



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ
И АНАЛИЗИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ
ЗА ОЦЕНКА УСВОЯВАНЕТО
НА ХРАНИТЕЛНИ ВЕЩЕСТВА

Елена Йорданова Кузова

Дисертация

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление: 7.1. Медицина

Научна специалност: “Хранене и диететика“

Научни ръководители: Проф. Цвета Петрова Георгиева, дм

Проф. д-р Веселка Лалева Дулева, дм

София, 2021 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	6
1. ВЪВЕДЕНИЕ	8
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	10
2.1 Хранителни липиди или мазнини, постъпващи с храната	10
2.1.1 Глицериди и мастни киселини	11
2.1.2 Есенциални мастни киселини	16
2.1.2.А Омега - 6 мастни киселини	16
2.1.2.Б Омега - 3 мастни киселини	17
2.1.3 Фосфолипиди	18
2.1.4 Стероли	19
2.1.5 Други компоненти на хранителните мазнини	20
2.2 Метаболизъм и ключови ензими при трансформацията на есенциалните мастни киселини	20
2.3 Гени, участващи в метаболизма на омега-3 и омега-6 мастни киселини	28
2.4 Нутригенетика и нутригеномика - бързоразвиващи се интердисциплинарни науки	30
2.5 Нутригенетика и нутригеномика - поглед в миналото	33
2.6 Нутригенетични взаимодействия, свързани с метаболизма на есенциалните мастни киселини	36
2.7 Генетични варианти на <i>FADS1</i> и <i>FADS2</i> гени при определянето на хранителните нужди от омега-3 и омега-6 мастни киселини	37
2.8 Генетични варианти във <i>FADS</i> гените и тяхната роля за развитие на различни заболявания при хората	42
2.9 Модифициране на хранителното поведение чрез използване на генетична информация	54
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	63
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	64
4.1 Изследвана група	64
4.2 Методи за оценка на общо здравословно състояние и липиден профил	66
4.2.1 Антропометрични данни	66

4.2.2	Бодиимпедансметрия	67
4.2.3	Клинико и биохимични изследвания	67
4.3.	Молекулярно-генетични лабораторни методи	69
4.3.1	Общи лабораторни методи	69
4.3.1.1	Събиране на биологичен материал, съхранение и предварителна обработка на пробите	69
4.3.1.2	Екстракция на ДНК от биологичен материал	70
А.	Процедури за извличане на ДНК	70
Б.	Количествена и качествена оценка на екстрахираните ДНК	71
4.3.2	Специфични генетично-молекулярни методи	72
4.3.2.1	Генотипиране за откриване и определяне на единични нуклеотидни полиморфизми чрез полимеразно-верижна реакция	72
4.3.2.2	Секвенционни реакции	73
4.3.2.3	Полимеразна верижна реакция в реално време (Real PCR) чрез използване на флуоресцентно белязани сонди за алелна дискриминация	73
4.4	Метод на анкетното проучване	74
4.4.1	Метод 24-часов хранителен прием (24h Dietary Recall Method)	74
4.4.2	Метод Честота на консумация на храни (FFQ)	74
4.4.3	Анкетен метод – Здравен статус и фактори на риска за хронични заболявания (физическа активност, тютюнопушене, употреба на алкохол, и др.)	76
4.5	Статистически методи за анализ	78
5.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	79
5.1	Дизайн на проучването	79
5.2	Разработване и имплементиране на методология за анализ на <i>rs174547</i> генетичен полиморфизъм	81
А.	Разработване и дизайн на праймерна система за анализ на генетичния вариант (<i>rs174547</i>) на <i>FADS1</i> гена	81
Б.	Софтуер за дизайн на праймерни двойки и сонди	81
В.	Процес по оптимизация на PCR реакцията	83
Г.	Визуализация и документиране на резултатите, получени от конвенционалния PCR	83

5.3 Основни характеристики на популационната група	94
5.4 Клинични и биохимични показатели на участниците в проучването	101
5.5 Определяне на алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на <i>rs174547</i> SNP полиморфизъм в гена <i>FADS1</i> сред българската популация	108
5.6 Честота на консумация на обичайни групи храни и храни, богати на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини	122
5.7 Изследване връзката между генотипа и биохимичните маркери за оценка на холестероловия профил (Cholesterol Total, HDL, LDL, TG) и кръвна захар	137
5.8 Оценка на влиянието на единичния нуклеотиден полиморфизъм <i>rs174547</i> във <i>FADS1</i> гена върху кардиоваскуларния риск	140
5.9 Влияние на еднонуклеотидния полиморфизъм <i>rs174547</i> във десатуразния ген <i>FADS1</i> върху изявата на метаболитен синдром	145
5.10 Взаимодействие между хранителния прием на мастни киселини, холестероловия профил и генотипа	147
6. ОБОБЩЕНИЕ	159
7. ИЗВОДИ	164
8. ПРИНОСИ	166
9. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ	167
10. ПРИЛОЖЕНИЯ	180

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата научна работа нямаше да се реализира без подкрепата и съдействието на редица прекрасни хора. Затова в следващите редове бих искала да изкажа моите най-искрени благодарности към тях.

На първо място благодаря на Бог, че ми даде сили да довърша този мой проект. В много трудни моменти се оповавах на вярата и си повтарях, че ако така е писано, този труд ще види бял свят.

Благодаря на семейството и мъжа ми, които понесоха най-много негативи и лишения, докато аз преследвах тази своя мечта. Бяха неотлъчно до мен и с безкрайно търпение и обич ми показаха, какво е да бъдеш подкрепян и обичан.

Благодаря и на моите двама прекрасни научни ръководители- проф. Цвета Георгиева, д.м и проф. д-р Веселка Дулева д.м, които с търпение и ентузиазъм ме потопиха в дебрите на истинската наука. Вдъхваха ми увереност и кураж, когато бях на път да се предам и ме подкрепяха при всичките ми хрумки и идеи. За мен те са не само научни ръководители, но и ментори в университета на живота.

Благодаря на моите отзивчиви колеги от отдел „Приложна геномика и ГМО“ към НЦОЗА - Диана Христатиева, Станимира Арсова, Донка Димбарева и Краси Василева за подкрепата и вярата, че ще довърша тази дисертация.

Благодарности изказвам и на екипа на Медицински университет-Плевен, в частност на доц.др. Здравка Радионова д.м и доц. др. Ваня Бирданова, д.м за ползотворната съвместна работа при набирането на доброволците за настоящето проучване.

Благодаря на д-р Е. Чикова-Ишченер, също докторант към отдел „Храни и хранене“, НЦОЗА за неспирния поток от ценни статии, книги и научни материали, за споделените житейски уроци и благата усмивка, с която ме даряваше в трудните моменти като докторант. Благодаря и на гл.експ.Зорница Дунева за търпението и отделеното време при работата с базата данни за химически състав на храните.

Благодаря на гл. експерт Даниела Божилова, отдел “Рискови поведенчески фактори и превенция на ХНБ“,НЦОЗА, която ми оказва голямо съдействие при извършване статистическите анализи, както и на гл.ас.Емилия Насева към Факултет за Обществено Здраве, МУ-София и доц. Мирчо Вуков, за консултациите при решаване на някои статистическите казуси.

Благодаря, на всички останали допринесли за реализирането на това нелеко начинание.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕМК – есенциални мастни киселини;

ИБС – исхемична болест на сърцето;

КБС – коронарна болест на сърцето;

МСБ – мозъчно-съдови болести;

T2Д – диабет тип 2;

AA – Arachidonic Acid, арахидонова киселина;

ALA – alpha-Linoleic Acid, алфа-линоленова киселина;

АРОЕ – ApoLipoprotein E, аполипопротеин E;

ASCVD – Atherosclerotic Cardiovascular Disease, атеросклеротична сърдечно-съдова болест;

BG – Blood Glucose, кръвна глюкоза;

BMI – Body Mass Index, индекс на телесна маса (ИТМ);

BMR – Basal Metabolic Rate, базално метаболитно ниво;

COX-2 – Cyclooxygenase-2, циклооксигеназа-2;

CRP – C reactive protein, C реактивен протеин;

DHA – Docosahexaenoic Acid, докозахексаенова киселина;

DTC-GT – Direct-to-Consumer Genetic-Testing, генетичен тест предназначен директно за потребителя;

D5D (Δ 5D) - delta-5-desaturase, делта-5-десатураза;

D6D (Δ 6D) - delta-6-desaturase, делта-6-десатураза;

EPA – Eicosapentaenoic Acid, ейкозапентаенова киселина;

FADS – Fatty Acid Desaturase, десатураза на мастните киселини;

FFM – Free Fatty Mass, свободна мастна тъкан;

FFQ – Food Frequency Questionnaire, анкетна карта за честота на консумация на храна;

FM – Fatty Mass, мастна тъкан;

GWAS – Genome Wide Association Study, пълногеномно асоциативно проучване;

HDL – High Density Lipoproteins, липопротеини с висока плътност;

НОСО – High Oleic Conola Oil, масло от рапица с високо олеиново съдържание;

IA – Islet Autoimmunity, автоимунна реакция към панкреасните островни клетки;

LA – Linolic Acid, линолова киселина;

LC-PUFA – Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid, дълговерижна полиненаситена мастна киселина;

LDL – Low Density Lipoproteins, липопротеини с ниска плътност;

MAF – Minor Allele Frequency, честота на минорния алел;

MUFA – Monounsaturated Fatty Acids, мононенаситени мастни киселини;

PBS – Phosphate Buffered Saline, фосфатно буфериран физиологичен разтвор;

PPAR – Peroxisome Proliferator Activated Receptor, рецептор активиран с пероксизомен пролифератор;

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid, полиненаситена мастна киселина;

RBC – red blood cells, червени кръвни клетки;

RT-PCR – Real-Time Polymerase Chain Reaction, полимеразно-верижна реакция с откриване в реално време;

SCORE – Systematic Coronary Risk Evaluation, системна оценъчна скала за определяне на коронарен риск;

SFA - Saturated Fatty Acids, наситени мастни киселини;

SNP – Single Nucleotide Polymorphism, единичен нуклеотиден полиморфизъм;

TAG – triacylglycerol, триацилглицерол;

TBW – Total Body Water, общо количество вода в организма;

TG – triglycerides, триглицериди;

5-LO – 5-Lipoxygenase, 5-липооксигеназа;

1. ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

Проучвания на българската популация, доказват изключително нисък прием на омега 3-мастни киселини, поради ниска консумация на риба. Тези констатации и липсата на данни за България относно генетичните варианти на *FADS1* са предпоставка за провеждане на задълбочени проучвания, както

на рискови групи, например пациенти със сърдечно-съдови заболявания, дислипидемии или хранителен дефицит на LC-PUFAs, така и при здрави хора.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

*“Всеки от нас има уникален “химичен състав”,
който разкрива вариациите в отговора на организма
към храните, лекарствата и околната среда.
Причината да сме уникални са разликите в нашите гени”
Роджер Уилиамс, Biochemical Individuality, 1950 г.*

2.1 Хранителни липиди, или мазнини постъпващи с храната

Липидите са група съединения, които се разтварят в органични разтворители като бензин или хлороформ, но обикновено са неразтворими във вода (105). Най-различимите липиди в храненето са годните за консумация масла (олио, зехтин), които са течност при стайна температура и мазнини, които са твърдо вещество при стайна температура (лой, мас, сланина). Но има и мазнини, които не са толкова различни и това са мазнините, които се влагат в храната по време на нейната технологична преработка или модифициране. Липидите са както основен източник на енергия, така и важни структурни елементи, а също и изпълняващи множество биологични функции. Някои от тях са незаменими макронутриенти, защото не могат да бъдат синтезирани от тялото, но са нужни за голяма част от метаболитните и физиологични процеси, както и за подържане структурния и функционален интегритет на всички клетъчни мембрани (133). Липидите са единствената форма, в която тялото може да съхранява енергия за продължителен период от време. Съхраняваните в мастната тъкан липиди също така служат за осигуряване на изолация, помагат за контрола на температурата на тялото и да осигурят някаква физическа

