горното и тъй като става дума за култивирани клетки, трябва да се отбележи, че намереното в изследваната линия от чЕСК хетерозиготно носителство на вариантния алел на маркера *XRCC3 Thr241Met* е предиктор за повишен риск от геномна нестабилност при култивиране [73]. В *in vivo* контекст, повишената геномна нестабилност обикновено е свързана с повишен риск от ракова трансформация. Това отново е ценна информация, която повишава ценността на клетъчната линия от гледна точка на изследователската дейност, но я изключва от потенциални клинични приложения.

5. Оценка на дължината на теломерите в контролните клетъчни линии в съпоставка със смесени клетъчни популации от здрави индивиди

Дължината на теломерите не е еднаква във всички клетки, изграждащи една тъкан и, съответно, стойността, която се получава при този тип анализ е усреднена, като всяка фракция от

Табл. X. Изследвани полиморфизми и статус на носителство на вариантите им форми при контролните клетъчни линии и линията от ембрионални стволови клетки.

Маркер	Jurkat E6-1	T-1301	hESC
<i>TP53 Pro72Arg</i>	Arg/Arg	Pro/Arg	Pro/Arg
<i>XPC ins83</i>	del/del	ins/del	ins/del
<i>XPD Asp312Asn</i>	Asp/Asp	Asp/Asp	Asp/Asp
<i>XPD Lys751Gln</i>	Lys/Lys	Lys/Lys	Lys/Lys
<i>ERCC1 C8092A</i>	CA	CC	CC
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	Arg/Gln	Arg/Arg	Arg/Arg
<i>XRCC3 Thr241Met</i>	Thr/Met	Thr/Met	Thr/Met
<i>MTHFR C677T</i>	CC	CT	CT
<i>AmelXY</i>	XY	XX	XY
<i>PT G20210A</i>	GA	GA	GG
<i>Factor V Leiden</i>	GG	GG	GG
<i>CCR5del32</i>	NN	NN	NN
<i>APOE</i>	E3/E3	E2/E3	E3/E3

Доколкото ни е известно, до този момент анализ на индивидуалния репаративен капацитет на двете обезсмъртени клетъчни линии Jurkat E6-1 и T-1301, въпреки че се използват много често за изследователска дейност, не е публикуван в специализираната литература.

Както се вижда от таблицата, човешката линия от ембрионални стволови клетки се идентифицира като носеща по една X и Y хромозома (мъжки пол) и без особености по отношение на по-често срещаните протромботични мутации, с изключение на хетерозиготен генотип по маркера *MTHFR C677T*. Това не е неочаквана находка, тъй като хетерозиготният генотип по маркера *C677T* в гена *MTHFR* е много често срещан в българската популация от здрави индивиди (около 45 %, табл. V). По принцип, носителството на полиморфизма *MTHFR C677T* има клинично значение само когато е в хомозиготно състояние, или когато е сънаследена с други протромботични рискови фактори,

<i>XPC ins83</i>	0.587	0.413			
<i>ERCC1 C8092A</i>	Алел C	Алел A		0.385	0.399
	0.721	0.279			
<i>XRCC3 Thr241Met</i>	Алел Thr	Алел Met		0.875	0.510
	0.519	0.481			
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	Алел Arg	Алел Gln		0.487	0.473
	0.650	0.350			
<i>XPD Lys751Gln</i>	Алел Lys	Алел Gln		0.590	0.459
	0.641	0.359			
<i>MTHFR C677T</i>	Алел C	Алел T		0.487	0.501
	0.614	0.386			
<i>FV Leiden</i>	Алел G	Алел A		0.179	0.165
	0.936	0.064			
<i>PT G20210A</i>	Алел G	Алел A		0.128	0.121
	0.957	0.043			
<i>PAII 4G/5G</i>	Алел 4G	Алел 5G		0.667	0.460
	0.656	0.344			
<i>APOE E2/E3/E4</i>	Алел E3	Алел E2	Алел E4	0.171	0.232
	0.871	0.043	0.086		

Табл. VIII. Индекси на инбридинг на изследваните маркери в българската популация от индивиди от български произход с история за поне един cerebro-васкуларен инцидент. F_{is} [W & C]- индекс на инбридинг, изчислен по формулата на Weir & Cockerham [47]; F_{is} (R&H) - индекс на инбридинг, изчислен по формулата на Robertson & Hill [48].