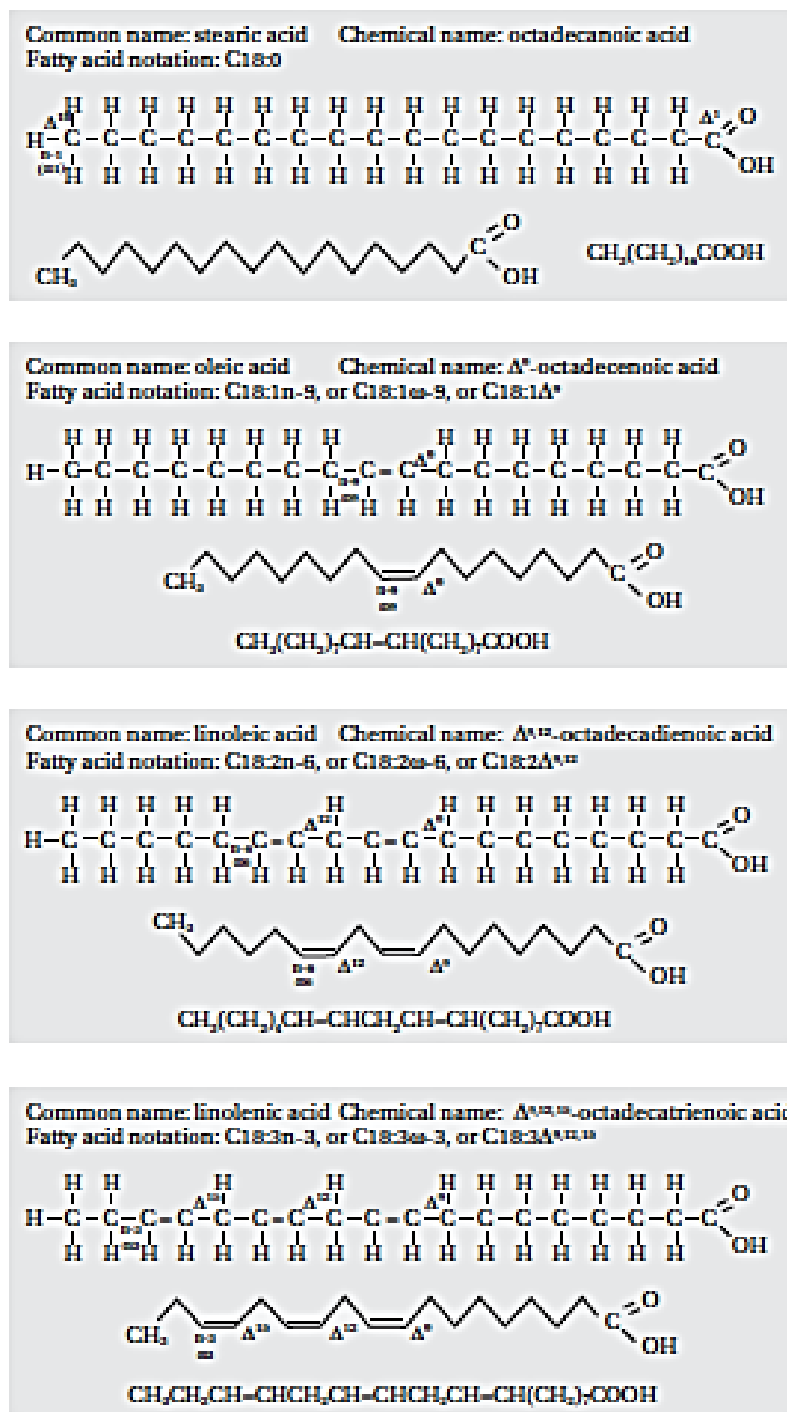
защита за вътрешните органи. С липидна структура са и мастноразтворимите витамини (витамин А, витамин Д, витамин Е).

Разпространените в естествено състояние хранителни липиди се срещат в голямо разнообразие като могат да бъдат от животински и растителни източници, включително животинска мастна тъкан (видимата мазнина върху месото, свинска мас и лой); мляко и млечни продукти (сметана, масло, сирене и кисело мляко); семена, ядки, масла и продукти, получени от тях (например маргарини); яйца; мазна риба и рибено масло, както и в растения като авокадото например (105). Триацилглицеролите, познати също като триглицериди, съставляват по-голямата част от хранителните липиди, а останалата част са фосфолипиди и стероли (133).

2.1.1 Триглицериди и мастни киселини

Триацилглицеролите съставляват около 95% от хранителните липиди. Молекула триацилглицерол се образува от молекула глицерол (три-въглерод алкохол) с три прикрепени мастни киселини (**Фиг. 1**). Мастните киселини са изградени от верига с четен брой въглеродни атоми и прикрепени към тях водородни атоми - метилова група в единия край и карбоксилна група в другия (**Фиг. 2**). Въглеродните атоми класически се номерират от карбоксилния въглерод (въглерод № 1). Въглеродът при метилния край се означава като n минус ($n-$) или омега (ω) въглероден атом. Физическите и биологичните свойства на триацилглицеролите се определят от естеството на съставните мастни киселини (105).

температура, докато мазнини (например соево масло), в чието съдържание преобладават полиненаситените мастни киселини са течност при стайна температура (172).



Фигура 2. Имена и структура на някои по-разпространени мастни киселини (105)

Позицията на ненаситените връзки в моно- и полиненаситените мастни киселини оказват сериозно влияние върху хранителните им свойства както и върху ефектите, които тези киселини имат върху човешкото здраве. Позицията на първата двойна връзка спрямо метиловия край показва "семейството", към което принадлежи съответната наситена мастна киселина. Наситени мастни киселини, при които първата двойна връзка е при третия въглероден атом от метиловия край на въглеродната верига се наричат $n-3$ или $\omega-3$ мастни киселини. Тези, в които първата двойна връзка е при шестия въглероден атом са $n-6$ или $\omega-6$ мастни киселини. Третото важно семейство е групата на $n-9$ или $\omega-9$ мастни киселини, където първата двойна връзка е при деветия въглероден атом от метиловия край. В човешкия организъм, мастните киселини, принадлежащи към едно "семейство" не могат да бъдат превърнати в такива от друго "семейство" (105).

Понякога мастните киселини са класифицирани по дължина на въглеродната верига и се означават като късоверижни (т.е. с по-малко от 8 въглеродни атома), средноверижни (с 8-12 въглеродни атома), дълговерижни (с 14 или повече въглеродни атоми) или много дълговерижни (с 22 или повече) мастни киселини. Почти всички мастни киселини имат дължини на веригата с четен брой въглеродни атоми; съществуват обаче няколко мастни киселини с нечетен брой въглеродни атоми, които се съдържат в много малки количества в мазнините от преживни животни. Списък на мастни киселини, съдържащи се в някои хранителни продукти, представляващи особен интерес са представени на **Таблица 1**.

Таблица 1. Наименования на мастните киселини и храни, които ги съдържат

ТРИВИАЛНО ИМЕ	НОМЕНКЛАТУРА	ХРАНИТЕЛЕН ИЗТОЧНИК
Оцетна /Acetic/	2:0	Оцет
Маслена /Butyric/	4:0	млечни мазнини
Капронова /Caproic/	6:0	млечни мазнини
Каприлова /Caprylic/	8:0	масло от палмови ядки
Капринова /Capric/	10:0	млечни мазнини, кокосово масло
Лауринова /Lauric/	12:0	кокосово масло
Миристинова /Myristic/	14:0	млечни мазнини, кокосово масло
Пентадеканова Pentadecanoic	15:0	малки количества в мазнините от преживни животни (например крава)
Палмитинова /Palmitic/	16:0	повечето растителни и животински мазнини
Маргаринова /Margaric/	17:0	много малки количества мазнини от преживни животни (например крава)
Стеаринова /Stearic/	18:0	повечето растителни и животински мазнини
Арахидинова /Arachidic/	20:0	Фъстъци
Докозанолева /Behenic, docosanoic /	22:0	малко количество в животинските мазнини
Лигноцеринова /Lignoceric/	24:0	растителни отпадъци
Мононенаситени		
Палмитолеинова /Palmitoleic /	16:1 ω 7	риба и животински мазнини
Олеинова /Oleic/	18:1 ω 9	всички растителни и животински мазнини
Cis Ваксенова /cis-Vaccenic/	18:1 ω 7	малки количества в животинските мазнини
Ейкозенова /Eicosenoic/	20:1 ω 9	рапица и животински мазнини
Гадолеинова /Gadoleic/	20:1 ω 11	рибни масла
Ерукова /Erucic/	22:1 ω 9	рапица, животинска тъкан
Цетолеинова /Cetoleic/	22:1 ω 13	рибни масла
Нервонова /Nervonic/	24:1 ω 9	животински тъкани (мозък)
Хексакозенолова /Hexacosenoic/	26:1 ω 9	минимални количества в животинските тъкани
Полиненаситени		
Линолева /Linoleic (LO)/	18:2 ω 6	растителни масла: памучно, сусамово, соево, царевично, шафраново
Алфа Линоленова / α -Linolenic (LN)/	18:3 ω 3	растителни масла : соя , орех, ленено семе
Гама-Линолеова / γ -Linolenic (GLA)/	18:3 ω 6	растителни масла: вечерна иглика, пореч, касис
Дихомогама линолеова /Dihomo- γ linolenic (DGLA)/	20:3 ω 6	малки количества в животинските тъкани
Арахидонова /Arachidonic (AA)/	20:4 ω 6	малки количества в животинските тъкани
Адренова /Adrenic/	22:4 ω 6	малки количества в животинските тъкани
Ейкозапентаенова /Eicosapentaenoic acid(EPA)/	20:5 ω 3	растителни масла: соя, синап, орех, ленено семе
Докозапентаенова /Docosapentaenoic (DPA)/	22:5 ω 3	риби, рибево масло, животински тъкани (мозък)
Докозахексаенова /Docosahexaenoic (DHA)/	22:6 ω 3	риби, рибево масло, животински тъкани (мозък)

Адаптирана по Jim Mann, Stewart Truswell – Essentials of Human Nutrition, 4th edition, 2012 (105)

2.1.2 Есенциални мастни киселини

Незаменимите мастни киселини са клас полиненаситени мастни киселини, които тялото не може да произвежда, а се набавят единствено чрез храненето, за да се обезпечи нормално физиологично функциониране. Съществуват две фамилии от есенциални мастни киселини, n-6 и n-3, които водят началото си съответно от линолевата киселина (18:2n-6) и α -линоленова киселина (18:3n-3) и не са взаимно конвертируеми. Превръщането в производни с по-дълга верига включва редуване на десатуриране, последвано от удължаване на веригата. Идентифицирани са две десатурази със специфичност за вмъкване на двойна връзка в позиции делта-6 и делта-5 от края на карбоксилната група на мастните киселини, които се наричат съответно делта-6 ($\Delta 6$) и делта-5 ($\Delta 5$) десатураза (133).

2.1.2.A Омега - 6 (n-6) мастни киселини

Линолевата киселина (18:2n-6) се синтезира в растенията и е доминираща мастна киселина в повечето семена. Тя е основната мастна киселина в маслата от слънчоглед, шафран, царевица и соя. Линолевата киселина изпълнява много специфична роля по отношение на бариерната функция на кожата, особено във връзка с пропускливостта за водни молекули. Тази мастна киселина също е необходима и за нормалната диференциация на кожните клетки. Линолевата киселина претърпява метаболитни промени с образуване на хидрокси производни, които изглежда регулират генната експресия чрез въздействие върху PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) - ядрен хормонен рецептор (105). Някои от тези производни са съставни части на ацилгликозилцерамидите, които са важна съставна част на полупропускливата бариера на кожата. В тъканите на бозайници, включително и при човека се преобразува през гама-линоленова киселина и

дихомогамалиноленова киселина до арахидонова киселина (20:4n-6). Арахидоновата киселина е важна съставна част на повечето фосфолипиди, които образуват клетъчните мембрани. Важна роля играе и при клетъчното сигнализиране (във фосфатидил инозитол сигнализиращ път и синтеза на ейкозаноиди). В храната арахидонова киселина се открива в малки количества в яйчния жълтък и в месото. Делта-6 десатураза е ензимът, ограничаващ скоростта в синтеза на арахидоновата киселина (105).

2.1.2. Б Омега – 3 (n-3) мастни киселини

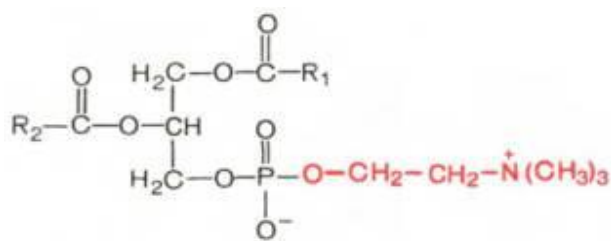
Алфа-линоленовата киселина (18:3n-3) е изходната мастна киселина от серията n-3. В растенията се синтезира от хлоропласти, затова моногастричните тревопасни животни, като коне и зайци, имат висок прием чрез пасенето на трева. Тази киселина се намира в променливи концентрации в растителни масла, като лененото семе, рапичното и соевото масло съдържат значителни количества. Гама-линоленова киселина може да се превърне в ейкозапентаенова киселина (20:5n-3; EPA) и след това в докозахексаенова киселина (22:6n-3; DHA) в организма. От тях DHA е основният метаболит намерен в човешките тъкани, където се концентрира предимно в мембранните фосфолипиди, особено при клетките на ретината и мозъчните структури (105). Доскоро се смяташе, че DHA се синтезира директно от докозапентаенова киселина (22:5n-3), под действие на делта-4 десатураза, но сега се знае, че се случва по непряк път, който включва удължаване на веригата от ейкозапентаенова (20:5n-3) до 24:5n-3, последвано от делта-6 десатурация, за да се образува 24: 6n-3, последвано от проксимално съкращаване на веригата до 22:6n-3 (112).

Капацитетът да се синтезира DHA от алфа-линоленова киселина изглежда ограничена и затова в диетата на недоносените деца задължително

трябва да присъства предварително синтезирана ДНА, от майчината кърма или от адаптираните млека. ЕРА и ДНА също се синтезират по различен метаболитен път в морските водорасли, който включва метаболитния път на поликетид синтазата. ЕРА и ДНА, получени от водорасли, се натрупват в морската хранителна верига и затова относително високи концентрации на тези омега-3 аминокиселини се срещат в рибеното масло (133).

2.1.3 Фосфолипиди

Фосфолипидите представляват относително малка пропорция от общия хранителен липиди. Четирите основни фосфолипиди съдържат диглицерид, в който третата позиция на молекулата на глицерола е заета от остатък на фосфорната киселина, към който е свързана една от четирите различни основни групи (холин, инозитол, серин или етаноламин). Заедно със сфингомиелин, тези четири фосфолипиди съставляват повече от 95% от фосфолипидите, открити в организма и в храните. Структурата на най-разпространения в природата фосфолипид, фосфатидилхолин (известен също като лецитин), е показана на **Фигура 3**.



Фосфатидилхолин (лецитин)

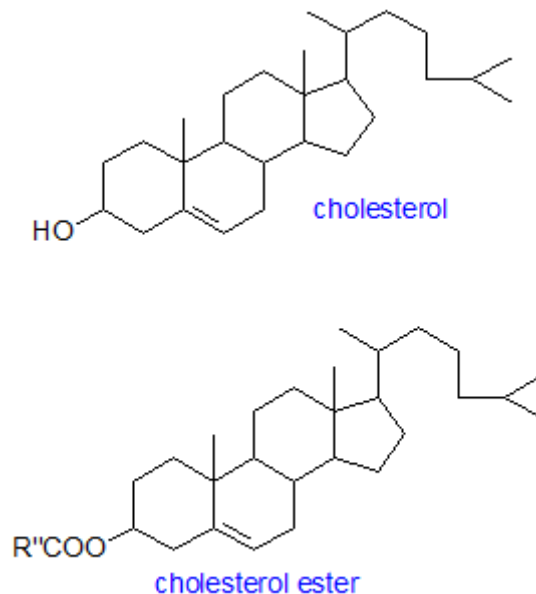
Фигура 3. Структура на фосфатидилхолина (лецитин)

Фосфолипидите се срещат във всички животински и растителни храни. Особено богати източници са черен дроб, яйца, фъстъци, соя и пшенични

кълнове. Основната група на фосфолипида формира полярна област, разтворима във вода, докато мастните киселини представляват неполярна област, неразтворима във вода. Тази амфипатична природа, имаща както полярни, така и неполярни характеристики дава възможност на фосфолипидите да действат на границата между водни и липидни среди, което им придава отлични емулгиращи средства. Структурната цялост на всички клетъчни мембрани и липопротеини зависи, наред с други фактори, от амфифилната природа на съставните фосфолипиди. Фосфолипидите също са важен източник на есенциални мастни киселини (105).

2.1.4 Стероли

Стероли са изградени от въглерод, водород и кислород, но за разлика от триацил-глицеролите и фосфолипидите, в тези липидни съединения въглеродните, водородните и кислородните атоми са подредени в серия от четири пръстена с редица странични вериги. Холестеролът е основният стерол на животинските тъкани и се среща само в животински храни, особено в яйца, месо, млечни продукти, риби и птици. Холестеролът в храната често има прикрепена към него мастна киселина, като по този начин образува холестеролов естер (**Фиг. 4**). При растенията основните стероли са т. нар. група на фитостероли, които са: β -ситостерол, кампестерол и стигмастерол. Холестеролът играе важна структурна роля в мембраните и липопротеините и функционира като предшественик на жлъчните киселини, стероидните хормони и витамин D (105).



Фигура 4. Структура на холестерола и холестеролов естер

2.1.5 Други компоненти на хранителните мазнини

Хранителните мазнини могат също да съдържат и малки количества други липиди, включително мастни алкохоли, ганглиозиди, сулфатиди и цереброзиди, както и витамин А, витамин Е (токофероли, токотриеноли), каротеноиди (α - и β -каротин, ликопен и ксантофили), а също и витамин D (105).

2.2 Метаболизъм и ключови ензими при трансформацията на есенциалните мастни киселини

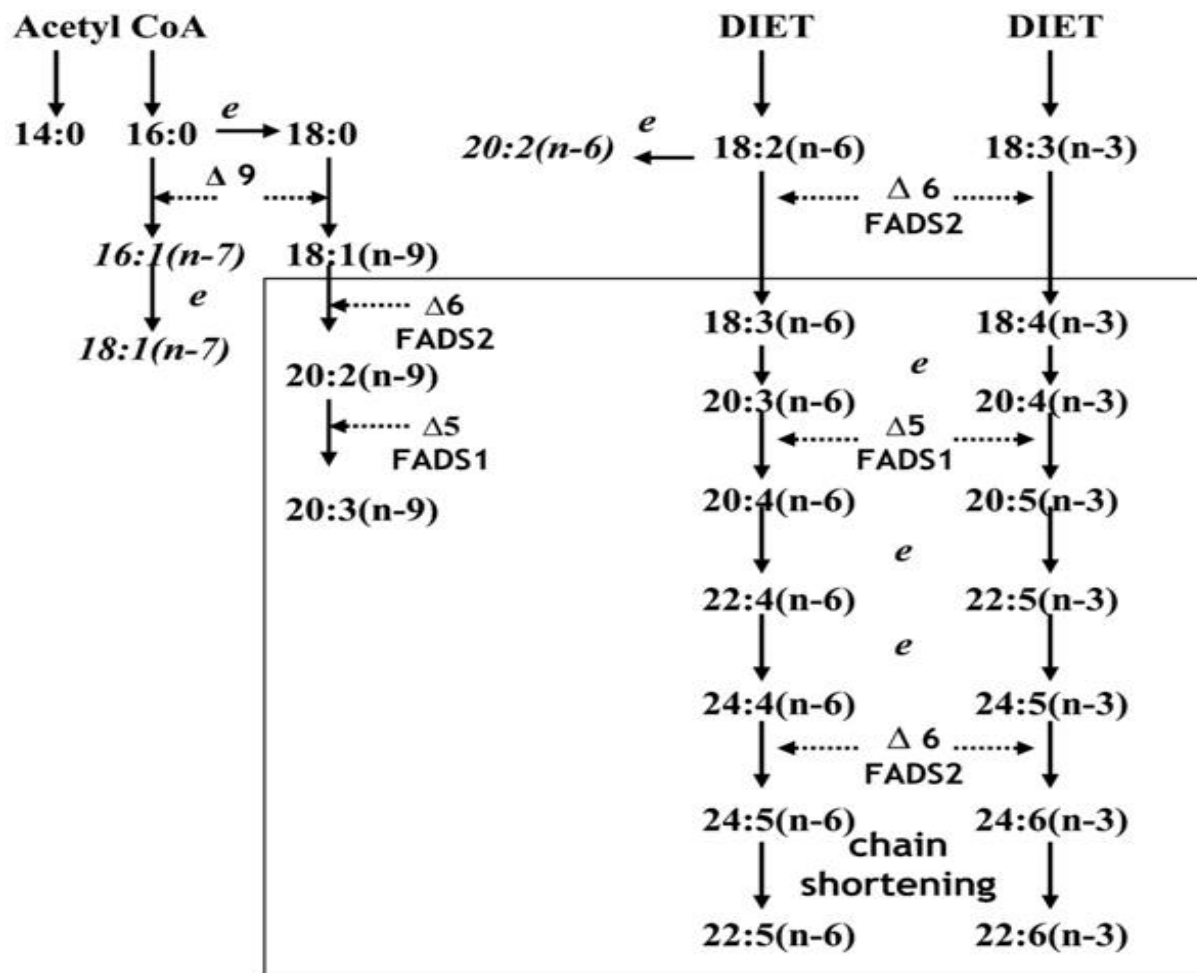
Съставът на полиненаситените мастни киселини (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) в тъканите на човешкото тяло е от огромно значение за здравословното състояние и зависи както от хранителния прием, така и от ендогенния метаболизъм на индивида. Обмяната на PUFAs се контролира от множество гени, като сред тях особено значение имат *FADS1* и *FADS2* (Fatty Acid Desaturases), кодиращи делта-5 и делта-6 десатуразите, основни ензими,

участващи в метаболизма на полиненаситените мастни киселини. Открити са около 500 единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), засягащи гените *FADS1* и *FADS2* като има все повече научни данни, че тези генни варианти трябва да се взимат под внимание, когато се определят хранителните потребности от полиненаситени мастни киселини (140). Ето защо един и същи прием на линолова киселина (LA) и алфа-линоленова киселина (ALA) може да доведе до различни здравни ефекти при различните индивиди. Разликите се дължат на генни вариации, които повлияват съответния метаболизъм и активността на ензимните, свързани с него. В научната литература има данни, че делта-5 и делта-6 десатуразите, повлияват серумните, плазмените и мембранните фосфолипидни нива на LA, ALA и дълговерижните полиненаситени мастни киселини (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, LC-PUFAs) по време на бремеността и периода на кърмене (103, 140). Също така се описва, че LC-PUFAs могат да повлияят върху коефициента на интелигентност (IQ) на детето (17, 109) или да повишат риска от исхемична болест на сърцето (ИБС) (104). В бъдеще проучванията относно биологичните ефекти на LA, ALA и LC-PUFAs и ефектите на различните генни варианти на *FADS1* и *FADS2* гените, трябва да се вземат под внимание, както за определяне на хранителните нужди от есенциални мастни киселини, така и за определяне на риск от появата на хронични заболявания (140).