Маркер	P-value	Стандартна грешка [SE = $(\mu - 1)/(2 \times 1.96)$]	F_{is} W & C)	F_{is} (R&H)
<i>TP53 Pro72Arg</i>	0.7890	0.0018	0.0359	0.0361
<i>XPC ins83</i>	0.8048	0.0019	-0.0388	-0.0391
<i>ERCC1 C8092A</i>	1.0000	0.0000	-0.0235	-0.0237
<i>XRCC3 Thr241Met</i>	0.0004	0.0001	-0.7638	-0.7673
<i>XRCC1</i>				

Arg399Gln	1.0000	0.0000	-0.0289	-0.0291
<i>XPD</i> Lys751Gln	0.0328	0.0016	-0.2823	-0.2839
<i>MTHFR</i> C677T	0.4564	0.0041	0.1027	0.1035
FV Leiden	1.0000	0.0000	-0.0615	-0.0620
<i>PT G20210A</i>	1.0000	0.0000	-0.0376	-0.0379
<i>PAI 4G/5G</i>	0.0988	0.0014	-0.5000	-0.5079
<i>APOE</i> E2/E3/E4	0.0209	0.0015	0.2660	0.2935

Честотата на полиморфните форми на полиморфизма *TP53 Pro72Arg* в консолидираната група от пациенти с cerebro-vasкуларни инциденти беше, както следва: за Pro алела - 0.329 и за Arg алела - 0.671, т.е. близко до разпределението на алелите на маркера в контролната група индивиди. "Про-репаративният" *Pro/Pro* генотип се срещаше с честота около 11 %. Забелязваше се разлика в хетерозиготността на маркера в двете изследвани групи, както на очакваната, така и на наблюдаваната, като наблюдаваната хетерозиготност на маркера беше с около 10 % по-ниска от очакваната и с около 25 % по-ниска от хетерозиготността на маркера *TP53 Pro72Arg* в контролната група. В рамките на групата като цяло хетерозиготният *72Pro/Arg* и хомозиготният *72Arg/Arg* генотип се срещаша с практически еднаква честота (42 % и 44 %, съответно), но в групата се стратифицираха две подгрупи с различна честота на срещане на различните генотипове (виж по-долу анализа на композитните генотипове).

Честотите на двата вариантни алела на полиморфизма *XPCins83* бяха: за делеционния ("репаративно-компетентен") – 0.587 и за инсерционния алел („репаративно-дефектен“) – 0.413. Делеционният алел се оказа с около 11 % по-ниска честота на срещане в групата от индивиди с cerebro-vasкуларни инциденти, спрямо същия при контролната група. За разлика от контролната група, при която имаше статистически значима разлика (около 76 %) между очакваната и наблюдаваната хетерозиготност, при групата на пациентите разликата между N_{exp} и N_{obs} беше само около 7 % (на един порядък по-малка). Анализът на коефициента на инбридинг в двете групи показва, че

българската популация. Подобни данни съществуват в специализираната литература [69-71].

За уточняване на наблюдаваната от нас в изследваните групи повишена честота на 4G-съдържащите генотипове по отношение на маркера *PAI1 4G/5G*, както и очевидно много по-често срещаното носителство на протромботичния A алел на полиморфизма *PT G20210A* в групата от пациенти с cerebro-vasкуларни инциденти, са необходими допълнителни проучвания.

Като обобщение на основните експериментални находки, може да се каже, че са идентифицирани два основни полиморфизма, носителството на специфични алели на които намалява риска от cerebro-vasкуларни инциденти в българската популация. Единият от тях (*XPC ins83*) е пряко свързан с индивидуалния капацитет за поправка на ДНК, а другият - с риска от церебрална амилоидоза (*APOE*). Ефектът на втория маркер върху фенотипа зависи от пола. Разбира се, тези наблюдения трябва да бъдат проверени и, евентуално, потвърдени в по-големи групи.