Преди около 80 години Burr и Burr първи описват важността на линоловата (18:2 ω -6) и алфа-линоленовата киселини (18:3 ω -3) при възстановяване на негативните ефекти от диета, с ограничен прием намазнени при животни. Те въвеждат термина „есенциални мастни киселини“ (ЕМК). Резултатите на изследователския колектив сочат, че докато при животни хранени само с LA, като единствен източник на ЕМК, се постига подобряване

на кожата, успешен растеж, репродукция и лактация, то при бозайниците хранени само с ALA се регистрира растеж, но не се наблюдават възстановителни процеси на засегнатата от недостига на ЕМК кожа или пък по отношение на репродукцията (14).

В днешно време се знае, че LA и ALA са важни за здравето на човек. Двете семейства на омега-6 (LA) и омега-3 (ALA) са метаболитно и физиологично различни, не могат да се синтезират от човека и трябва да се набавят с храната. **Фигура 5** показва преобразуването на LA и ALA до LC-PUFAs с участието на серии от десатурази и елонгази.



Фигура 5. Десатурация и елонгация на *n*-3 и *n*-6 мастни киселини. Ензимите $\Delta 6$ и $\Delta 5$ десатурази са кодирани съответно от гените *FADS2* и *FADS1* (165)

Както единия така и другия метаболитен път използват тези ензими, като LA и ALA се конкурират за тяхната достъпност. Ключовите ензими делта-5 и делта-6 десатурази се кодират от гените *FADS1* и *FADS2* (22, 23). Десатуразите са лимитиращите скоростта ензими на реакциите на синтез на LC-PUFAs: арахидонова киселина (AA); ейкозапентаенова киселина (EPA); и докозахексаенова киселина (DHA); от техните хранителни прекурсори LA и ALA. AA и EPA са родителските мастни киселини при образуването на ейкозаноидите, а DHA за синтез на докозаноидите (140).

По време на човешката еволюция е имало баланс между прием на LA и ALA, като съотношението им е било ω -6: ω -3=1:1, докато в днешно време това съотношение е 16:1 и е изместено в полза на LA, поради висок прием на растителни масла - соево, царевично, слънчогледово, шафраново и масло от ленено семе, които са богати именно на омега-6 мастни киселини (141) (**Таблица 2**). Според съвременните разбирания оптималното съотношение в приема на омега-6 и омега-3 мастни киселини е 4:1 (172).

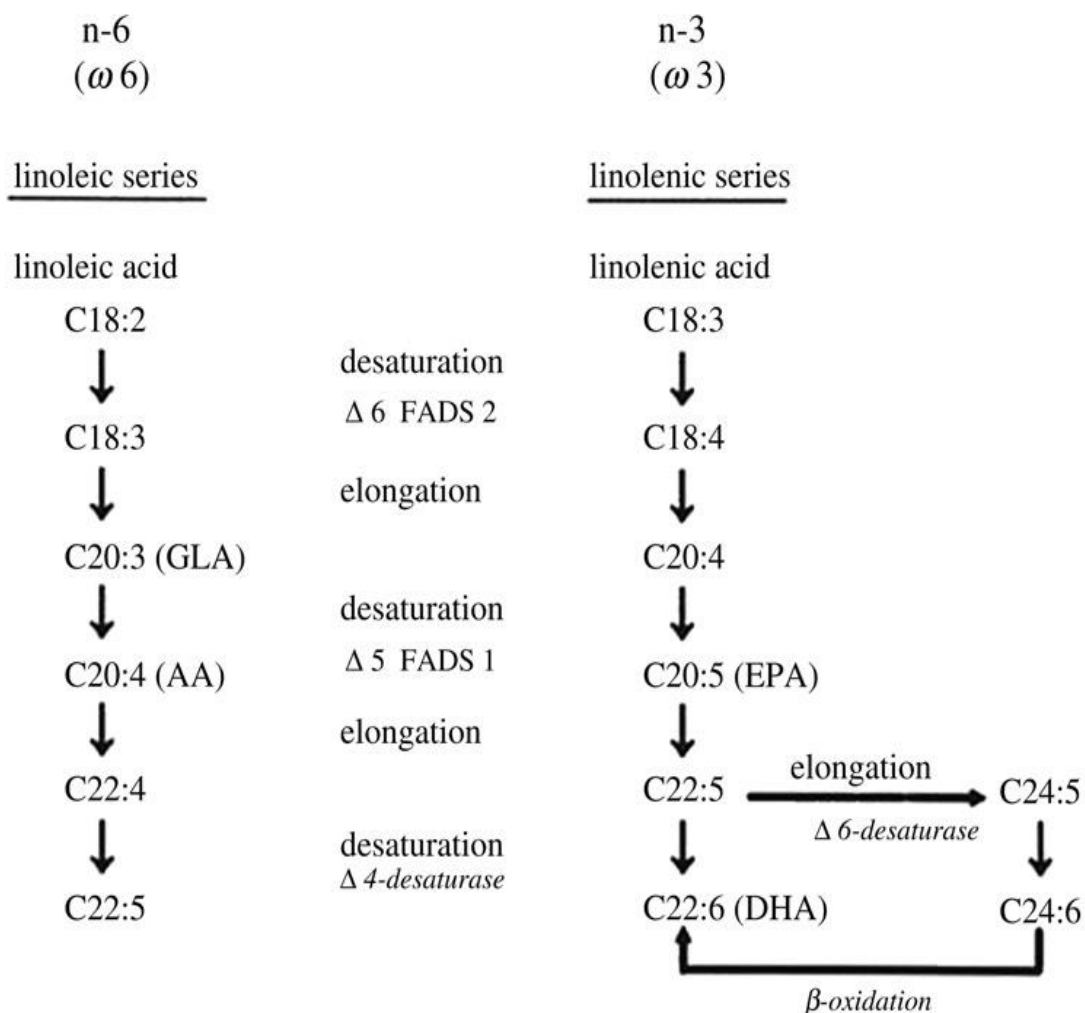
LA се намира в големи количества и в зърнените храни, с изключение на перила, рапица и орехи, които са богати на ALA. Също така, зелените листа, особено на дивите растения, са по-богати на ALA, отколкото на LA (141, 143, 145, 146).

Капацитетът за десатурация и удължаване на веригата на полиненаситените мастни киселини изглежда е лимитиран и променлив. В различни проучвания, в които са използвани маркирани с изотоп ALA, е изчислен диапазона на преобразуване на ALA в ейкозапентаенова киселина между 0.2% и 21% (13).

Таблица 2. Съдържание на омега-3 и омега-6 мастни киселини в някои хранителни продукт и тяхното съотношение (данните са взети от <https://nutritiondata.self.com/>)

Храна	Общо мазнини в 100 g.	Общо полиненаситени (g)	омега - 6 (mg)	омега – 3 (mg)	Съотношение омега-6/омега-3
Сьомга (дива, сурова)	6.3	2.5	172	2018	1/12
Скумрия (сурова)	13.9	3.3	219	2670	1/12
Херинга (сурова)	9.0	2.1	130	1729	1/13
Пъстърва (сурова)	6.6	1.5	175	1968	1/11
Скариди (морски дарове-сурови)	1.7	0.7	28	540	1/19
Яйца(кокоши, цели, сурови)	9.9	1.4	1148	74	16/1
Свинско месо (без сланина)	3.8	0.7	498	14	35/1
Телешко месо (без сланина, сурово)	14.8	1.0	824	52	16/1
Пилешко месо	5.9	1.5	1113	160	7/1
Краве мляко (3.25%)	3.3	0.2	120	75	1.6/1
Краве масло	55.1	2	1244	802	1.6/1
Палмово масло	100	9.3	9100	200	46/1
Кокосово масло	100	1.8	1800	0	-
Слънчогледово олио	100	29	28925	37	781/1
Зехтин	100	10.5	9763	761	13/1
Ленено олио	100	66.0	12701	53304	1/ 4.2
Соево олио	100	58.2	51288	6912	7.4/1
Орехово олио	100	63.3	52894	10401	5/1
Рапично олио	100	28.1	18645	9138	2/1
Авокадо	14.7	1.8	1689	110	15/1
Семена от чия	30.8	23.3	5785	17552	1/3
Спанак	0.4	0.2	26	138	1/ 5.3
Броколи	0.4	0.0	17	21	1/ 1.2

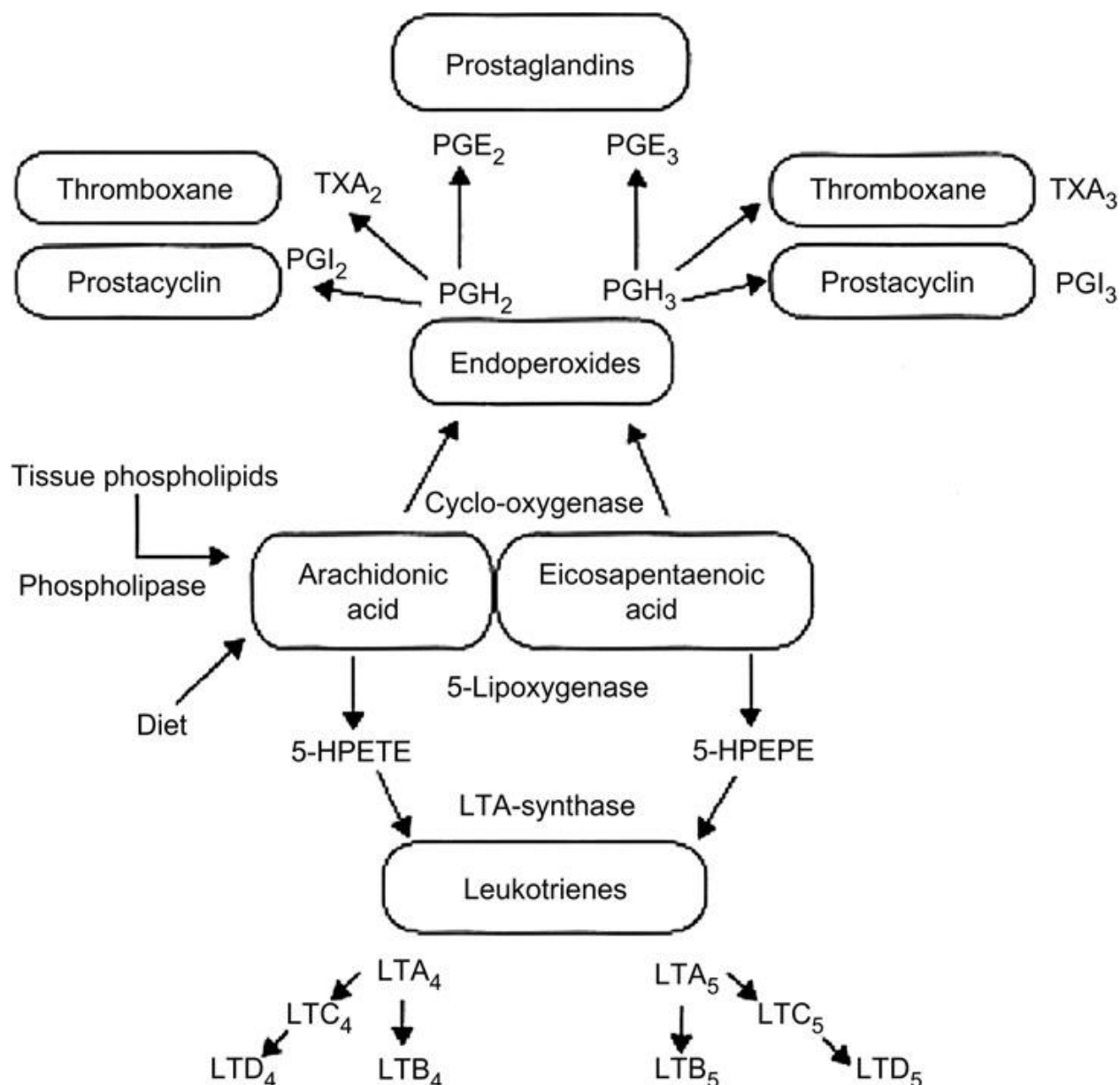
Плазмените нива на дълговерижните полиненаситени мастни киселини се определят както от хранителния прием, така и от ендогенния метаболизъм, като в човешкия организъм превръщането на PUFA в LC-PUFA се катализира от ензимите елонгази и десатурази (**Фиг. 6**) (140, 141, 145).



Фигура 6. Десатурация и елонгация на n-3 и n-6 мастни киселини. Конкуренция на двата метаболитни пътя, в зависимост от постъпващия с храната субстрат(140)

Съставът на полиненаситените мастни киселини, изграждащи фосфолипидите, се свързва с нормален растеж и развитие, както и с хронични неинфекциозни заболявания като исхемична болест на сърцето, хипертензия,

рак, артрит, алергии и автоимунни заболявания. Възможните патофизиологини механизми включват преобразуване както на омега-3, така и на омега-6 PUFAs в мощни промотери на ейкозаноидите, каквито са простагландините и левкотриените (112) (Фиг. 7).



Фигура 7. Окислителен метаболизъм на арахидонова киселина и ейкозапентаенова киселина от циклоксигеназния и 5-липооксигеназни метаболитни пътища (140)

5-HPETE: 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid;

5-HPEPE: 5-hydroxyeicosapentaenoic acid

Конкуренция между омега-3 и омега-6 мастните киселини се наблюдава и при синтеза на простагландини. Мастните киселини EPA и AA се конкурират помежду си за образуването на простагландини на ниво съответен ензим - циклооксигеназа и липооксигеназа (**Фиг. 7**) (105).

Когато хората консумират риба или рибено масло, EPA и DHA в състава им, водят до: 1) намалено производство на простагландин E_2 (PGE_2) метаболити; 2) намаляване образуването на тромбоксан A_2 , който е мощен тромбоцитен агрегатор и вазоконстриктор; 3) намаляване на формирането на левкотриен B_4 , индуктор на възпаление и мощен индуктор на левкоцитен хемотаксис и слепване; 4) увеличаване нивата на тромбоксан A_3 , който е слаб агрегатор на тромбоцитите и слаб вазоконстриктор; 5) увеличаване в количествата на простациклин PGI_3 , което води до цялостно нарастване на общия простациклин и като се покачва нивото на PG_3 без да се намали нивото на PGI_2 . Както PGI_2 така и PGI_3 са активни вазодилататори и инхибитори на агрегацията на тромбоцитите; 6) увеличаване в нивата на левкотриен B_5 , който е слаб индуктор на възпаление и слаб хемотактичен агент (122, 125).

Омега-3 мастните киселини модулират простагландиновия метаболизъм и съдействат за намаляване на триглицеридите, а във високи дози понижават холестерола и имат антитромботични и противовъзпалителни свойства. Тези ефекти са били широко проучвани (15, 91, 92, 157).

В ранна фаза на възпаление, големите количества интерлевкини и липидни медиатори които се освобождават играят решаваща роля за разгръщането на възпалителния процес. Провъзпалителните ейкозаноиди от AA метаболизъм се освобождават от мембранните фосфолипиди в хода на възпалително активиране. EPA се продуцира, за да се конкурира с AA за ензимния метаболизъм, предизвиквайки намалено производство на възпалителни и хемотаксични производни. AA участва в процесите на

растежа и произвежда PGE₂, което е от значение за нормалното развитие на много органи и клетки, включително за централната нервна система (64, 76, 81, 123).

Известно е, че провъзпалителните ейкозаноиди, получени от АА, допринасят за развитието на алергии (134, 168), сърдечно-съдови заболявания (43, 107) както и в процесите на онкогенеза (66).

ДНА се намира в големи количества в мембраните на мозъчните клетки и ретината и е от решаващо значение за правилната неврогенеза, невротрансмитерния метаболизъм, невропротекцията, както и при нормалното функциониране на зрението (136, 144).

2.3 Гени, участващи в метаболизма на омега-3 и омега-6 мастни киселини

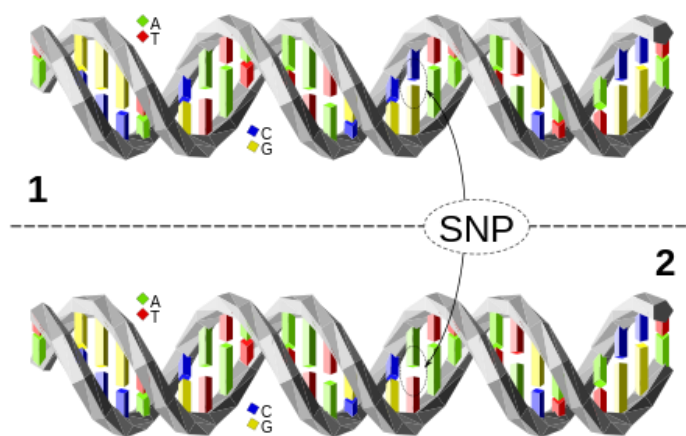
Обмяната на PUFAs се контролира от множество гени, като сред тях особено значение имат *FADS1* и *FADS2* (Fatty Acid Desaturases), кодиращи делта-5 и делта-6 десатуразите. Те са основни ензими, участващи в метаболизма на полиненаситените мастни киселини (22, 23).

Генният клъстер на *FADS1* и *FADS2* е полиморфен, както по отношение на ензимите, които участват в метаболитните пътища на LA и ALA, така и във връзка с ензимите, участващи в продуцирането на ейкозаноиди: 5-липоксигеназа (5-LO) и циклооксигеназа-2 (COX-2) от АА и ЕРА (35, 106, 114).

Единичен нуклеотиден полиморфизъм или просто нуклеотиден полиморфизъм, често съкратено като SNP (Single Nucleotide Polymorphism) е вариация в един нуклеотид, която може да възникне на определена позиция в генома, а всеки от геномните варианти присъства в някаква значителна степен

в рамките на дадена популация (например при повече от 1% от популационната група) (84).

На определена базова позиция, например, в човешкия геном на повечето индивиди, може да се намира нуклеотид цитозин - C, но в някои случаи, доста по-рядко, на тази позиция може да има нуклеотидът аденин – A. Така на тази специфична базова позиция се наблюдава SNP, а двете възможни нуклеотидни вариации - C или A се наричат алели за тази базова позиция (**Фиг. 8**). Въпреки че в този пример, както и в повечето SNPs, които са открити досега има само два различни алели, има и н.тар триалелни SNPs, в който три различни базови варианти могат да съществуват съвместно в рамките на популацията (84).



Фигура 8. Горната ДНК молекула се различава от долната само по локацията на една единствена базова двойка нуклеотиди (C/A полиморфизъм)

Еднонуклеотидните полиморфизми (SNPs) са главните компоненти на генетичната вариабилност и съставляват молекулна база на фенотипната вариабилност (84). Съществуват над 10 милиона SNP в човешкия геном, но само малък процент сред тях водят до функционален ефект. Разпределението по честота показва: че някои SNP се намират в между 5% до над 50% от

човешката популация; около 7 милиона SNPs с ниска степен на алелна честота се откриват в поне 5%; а други 4 милиона SNPs – сред 1 до 5% от популацията; огромен брой редки еднонуклеотидни варианти съществуват само в отделни индивиди (169). Повечето хора са хетерозиготни за поне или повече от 50 000 SNPs от техния геном (69, 171).

Различия, които се проявяват между хората, при проявата на редица заболявания е възможно да са обусловени от разлики в SNPs. Широк спектър от човешки заболявания, например сърповидно-клетъчна анемия, β -таласемия и кистозна фиброза са резултат от SNPs на строго специфични позиции в двойноверижната ДНК молекула (19, 65, 75). Тежестта на дадено заболяване и начина, по който тялото ни реагира на лечение може също да са прояви на генетични вариации. Например, има проучвания, които показват, че една базова мутация в ген ApoE (ген за аполипопротеин E) се асоциира с повишен риск от развитие на болестта на Алцхаймер (163).

Единичните нуклеотидни полиморфизми все по-често се свързват като отговорни за степента на усвояване на важни микронутриенти и така се очертава тяхна потенциална роля в индивидуалния метаболизъм на човек. Тези взаимовръзки между хранене и нутриенти от една страна и генетичните варианти на всеки отделен индивид са обект на науките нутригенетика и нутригеномика.

2.4 Нутригенетика и нутригеномика - бързоразвиващи се интердисциплинарни науки

Нутригенетиката и нутригеномиката са сравнително млади науки от областта на нутрициологията, които обаче се развиват бурно и носят впечатляваща информация за взаимодействието между хранене и гени. Нутригеномиката е наука за начина, по който храните повлияват на гените

ни, а нутригенетиката за това как индивидуалните генетични разлики (SNPs) могат да въздействат върху начина, по който реагираме към нутриентите (и към други естествени съединения или дори токсини), които си набавяме, хранейки се (51). Основната теория на тези науки се основава на предположението, че съществуват индивидуални разлики в отговора към остри или повтарящи се експозиции на даден нутриент или комбинация от нутриенти в даден момент. В хода на човешката история диетата доста е повлиява експресията на някои гени, което е довело до фенотипове, които са в състояние успешно да отговарят на предизвикателствата на околната среда, а това от своя страна позволява по-добра експлоатация на хранителни ресурси. Тези адаптации са били ключови за човека и неговото развитие и растеж (10).

Концептуалната основа на тази нова разновидност на геномните изследвания може да бъде обобщена от следните пет принципа на нутригеномиката (*Copyright 2012, The NCMHD Center of Excellence for Nutritional Genomics*):

- При определени обстоятелства и при някои хора, режимът на хранене е сериозен рисков фактор за много заболявания.
- Често срещани нутриенти или химикали в храната могат да оказват пряко и косвено влияние върху човешкия геном и да променят проявленията и структурата на гените.
- Степента, в която диетата оказва влияние върху здравословното състояние на даден човек, може да зависи от генома му, в това число наличните SNPs.
- Някои гени, имащи отношение към хранителния прием вероятно оказват влияние при развитието и/или върху сериозността на хроничните заболявания.

- Намеса в хранителния режим, основана на знание за хранителните нужди, хранителния статус и генотипа (т.е. „персонализиран режим на хранене“) може да се използва с цел превенция, облекчаване и лечение на хронични заболявания.