4. Оценка на капацитета за разпознаване на увреждания и поправка на ДНК при контролните клетъчни линии (Jurkat E6-1 и T-1301) при предходно създадена линия от човешки ембрионални стволови клетки

Генетично-обусловеният индивидуален репаративен капацитет беше изследван в използваните за контрола обезсмъртени клетъчни линии (Jurkat E6-1 и T-1301) и в една предходно създадена по проект с Фонд „Научни изследвания“ с ръководител проф. Румен Панков линия от човешки ембрионални стволови клетки (BABE1). С цел по-пълно охарактеризиране на линиите, включително от ембрионални стволови клетки, те бяха охарактеризирани по допълнителни маркери, включително за пол и за носителство на полиморфната форма на хемокин рецептор 5 (CCR5del32) и полиморфизма *XPD (ERCC2) Asp312Asn* [72]. Статусът на носителство на вариантни алели на изследваните ДНК полиморфизми за контролните обезсмъртени клетъчни линии и за изследваната линия от ембрионални стволови клетки е представен в табл. X.

алели може да е предразполагащ фактор за развитие на обширни апоптотични участъци в стената на мозъчните съдове, особено на места с предходни увреждания (напр. атеросклеротични плаки). Може да се предположи, че при част от пациентите с церебро-вакуларни инциденти (с изключение евентуално на compound хетерозиготите по мутациите F V Leiden и PT G20210A) генетичната компонента на повишения риск е носителството на "високорисковия" генотип *XPC 83 del/ins; XRCC3 Thr241Met Thr/Met; XPD (ERCC2) Lys751Gln*. При останалите пациенти от извадката може да се предположи роля на носителството на "про-апоптотичния" алел на полиморфизма *TP53 Pro72Arg* в хомозиготно състояние, заедно с други рискови фактори на индивидуалния репаративен капацитет, заедно или поотделно.

"Нискорисковият" композитен генотип *XPC in83 del/del : APOE2/E3* беше намерен само при един индивид от пациентската група (1.14 %) и 9 индивида (9.67 %) от контролната група (OR = 0.1353, 95 % CI: 0.0167 - 1.0941, P = 0.0607). Нивото на значимост на този резултат е над 0.05, поради което не можеше да се приеме за статистически значимо. Независимо от това, обръщаме внимание върху този резултат поради много голямата (8.48 пъти) разлика в честотата на срещане на този генотип в двете изследвани групи. Любопитно е също така да се отбележи, че докато всички клинично здрави индивиди с този двулокусен генотип също така носеха поне един про-апоптотичен *72Arg* алел по маркера *TP53 Pro72Arg*, докато единственият пациент с този генотип също така носеше и Pro/Pro генотипа по маркера *TP53 Pro72Arg*. Очевидно, ефектът на носителството на "протективните" генотипове *XPC in83 del/del : APOE2/E3* има по-голямо влияние върху фенотипа, отколкото носителството на про-апоптотичния *72Arg* алел.

Изолираното носителство на мутацията Factor V Leiden в хетерозиготно състояние не е свързано с повишен риск от церебро-вакуларни инциденти в изследваните от нас групи възрастни индивиди. Изолираното носителство на мутацията *PT G20210A*, както и compound хетерозиготното носителство на мутациите F V Leiden и PT G20210A по всяка вероятност повишават риска от церебро-вакуларни инциденти в

докато в контролната група от клинично здрави индивиди F_{is} е силно положителен (~ 0.44), в групата от пациенти с цереброваскуларни инциденти F_{is} е слабо отрицателен (-0.04). Разпределението на хомозиготите и хетерозиготите се доближаваше до очакваното при тези алелни честоти. На практика, това означава, че в групата на клинично здравите индивиди се наблюдаваше отклонение от закона на Харди-Вайнберг, изразяващо се в преобладаване на индивидите с хомозиготен про-репаративен *XPC83 del/del* генотип. Относителният риск (odds ratio, OR) за церебрално-съдови инциденти при носителите на "предпазващия" хомозиготен *del/del* генотип беше 0.446 (95 % CI: 0.225 - 0.886), P = 0.0211, т.е. рискът от цереброваскуларен инцидент за носителите му е 2.24 пъти по-нисък, отколкото за носителите на хетерозиготния генотип.