Доста внимание се отдели на нутригеномиката в последно време, поради потенциала да се предотвратяват, облекчават и третират хронични заболявания и определени състояния чрез леки, но силно персонализирани промени в начина на хранене. Всичко това се случва благодарение на бързото напредване на технологиите в областта на молекулярната биология и генетиката, които дават възможност да се изучават не само отделни гени, но и цялата геномна последователност, наред с различни мутации, полиморфизми и дори транскрипти (транскриптомика) и метаболите (метабономика). Всичко това дава възможността за интегриране на биологичната индивидуалност и общовалидните хранителни препоръки, като така се открива сериозен превантивен и терапевтичен потенциал. Нутригенетиката се фокусира върху потенциалните ефекти на единични нуклеотидни полиморфизми, вариабилни повтори, епигенетични маркери и други геномни маркери върху биологичните и поведенчески реакции на индивида към микронутриенти, макронутриенти, хормони и калории. Големия обем информация, който може да се получи в хода на нутригенетичното изследване и способността да се борави с тази информация е едно от сериозните предизвикателства, с които се сблъскват изследователите в тази област и представлява спънка към успешното интегриране и приложение на това огромно знание. Усилията на учени, генетици, биоинформатици, молекулярни биолози и нутриционисти са насочени към овладяване на този огромен поток от информация и превръщането му в достъпен инструмент за персонализирано хранене.

Нутригеномиката и нутригенетиката се стремят към превенция и персонална медицина и хранене, базирани на разбирането за нуждите ни от нутриенти, хранителния и здравния ни статус и генотипа ни. Знанията, придобити чрез наблюдение на взаимодействието между гените и начина на хранене при различните народности могат да предоставят информация, необходима за справяне с по-глобални проблеми като недोхранване и множество социално значими заболявания. Изграждането на „Нутрициологична фенотипна база данни“ и подържането ѝ от Международната организация по нутригеномика ще позволи персонализиран подход въз основа на индивидуалния генотип (171).

2.5 Нутригенетика и нутригеномика - поглед в миналото

Нутригенетиката изследва наследствени разлики в метаболизма на хранителни вещества и насочва как да се използва тази индивидуална генетична информация за по-добри хранителни избори. Развитието на науката и практиката на нутригенетиката е започнало още в началото на 1900-те години. Тогава нарастващия брой на успешните нутригенетичните интервенции оставят малко съмнение, че коригирането на персоналните хранителни навици спрямо наследената предразположеност могат значително да подобрят здравния статус на много хора (84).

Науката за нутригенетиката може да бъде проследена назад във времето до 1908 г. и първите описания на Archibald Garrod на вродени грешки на метаболизма - състояния, които са били дефинирани тогава като генетични нарушения на хранителния метаболизъм (84). Новите натрупани биохимични знания бавно довеждат до успешната практика на лечение на някои от тези метаболитни заболявания чрез подходящи хранителни интервенции. Например откритието на Asbjørn Følling през 1934 г., който показва, че

дефектен метаболизъм на аминокиселината фенилаланин причинява тежко умствено увреждане (24). В последствие Horst Bickel- немски доктор, заедно с Evelyn Nickmans и John Gerrard през 1953 г демонстрират диетична интервенция, която се оказва доста ефективна при това генетично обусловено метаболитно състояние, известно днес като фенилкетонурия (PKU) (7). В много страни днес рутинно се провежда постнатален скрийнинг на всички новородените за прояви в този дефект на метаболизма, което от своя страна позволява ранно предотвратяване на тежки последици от това заболяване чрез хранителни промени на засегнатите деца в рамките на дни след раждането (84, 129).

Цъолиакията (глутенова ентеропатия) е подобно генетично състояние, при което са възможни редица хранителни корекции, като например избягване на храни и продукти, съдържащи глутен (177). Заболявания като цъолиакията и фенилкетонурията са накарали изследователите да забележат и друг интересен факт освен генетичната обусловеност, а това е фактът, че модифицираните генни варианти могат да бъдат относително чести. Днес е все по-трудно се пренебрегне факта, че всеки от нас се ражда с генетични уязвимост, която може да се развие и прояви като сериозно заболяване, в следствие на неадекватни хранителни навици и фактори. Около един от 200 европейци имат висок генетичен риск от прекомерно съхранение на желязо, дължащо се на присъствието на поне две копия на варианти на ген, отговарящ за натрупване на желязо. Друг много често срещан генетичен вариант засяга метаболизма на фолиева киселина. Известно е, че носителките на генетичен вариант на кодиращия ген MTHFR 677T имат потенциално повишен риск от раждане на дете с тежко увреждане поради дефект на невралната тръба, поради нарушение в работата на ензима метилентетрахидрофолат редуктаза.

Голяма част от този риск може да се избегне с адекватен прием на фолиева киселина от началото на бременността (154).

Понастоящем вече е известно, че хранителните модели с високи съотношения на наситени към ненаситените мастни киселини насърчават затлъстяването при много от хората с генетичен вариант на APOA2 промоторния ген, обуславящ понижена функция, но обикновено не и при хора без този генетичен маркер (84).

Генетична вариация с въздействие върху ефективността на метаболизма на кофеина може да илюстрира практическото значение на нутригенетичните взаимодействия. Кофеинът е естествена съставка на различни традиционни напитки. Няколко чаши кафе или други напитки с високо съдържание на кофеин увеличават риска от инфаркт с 50% при възрастните, които са бавни метаболитатори, но рискът за бързите метаболитатори е незначителен (33). Подобен пример е непоносимостта към лактоза. Липсата на чревна лактаза и в резултат на това, невъзможността да се усвои захарта в млякото е норма в повечето не европейски популации от възрастни хора. Несъответствието между наследената предразположеност и преобладаващата култура на хранене причинява дискомфорт при много възрастни и евентуално води до състояние наречено синдром на раздразнените черва, поради неразпознат дефицит на лактаза.

Всички тези примери демонстрират как генетичните варианти в даден ген, които сме наследили, определят евентуални рискове за здравето, особено ако са съчетани с определени фактори (в случая хранителни) на средата, които провокират дисбаланси в дадени метаболитни пътища. Чрез малки промени в навиците и хранителните избори, които всеки ден правим, можем да модифицираме негативната реакция на организма и да намалим значително риска от нежелани здравни състояния.

2.6 Нутригенетични взаимодействия свързани с метаболизма на есенциалните мастни киселини

Голям обем данни от областта на нутригенетиката се натрупват с голяма интензивност през последните години като недвусмислено се показва връзка между единични нуклеотидни полиморфизми в *FADS1* и *FADS2* гените, и метаболизма на мастните киселини, респективно и в нивата на мастните компоненти в кръвната плазма, както и в клетъчните стени на червените кръвни клетки, а също и в други телесни течности (кърма) и органи (например ретина). Отклоненията от нормата на тези маркери нерядко може да предшества появата и развитието на голям брой социално значими заболявания като например атеросклероза, сърдечно съдови инциденти, екземи, инсулинова резистентност и диабет тип 2, хронично общо възпаление и възпаление на конкретни органи и т.н.(6, 70, 158, 167).

Проучвания от последните години касаещи тези полиморфизми сочат, че редките алелни варианти на *FADS1* и *FADS2* гените се асоциират с повишени нива на LA и понижени нива на AA в мембраните на червени кръвни клетки (red blood cells, RBC) и плазмените фосфолипиди, което от своя страна може да доведе до необходимост от преизчисляване на хранителните нужди (85, 134), специално в периода на бременност и кърмене (86). Някои проучвания дори показват връзка с и влияние върху определяният коефициента на интелигентност при малките деца (17). Обратно, когато активността на десатуразите е засилена, това повишава съотношението AA:LA и свързания с това риск от исхемична болест на сърцето (107).

Значението на ефектите от генетичните вариации са обширно проучени и прилагани от фармаколозите при разработката на нови лекарствени форми и при оценка на метаболизирането на лекарството и страничните ефекти от него (45, 56, 57, 164). В последните години лекари, генетици и нутриционисти

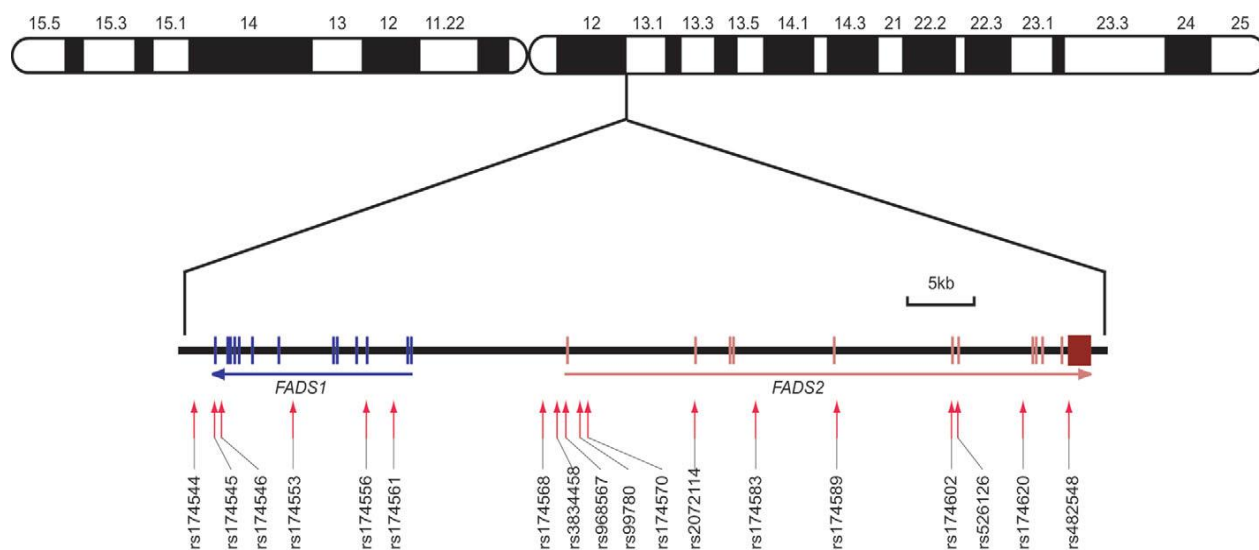
насочват усилията си към изучаването на ефектите, които произтичат от различните генетични варианти и на взаимодействията ген-нутриент върху детерминирането на хранителните (диетичните) нужди и справянето с хроничните неинфекциозни заболявания (147).

2.7 Генетични варианти на *FADS1* и *FADS2* гени при определянето на хранителните нужди от омега-3 и омега-6 мастни киселини

Нивата на LC-PUFAs в серум и в мембранните фосфолипиди на червените кръвни клетки зависи от една страна от хранителния прием, а от друга от ендогенния метаболизъм (**Фиг. 6**). Има много индикатори за значителни вариации между индивидите, касаещи ендогенното производство на LC-PUFAs. Например, преди близо 30 години *Koletzko и съмп.* (86) провеждат експеримент и показват, че има доста близко съотношение между съдържанието на омега-6 и омега-3 мастни киселини в млякото на някои жени кърмачки, въпреки че основните хранителни източници на тези жени били различни. Авторите, изказват хипотеза, че определени жени имат по-добра способност да синтезират и секретират LC-PUFAs в майчино мляко, както от омега-6, така и от омега-3 мастните киселини, независимо от екзогенния прием на тези макронутриенти.

Guerra и съмп. по-късно демонстрират промените в плазмените нива на LC-PUFAs в отсъствие на промени в схемата на хранителния прием на мазнини, което предполага съществуването на индивидуални вариации по отношение на ендогенния синтез на LC-PUFAs сред деца, които се задържат във времето и които най-вероятно се дължат на генетично предопределени различия в индивидуалния метаболизъм (63). Промени при преобразуване на полиненаситените мастни киселини са били показани и чрез проучвания използващи различни стабилни изотопи (36, 37).