Разпределението на алелните форми на полиморфизма *ERCC1 C8092A* в извадката от индивиди с церебро-вакуларни инциденти беше, както следва: за С-алела - 0.721 и за А-алела - 0.279, без съществени особености на разпределението и на коефициента на инбридинг.

Честотите на срещане на двата вариантни алела на полиморфизма *XRCC3 Thr241Met* в българската популация от индивиди с цереброваскуларни инциденти беше, както следва, за Thr алела - 0.519 и за Met алела - 0.481. Подобно на резултатите, получени за контролната група, хетерозиготните генотипове превалираха силно над хомозиготните (88 %, което е 74 % над очакваното (около 50 %)). В тази връзка коефициентът на инбридинг при пациентите с цереброваскуларни инциденти се оказа силно негативен (-0.76). Относителният риск за носителите на хетерозиготния генотип беше 1.54 (95 % CI: 0.81 - 2.94), но тъй като стойността на нивото на значимост е над 0.05 (P = 0.1887) резултатът не беше приет за статистически значим.

Разпределението на полиморфните форми на полиморфизма *XRCC1 Arg399Gln* в групата от пациенти с церебро-вакуларни инциденти не показва съществени отклонения от очакваното разпределение. Arg-алелът се срещаше с честота 0.650, а Gln алелът - с честота 0.350.

Честотите на срещане на алелите на полиморфизма *XPD (ERCC2) Lys751Gln* в консолидираната група от пациенти с

церебро-вазуларни инциденти беше, както следва, за *751Lys* алела - 0.641 и за *751Gln* алела - 0.359. При анализа на генотиповете се оказа, че в тази група преобладават хетерозиготите, което се отразява на разликата между наблюдаваната и очакваната хетерозиготност (около 29 %) и на коефициента на инбридинг, който увеличава негативната си стойност. Относителният риск за носителите на хетерозиготния генотип беше 2.06 (95 % CI: 1.1 - 3.88) с ниво на значимост $P = 0.0249$. Този резултат има статистическа значимост.

Разпределението на алелните форми на полиморфизма *MTHFR C677T* в групата от пациенти с церебро-вазуларни инциденти не показва съществени разлики с разпределението при здравите индивиди. Честотата на алелните форми на полиморфизма *MTHFR C677T* при индивидите с церебро-вазуларни инциденти беше, както следва: за С-алела - 0.614 и за Т-алела - 0.386, т.е. не се наблюдаваше статистически значима разлика.

Честотата на срещане на А-алела на маркера Factor V Leiden (обуславящ резистентност към С-протеина и, съответно, повишен риск от тромбози) в групата пациенти с история за цереброваскуларни инциденти беше около 6 %. Честотата на срещане на хетерозиготите беше около 13 %, т.е. около 30 % по-висока от честотата на срещане в контролната група, но тази разлика не беше преценена като статистически значима ($P=1.0$, и в двете изследвани групи, т.е. съответното разпределение може да бъде получено изцяло от случайно разпределение на експерименталните данни).

Честотата на "протромботичния" алел на маркера *PT G20210A* в консолидираната група от пациенти с церебро-вазуларни инциденти беше малко над 4 %, и, съответно, честотата на срещане на хетерозиготите по маркера *PT G20210A* беше 8.5 %. Това е над 2.5 пъти повече от честотата на срещане на хетерозиготния генотип при здравите индивиди. Отново, статистическата оценка показва, че тази разлика няма статистическа значимост, но тъй като тя е твърде голяма (268 %), обръщаме внимание на тази находка при пациентите с церебро-вазуларни инциденти.