Както вече беше споменато, основните ензими при метаболизма на омега-6 и омега-3 мастните киселини са делта-5 и делта-6 десатуразите, които са кодирани съответно от гените *FADS1* и *FADS2*. Те са локализирани близо един до друг в т. нар. десатуразния генен клъстер на хромозома 11 (11q12-13.1), като са разделени от регион от 11 kb (Фиг. 9). Този клъстер съдържа в себе си също и гена *FADS3*, при когото се определя 52% секвенционна идентичност с *FADS1* гена, както и 62% идентичност с *FADS2* гена. Засега обаче точните функции транслираните продукти от *FADS3* гена не са изяснени. В същият клъстер се намират и цитохром b5 домейн, както и гени, кодиращи някои мембранни елементи (106). Тъй като и трите *FADS* гени имат 12 екзона, 11 интрона и споделят обща локация в човешката хромозома 11, се счита че те са произлезли еволюционно при дупликация на един ген, а във времето са се специализирали и оформили като отделни гени (114).



Фигура 9. Хромозома 11- отбелязан е десатуразния генен клъстер с *FADS1* и *FADS2* гените

Shaeffer и колектив (134) първи докладват за връзка между полиморфизми във FADS1/FADS2 и различни нива на омега-6 и омега-3 мастни киселини като част от серумните фосфолипиди. Съставът на мастните киселини в серумните фосфолипиди има особено важна роля в клетъчните процеси и се свързва с етиологията на някои комплексни заболявания при хората.

Shaeffer и колектив генотипират осемнадесет полиморфизми, намиращи се в този генен клъстер при 727 човека. Този клъстер е локализиран на хромозома 11q12-11q13.1, регион който неведнъж е асоцииран с atopичен дерматит (atopy) и други комплексни заболявания. Полиморфизмите и статистически реконструирани хаплотипове на *FADS1* и някои региони на *FADS2* са показали най-силна асоциация с нивата на непосредствения прекурсор на възпалителните ейкозаноиди, арахидоновата киселина (C20:4 n-6), както и силна връзка с нивата на други n-6 мастни киселини - C18:2n-6, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C22:4n-6 и някои n-3 мастни киселини - C18:3n-3, C20:5n-3 and C22:5n-3 ($P < 1.0 \times 10^{-13}$). Сред носителите на редките алели на някои SNPs и съответните им хаплотипове се наблюдавало по-ниско преобладаване на алергичен ринит и atopична екзема. Не била намерена връзка между нивата на общите и специфични IgE антитела (134).

Shaeffer и колектив недвусмислено демонстрират, че мастно киселинният състав на серумните фосфолипиди е генетично контролиран от FADS1 и FADS2 генен клъстер. Проучените полиморфизми в този клъстер обясняват 28% от отклонението от AA и до 12% от прекурсорните мастни киселини. Честотата на минорния алел бил около 26%. Може да се заключи, че генетичните варианти индикират различия в преобразуването на омега-6 и омега-3 мастни киселини, катализирани от делта-5 и делта-6 десатуразите. Това от своя страна предполага, че различните индивиди се нуждаят от

различни количества полиненаситени и дълговерижни полиненаситени мастни киселини, за да постигнат сравними биологични ефекти. По-нанатъшните изследвания на тези корелации би трябвало да включват генотипиране на FADS1 и FADS2 полиморфизмите, за по-прецизно изясняване на биологичната роля на тези полиморфизми (134).

В проучване от 2012 година *Hellstrand* и колектив изследват взаимодействието между различния прием на PUFAs и полиморфизма във *FADS1* гена *rs174547* (T>C) върху концентрациите на липидите и липопротеините в кръвта на гладно (68). В проучването са включени 4635 индивида (60% жени, във възрастова група 45-68 години) от проучване на шведската популация в т.нар. Malmö Diet and Cancer кохорта. Хранителният прием е оценяван чрез модифициран метод за проследяване на храненето, включващ 7-дневна регистрация на готвени ястия. С-алелът на *rs174547* е асоцииран с по-ниска концентрация на LDL (P=0.03) и се наблюдава статистически значима връзка между различните варианти на *rs174547* и LDL при прием на дълго-верижни ω -3 PUFA (P=0.01); С-алелът се свързва с по-ниски нива на LDL, само сред индивидите, от най-ниския тертил от групата, приемаща дълговерижни ω -3 PUFA (P<0.001). В допълнение, е наблюдавана значителна асоциация между варианти на *rs174547* и съотношението на приема на ALA и LA върху нивата на HDL (P=0.03). Не се установява обаче, значима връзка между С-алела и HDL и съотношението на прием на ALA и LA. Според колектива, получените резултати показват, че нивата на хранителен прием на различните PUFAs модифицират асоциирания ефект на генетичните вариации в FADS върху LDL и HDL.

В проучване от 2014 година, проведено в департамента по Здравеопазване и хранителни науки на Университета в Гелф, Онтарио, Канада се показва връзката между прием и усвояване на омега-3 мастните

киселини и определени *FADS1* и *FADS2* генни варианти, а оттам и ефекта върху нивата на биомаркери, характеризиращи сърдечно-съдовото здраве (130). *Roke* и *Mutch* проучват влиянието което умерени дози от ЕРА и ДНА, в хранителна добавка от рибено масло, упражняват върху кардиометаболитните маркери, FA нива в серум и червени кръвни клетки, както и дали евентуалните промени на тези нива се асоциират с определени единични нуклеотидни полиморфизми в *FADS1* и *FADS2* гените. Според получените резултати се изказва предположение, че дадени единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в гените, кодиращи десатуразите, които участват в метаболитните пътища на полиненаситените мастни киселини, може да повлияват индивидуалния отговор към омега-3 мастните киселини. В това проучване младежи били суплементирани с хранителни добавки от рибено масло (1.8 g. общо ЕРА/ДНА на ден) в продължение на 12 седмици, последвано от 8-седмичен период на изчистване. Мастно-киселинните профили в серума и червените кръвни клетки били анализирани на всеки две седмици чрез газова хроматография. Генотипирани са два SNP: *rs174537* във *FADS1* и *rs174576* във *FADS2*. Резултатите показали, статистически знаимо понижение в нивата на триглицериди в кръвта (-13%) и глюкоза (-11%) до 12-та седмица при участниците, въпреки че тези ползи били загубени след периода на изчистване. Нивата на ЕРА и ДНА се повишили осезаемо в серум (+250% и +51%, съответно) и червените кръвни клетки (+132% и +18%, съответно) по време на първите две седмици на суплементиране и се запазили така през целия 12-седмичен период. Само нивата на ЕРА и ДНА в червените кръвни клетки (но не и в серума) останали значително повишени (+37% и +24%, съответно) след периода на изчистване. Носителите на редкия алелен вариант и за двата полиморфизма показали по-голямо повишаване на нивата на ЕРА в червените кръвни клетки по време на приема на рибеното масло,

което предполага, че генетичните варианти в този локус могат да окажат влияние върху индивидуалната реакция на метаболизма към постъпване на омега-3 мастни киселини с храната и/или при суплементиране (130).

Проучването показало от една страна, че суплементирането с омега-3 МК (1.8 g EPA/DHA на ден) осезаемо променя нивата на циркулиращите мастни киселини, триглицеридите, кръвната глюкоза и кардиометаболитните маркери при младежи на възраст от 18 до 25 години. От друга страна става ясно, че генотипът може да е потенциален модулатор на индивидуалния отговор към приема на добавки от рибено масло, най-вече отнасящо се до нивата на EPA.

Експериментално получената информация за биологичните ефекти върху кардиометаболитните маркери при суплементиране с омега-3 мастни киселини и натрупващите се данни за индивидуалните *FADS1* и *FADS 2* генотипове, може да е от особено значение за развитието на персонализирани стратегии за подобряване на здравословното състояние на индивида в дългосрочен план.

2.8 Генетични варианти във *FADS* гените и тяхната роля за развитие на различни заболявания при хората

Промените в липидния метаболизъм характеризират много от хроничните болести, които понастоящем са едни от водещите световни проблеми в здравеопазването, като например затлъстяване, диабет тип 2 и сърдечно-съдовите заболявания (93, 162, 168). Липидите представляват фундаментално важна група от различни метаболити, с критична структурна и функционална роля в човешкия организъм. Показано е, че много от различните липидни структури са ключов елемент в такива разнообразни биологични процеси като сигнална трансдукция, транспорт на вещества през

клетъчните мембрани и пропускливост, морфогенеза и пролиферация (96, 101, 149). Въпреки че остава неясно дали смущенията в липидния метаболизъм са причина за или следствие от развитието на хронично заболяване, модифицирането на липидните нива чрез медицински интервенции и/или промяна в начина на живот остават основна цел на здравеопазването.

Рисковите факторите произтичащи от начина на живот обикновено се считат за модифицируеми рискове за развитие на заболяване и включват висок индекс на телесна маса (ИТМ), ниска или никаква физическа активност, тютюнопушене, употребата на алкохол и нездравословните хранителни навици (11, 38, 77, 135). Докато учените признават, че всеки от тези рискови фактори на живот играе важна роля в развитието на хронични заболявания, все по-голямо значение се отдава на връзката между хранене и здраве. Всъщност връзки между количеството и вида на консумираните мазнини и различни болестни състояния, са описани отдавна при различни популационно-обсервационни проучвания (12, 44, 53, 82). Тези изследвания свързват диети с високо съдържание на наситени мазнини, рафинирани захари и високомаслени млечни продукти с по-висока честота на атеросклероза, сърдечно-съдови заболявания, метаболитен синдром, рак и автоимунни заболявания. Този начин на хранене, обикновено познат като западната диета, често се характеризира с определен хранителен състав на мазнините - обогатен с наситени мазнини (SFAs) и n-6 полиненаситени мастни киселини (PUFAs) и бедни на n-3 PUFA (30, 142). За разлика от т. нар. Средиземноморската диета, която подтиква към консумация на плодове, зеленчуци, пълнозърнести храни, вино и птици, което води до по-висок прием на мастни киселини като n-3 PUFAs и мононенаситени мастни киселини (MUFAs). Тези мастни киселини рутинно се свързват с намалени рискове от

заболяване на коронарните артерии, хипертония, диабет тип 2, артрит, възпаление и автоимунни заболявания (135, 162). Въпреки, че лошите хранителни навици могат сами по себе си да бъдат пагубни за здравето, многобройните взаимодействия между нутриентите и гените могат допълнително да модулират индивидуалния риск за развитие на заболяване (89). Детерминантите на плазмените липиди са мултифакторни; обаче остава неясно до каква степен генетичната вариабилност допринася за разлики, наблюдавани в плазмените липидни профили между различните индивиди. Идентифициране на тези генни варианти, които могат да модулират нивата на липидите са от решаващо значение за нашето разбиране за развитието на заболяване и тежестта, с която то протича. Докато молекулярните пътища, лежащи в основата на липидния метаболизъм, са многобройни и сложни, е доказано, че десатуразите на мастни киселини играят ключова роля при определянето на профилите както на плазмените, така и на тъканните мастни киселини. Нещо повече, нови доказателства показват, че вариации в гените на десатуразата на мастни киселини може да модифицират метаболизма на липидите в цялото тяло. Ето защо изучаването на това, доколко генетичните варианти, заедно с хранителните навици могат да повлияят регулацията на активността на десатуразните ензими, може да доведе до по-добро разбиране как тези фактори медиират предразположеността към различни заболявания.