За разлика от контролната група, в групата на пациентите с церебро-вазуларни инциденти се срещаша "двойни"

са клетките на епидермиса и съдовия ендотел. В тези клетки поправката на ДНК в нетранскрибиращите се участъци на генома може да бъде критично важна, тъй като натрупването на непоправени увреждания в ДНК може да доведе до забавяне на подновяването на клетките от съдовата стена и/или ненавременната им смърт по програмирани механизми. Това, от своя страна, е свързано с нарушаване на съдовия интегритет и повишен риск от съдови инциденти.

Статистически значимо преобладаване на хетерозиготите в пациентската спрямо контролната група беше наблюдавано и по отношение на маркерите за индивидуален капацитет за поправка на ДНК *XRCC3 Thr241Met* и *XPB (ERCC2) Lys751Gln*. За единия от тези маркери (*XPB (ERCC2) Lys751Gln*) вече са описани ефекти на хетерозиготното носителство, свързани с ускоряване процеса на стареене на клетките и тъканите и, съответно, развитие на типични "възрастово-обусловени" патологични състояния [60,68].

Композитният "репаративно-дефектен" генотип *XPC 83 del/ins; XRCC3 Thr241Met Thr/Met; XPB (ERCC2) Lys751Gln* се срещаше около 7 пъти по-рядко в контролната група, отколкото в групата от пациенти с церебро-вазуларни инциденти (1.1 % срещу 7.1 %). Теоретично изчислената честота на срещане на този генотип е около 3 %, т.е. "високорисковият генотип" се среща в контролната група 3 пъти по-рядко от очакваното.

Композитният "репаративно-компетентен" генотип *XPC 83 del/del; XRCC3 Thr241Met Thr/Thr; XPB (ERCC2) Lys751Lys* не беше намерен в групата от пациенти с церебро-вазуларни инциденти и беше намерен с честота 3 % в контролната група. Теоретично изчислената честота на срещане на този генотип е около 1 %, т.е. "нискорисковият генотип" се среща в контролната група 3 пъти по-често от очакваното.

При болшинството (85 %) от пациенти с церебро-вазуларни инциденти, в които беше намерен генотип, различен от "репаративно-дефектния" (*XPC 83 del/ins; XRCC3 Thr241Met Thr/Met; XPB (ERCC2) Lys751Gln*) се намери носителство на "про-апоптотичния" *72Arg* алел на полиморфизма *TP53 Pro72Arg*, основно в хомозиготно състояние - *72Arg/Arg* (65 %). Честотата на хомозиготното носителство на *72Arg* алела в цялата група беше 44 %. Носителството на "про-апоптотични" *72Arg*

Обща схема на най-често срещания композитен генотип в двете изследвани групи е представена в табл. IX.

Табл. IX. Най-често срещани композитни генотипове по изследваните 11 маркера в двете консолидирани групи индивиди. Видимите различия са означени с червено.

Маркер	Здрави	Пациенти
<i>TP53 Pro72Arg</i>	Arg/Arg	Arg/Arg
<i>XPC ins83</i>	del/del	ins/del
<i>ERCC1 C8092A</i>	C/C	C/C
<i>XRCC3 Thr241Met</i>	Thr/Met	Thr/Met
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	Arg/Gln	Arg/Gln
<i>XPD Lys751Gln</i>	Lys/Gln	Lys/Gln
<i>MTHFR C677T</i>	C/T	C/T
<i>FV Leiden</i>	G/G	G/G
<i>PT G20210A</i>	G/G	G/G
<i>PAI 4G/5G</i>	4G/5G	4G/5G
<i>APOE</i>	E3/E3	E3/E3

Може да се предположи, че носителството на "репаративно-дефектния" инсерционен алел на полиморфизма *XPCins83* допринася за повишаване на риска от съдови инциденти в българската популация. Това се касае основно за носителството в хетерозиготно състояние. Защо именно хетерозиготното състояние, а не хомозиготното носителство на „репаративно-дефицитния“ алел е свързано с повишаване на риска, може да се дължи на повече от една причина. За много маркери, свързани с индивидуалния репаративен капацитет (включително и за някои от използваните от нас в настоящата работа), е описан подобен ефект [59-66]. Доколкото на нас ни е известно, подобен ефект специфично за хетерозиготното носителство на полиморфизма *XPCins83* досега не е описан в литературата. Белтъкът ХРС е един от първите белтъци на глобалната ДНК поправка с изрязване на нуклеотиди, който разпознава и свързва увреждането и сигнализира на клетъчната машина за поправка да се транспортира до мястото на лезията [67]. Може да се предположи, че един генетично-обусловен нискостепенен дефицит на този белтък на поправката би имал сериозно значение само в клетки, които се делят активно, каквито

(compound) хетерозиготи по мутациите Factor V Leiden и PT G20210A, с честота 2.8 %. Това не е случайно събитие, тъй като рискът от ко-унаследяване на тези мутации (върху независими хромозоми) е доста под 1 %. Носителството на коя да е от тези мутации, както споменахме вече, повишава риска от тромбози. Рискът от поява на тромбози при хетерозиготните носители на мутацията Leiden е около 1:150, а при хомозиготните около 1:10. За мутацията PT G20210A рискът от тромбози е 1:250 за хетерозиготните носители и 1:50 за хомозиготите. За compound хетерозиготите по двете мутации, рискът от тромботични събития е между 1:50 и 1:100, така че не е учудващо, че близо 3 % от изследваните от нас пациенти спадат към тази категория.

Разпределението на вариантните форми на полиморфизма *PAI1 4G/5G* в групата на пациентите с церебро-васкуларни инциденти показва известни особености в сравнение с резултатите, получени при здравите индивиди. Честотата на алелите беше, както следва: алел 4G - 0.656, алел 5G - 0.344, като честотата на про-тромботичния 4G алел беше повишена с около 19 % спрямо контролната група. Беше наблюдавано и значително увеличение на относителния дял на хетерозиготите (46 %) за сметка на хомозиготите, и по-точно на хомозиготите 5G/5G, които се срещаха с много ниска честота (около 1.5 % при очаквана честота на срещане около 11 %). В тази група това води до силно негативиране на коефициента на инбридинг. Разликата в очакваната и наблюдаваната хетерозиготност обаче беше преценена от софтуера като статистически незначима ($P = 0.099$). Относителният риск за носителите на хетерозиготния генотип беше 2.43 (95 % CI: 0.82 - 7.13) с ниво на значимост $P = 0.1060$, така че този резултат не беше приет за статистически значим.

Честотата на "нормалния" алел E3 беше 0.871, честотата на E2 алела беше 0.043, а на алела E4 - 0.086. Честотата на E4 алела беше малко по-висока (0.097) в групата на клинично здравите индивиди в нашата извадка, отколкото в групата на пациентите (0.086). Независимо от това, обаче, хомозиготи E4/E4 - (с висок риск за "атерогенен" липиден профил) бяха открити само в пациентската група - близо 3 %. За сравнение, очакваният процент E4/E4 хомозиготи при дадените по-горе алелни честоти е около 0.74 %, т.е. става дума за 4 пъти разлика между очакваната и наблюдаваната честота на срещане на E4/E4 хомозиготи в

пациентската група. Процентът на хетерозиготни E4-съдържащи генотипове, обаче, се оказва по-висок в контролната група (19.3 %) в сравнение с честотата на E4-съдържащите хетерозиготни генотипове в пациентската група (11.4 %). Както вече беше споменато, съотношението мъже/жени и в двете изследвани групи беше приблизително 1:1. На този фон в консолидираната пациентска група съотношението мъже:жени у носителите на E4 алела се оказва 3:1. В контролната група съотношението мъже/жени при носителите на E4 алела се оказва равно на общото съотношение мъже:жени, т.е. 1:1. На Това означава, че имаше три пъти разлика между съотношенията мъже:жени в контролната и пациентската група по отношение на носителството на E4 алела и, съответно, основният "излишък" на E4 хетерозиготи в групата от клинично здрави индивиди е за сметка на жените. За хетерозиготния носител на E4 от мъжки пол рискът от церебрално-съдови инциденти е около 3 пъти по-висок, отколкото за хетерозиготния носител от женски пол на същата възраст. Известно е, че при мъжете априорно е повишен рискът за съдова болест и съдови инциденти и вероятността пациентът да преживее инцидента е по-ниска, ако е от мъжки пол [53,54]. Мъжете обикновено имат по-високи нива на тотален и LDL-холестерол и по-ниски нива на HDL от жените на една и съща възраст, макар и тази разлика да намалява след менопаузата [55,56]. Съществуват и фактори на начина на живот, които повишават риска от съдови инциденти специфично при мъжете. Може да се предположи, че приносът на E4 алела към риска от съдови инциденти при индивиди от мъжки пол е свързан с допълнително увеличаване на вътрешно присъщия риск от съдова болест, както и с увеличаване на риска от нарушаване на целостта на стената на съда поради амилоидна ангиопатия, която често се среща при E4 носителите.

Честотата на срещане на E2 в изследваните две групи се различаваше значително - над два пъти по-висока в контролната група (0.091), отколкото в пациентската група (0.043). Честотата на хетерозиготните E2/E3 индивиди се различаваше над три пъти между двете групи (18.3 % в контролната срещу 5.7 % в пациентската група). Както се вижда, носителството на E2/E3 генотипа по всяка вероятност е свързано с понижаване на риска

от цереброваскуларни инциденти в българската популация (OR = 0.2794, 95 % CI: 0.0895 - 0.8726, P = 0.0282).

Беше намерена разлика в разпределението на носителството на алела E2 между мъжете и жените в двете групи. Съотношението мъже:жени за носителите на E2 алела в пациентската група беше 1:4, докато в контролната група същото съотношение беше 1:2 (т.е. два пъти разлика). Рискът от церебрално-съдов инцидент е по-нисък за мъжете-хетерозиготни носители на E2 алела, отколкото за жените на същата възраст. Може да се предположи, че носителството на E2 алела оказва модулиращ ефект върху априорно по-високия риск за мъжете - по всяка вероятност, във връзка с понижаването на нивата на тоталния и LDL холестерола у E2 носителите. "Благоприятните" ефекти на носителството на E2 алела, обаче, се отнасят само за носителите на един алел [57].

При анализ на разпределението на генотиповете по отношение на локуса *APOE* между двете изследвани групи се оказва, че в контролната група се срещат много по-често хетерозиготи от всякакъв тип, отколкото в пациентската група (37 % за контролната група срещу 17 % за пациентската), което се отразява и на коефициента на инбридинг (от слабо отрицателен до дефинитивно положителен за пациентската група). Допълнителните E4-хетерозиготи в контролната група, обаче, са основно жени, докато допълнителните E2 хетерозиготи са основно мъже. Поради това, всички описани ефекти на модулация на риска от съдови инциденти се отнасят повече за мъжете в българската популация, отколкото за жените. Тази корелация е обратна на известната в литературата корелация на риска от развитие на деменция от Алцхаймеров тип, която е по-висока при жените - носители на E4 и по-ниска при мъжете [58].

Най-често срещаните композитни генотипове (*TP53 Pro72Arg*, *XPCins83*, *ERCC1 C8092A*, *XRCC3 Thr241Met*, *XRCC1 Arg399Gln*, *XPD Lys751Gln*, *MTHFR C677T*, *FV Leiden*, *PT G20210A*, *PAIL 4G/5G*, *APOE*) в двете изследвани групи не се различаваха съществено, с изключение на локусите *XPCins83* (излишък на хомозиготи по делеционния алел в пациентската група) и *PAIL 4G/5G* (практически нулева честота на срещане на хомозиготи по 5G алела при очаквана честота на срещане около 11 %).