След като *Schaeffer и колектив* през 2006 г. недвусмислено показват връзката между наличието на определени генетичните варианти във *FADS1* и *FADS2* и състава на мастните киселини в серумните фосфолипиди (134), авторите изказват предположение, че това би се отразило и върху имунологичния статус, като сред индивидите носещи минорните алели би се наблюдавало значително по-ниска честота на заболявания с имунна

патогенеза като например атопичен дерматит и алергичен ринит, в резултат от значително понижените нива на арахидонова киселина (AA).

Последващо проучване потвърждава тези асоциации в независима група, съставена от 535 участници в Баварско проучване от 2009 година (Bavarian Nutrition Survey II (BVS-II) (132). *Rzehak и колеги* извършват анализ на експерименти определящи определени хаплотипове и мастнокиселинния състав в мембраните на серумните фосфолипиди и мембраните на червените кръвни клетки (RBC). Резултатите потвърждават, че минорните алелни хаплотипове са значително свързани с промени в състава на мастните киселини, като намалени нива на арахидонова киселина в циркулиращите серумни фосфолипиди. Освен това е установено, че минорните хаплотипове на алели влияят върху мастно-киселинния състав на клетъчно ниво, което е видно от изменения в състава на мастните киселини в мембраната на червените кръвни клетки.

Други две проучвания оценяват състава на мастните киселини в серумните фосфолипиди и мембрани на RBC с цел измерване съответно на краткотрайни преходни изменения и дългосрочни хронични модификации в мастно-киселинния статус. *Malerba* и колегите му изследват връзката между генните варианти на *FADS* и състав на мастни киселини при 658 пациенти със сърдечно-съдови заболявания, включени във Verona Heart Project (104). Това проучване разкрива, че хомозиготни и хетерозиготни носители на различни второстепенни (минорни) алели имат профил на мастните киселини, характеризиращ се със значително по-ниски нива на арахидонова киселина както в серумните фосфолипиди, така и в еритроцитните мембрани. Подобни изводи са направени и в две други, независими едно от друго проучвания (132, 134). След няколко тестови корекции обаче, значимостта намалява, и единствената значима асоциация, която остава, е тази на конструиран

хаплотип в рамките на *FADS* клъстера и нивата на АА в серума и мембраните на червените кръвни клетки (104).

Martinelli и сътрудници, изследвали същите SNPs, използвани в предишното проучване, като обаче включват асоциативен анализ между генните варианти във *FADS* и коронарната болест на сърцето (КБС), както и десатуразната активност в мембраните на червените кръвни клетки при 610 доброволци с КБС и 266 доброволци без това заболяване, участвали в гореспоменатия Verona Heart Project (107). Почти всички SNPs, изследвани в клъстера на *FADS*, са били свързани с десатуразните съотношения за АА/LA и ЕРА/АLА, но нито един вариант не бил свързан значително с наличието или отсъствието на коронарна болест на сърцето. Въпреки това, хаплотиповете с по-голям брой рискови алели са били по-чести при пациенти с КБС, отколкото при индивиди, без това състояние, както и че са свързани с по-високо съотношение на десатурация (АА/LA) и повишение в нивата на С-реактивния протеин с висока чувствителност (hs-CRP), който е маркер за възпалителен процес. Регресионните анализи, адаптирани за многократно тестване, са показали, че съотношението АА/LA наистина е значителен предиктор на КБС. Авторите стигат до заключението, че индивидуалните полиморфизми във *FADS1* и *FADS2* имат малък или никакъв ефект върху риска от КБС. Въпреки това, адитивният модел на рисковите алели, който съответства на по-висока десатуразна активност, е по-чест при пациенти с КБС и показва значителна предразположеност към развитие на КБС (107).

Повечето от споменатите досега проучвания са фокусирани върху анализ на влиянието на генетичните вариации във *FADS* клъстера при възрастни хора. Интересно е, обаче да се изследват тези взаимовръзки при по-млади индивиди. Това осигурява алтернативна перспектива и различна гледна точка за разбиране как генетичната вариация засяга липидния метаболизъм.

Юношите като цяло са изложени на по-малко въздействия на факторите на околната среда във времето, отколкото възрастните, като по този начин влиянието на генетичния състав върху фенотипната изява в рамките на индивидуалната фенотипна променливост е по-пряка в юношеска кохорта, отколкото при зрели индивиди. *Bokor et al.* разглеждат връзката между *FADS* SNPs, плазмени мастни киселини, триглицериди и десатуразна активност в кохорта от европейски младежи (9). Резултатите разкриват подобни връзки с тези, открити при възрастни, където са наблюдавани значителни асоциации между минорните алели на няколко *FADS* SNPs и различни мастни киселини, триглицериди и D6D и D5D активност в плазмата. В съгласие с предишни проучвания при възрастни, значимото увеличаване на LA и намаляване на AA и активността на D5D в плазмата се свързва с минорните алели във *FADS* клъстера. Нещо повече, наблюдаваните асоциации са с голяма сигнификантност, което може да се дължи на липсата на допълнителни фактори при младежите, маскиращи ефектите на генетичната променливост върху фенотипа. Необходими са обаче допълнителни проучвания за изясняване на пълното въздействие на тези генетични ефекти. Данните показват, че изучаването на младите кохорти ще бъде от изключителна важност за предоставяне на допълнителна информация в тази насока.

Интерес буди изследването на *Norris* и колектив, които разглеждат връзката между нивата на докозапентаеновата киселина в мембраните на еритроцитите, генетични варианти във *FADS1* и *FADS2* гените и автоиммунният отговор към панкреасните островни клетки при деца с диабет тип 1 (118). Авторите докладват в предишни проучвания, че по-ниският прием на n-3 мастни киселини и нивата в мембраните на еритроцитите са свързани с повишен риск от автоимунни реакция към панкреасните островни клетки и развитие на заболяване (Islet Autoimmunity, IA), но не и с прогресия

до диабет тип 1 при деца с повишен риск от диабет. Те предполагат, че ниския прием на специфични n-3 мастни киселини и генетични маркери допринасят синергично за този повишен риск от IA в изследването DAISY (Diabetes Autoimmunity Study in the Young) (118).

В проучването DAISY са проследени 2547 деца с повишен риск от диабет тип 1, по отношение на поява и развитието на IA, дефинирани като положителни за антитела срещу глутамат декарбоксилаза (GAD-65), IA-2 или инсулинови автоантитела при две последователни посещения при лекаря. Използвайки кохортен дизайн на проучването, са измерени проспективно мастните киселини на еритроцитните мембрани и хранителният прием при 58 IA-положителни деца и 299 IA-отрицателни деца. Резултатите показват, че ниските нива на докозапентаеновата киселина (DPA) в мембраната на еритроцита, са предсказващи IA (HR 0.23; 95% CI 0.09, 0.55), докато алиноленова киселина (ALA), ейкозапентаенова киселина (EPA) и докозахексаенова киселина (DHA) не са били предиктивни, след адаптиране за HLA (Human Leukocyte Antigen) и фамилна обремененост за диабет в семейството. Изследвано е дали ефектът от хранителния прием на n-3 мастни киселини ALA върху риска от островен автоимунен отговор се модифицира чрез *FADS* гените на удължаване на мастните киселини и десатурация. Като е взето предвид HLA, фамилната анамнеза за диабет, етническа принадлежност, и енергийния прием се установява, че приемът на ALA е значително по-протективен при IA в присъствието на нарастващ брой минорни алели при *FADS1* rs174556 (P-interaction = 0.017), при *FADS2* rs174570 (P interaction = 0.016) и при *FADS2* rs174583 (P-interaction = 0.045). Заключениета на изследователския колектив са, че предполагаемият защитен ефект на n-3 мастни киселини по отношение на IA може да бъде резултат от комплексно взаимодействие между хранителния прием на омега-3 мастни

киселини и генетично контролирана чрез генни варианти десатурация на мастните киселини (118).

Интересна посока за изследване и размисъл дават и проучванията, които се занимават и потвърждават важността на *FADS* гените върху липидния метаболизъм и натрупващи се количествени характеристики (напр. холестерол или плазмени нива на PUFA), асоциирани с болестното състояние. Така например *Tanaka et al.* провеждат проучване GWAS (Genome-wide association study) с 1075 участници от проучването InCHIANTI, за да се идентифицират генни варианти (авторите ги наричат генни контрибутъри), които могат да обяснят вариабилността в плазмените нива на PUFA (151). Авторите откриват значителна асоциация между SNPs в *FADS1* (*rs174537*) и плазмените нива на AA, които представляват 18.6% от вариацията в тези нива. Носителите на минорния алел имали по-ниски нива на AA, EDA и EPA, и по-високи нива на LA и ALA в плазмата; което предполага намаляване на активността на D5D. Освен това, тези индивиди са имали по-ниски нива на общ холестерол и липопротеини с ниска плътност, което показва, че този минорен алел може да благоприятства плазмения липиден профил, намалявайки риска от сърдечно-съдови заболявания. Тези констатации за ефектите на *rs174537* впоследствие са потвърдени от авторите с независима извадка от 1076 участници в потвърдително проучване - GOLDN (Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network) (151). Сходните резултати и от двете кохорти предполагат, че генетичните вариации във *FADS1* може не само да обяснят разликите в плазмените липидни профили между индивидите, но също така и да имат отношение към риска от поява и развитие на сърдечно-съдови заболявания.

През 2010, *Illig et al.* провеждат голямо GWAS, където се идентифицират силни взаимовръзки между характеристиките, свързани с

метаболически синдром и сърдечно-съдовите заболявания и няколко генетични варианта. Серуми от 1809 възрастни, взели участие в немското популационно проучване (KORA) и 422 възрастни жени от британското проучване (TwinsUK) били изследвани, а концентрациите на 163 метаболитни маркера били анализирани (74). Най-силната наблюдавана асоциация и в двете проучвания била тази между SNP във *FADS1* гена (*rs174547*) и съотношението на определен продукт (фосфатидилхолин диацил С36: 4) към неговия прекурсор (фосфатидилхолиндиацил С36: 3). Авторите демонстрират, че приемайки метаболитите като фенотипни отличителни черти, в комбинация със силата на GWAS, може да се изгради ефективен подход за идентификация на нови кандидати за значими SNPs.

Скорошно проучване от 2016 на *Si-Wei Li et al.* показва, че полиморфизми във *FADS1* и *FADS2* гените могат да променят, както нивата на плазмените мастни киселини, така и активността на десатуразите при пациенти с диабет тип 2 (Т2Д) и коронарна или исхемична болест на сърцето (ИБС). В проучването били използвани газова хроматография и масспектрометрия, както и анализ с висока разделителна способност на топене (*high-resolution melting method*), за да се установят вида на плазмените мастни киселини и следните полиморфизми: *rs174537G>T*, *rs174616C>T*, *rs174460T>C* и *rs174450A>C* при 234 пациенти с диабет тип 2, 200 пациента с ИБС, 185 пациента едновременно с двете заболявания, както и при контролна група от 253 здрави доброволци. Установило се, че пациентите с Т2Д и ИБС имат най-високи нива на арахидонова киселина, дихомо-гама-линоленова киселина и делта-6-десатураза и най-ниски нива на стеаринова и линоленова киселина и наситени мастни киселини. Плазмената ейкозапентаенова и докозахексаенова киселина били повишени при хората с Т2Д, но значително понижени при тези с ИБС. Освен това диабетиците с *rs174537GG* генотип

били в риск от развитие и на ИБС с повишен плазмен LDL-холестерол, арахидонова киселина и делта-6-десатураза (95).

Диабет тип 2 и исхемичната болест на сърцето са обществено-значими заболявания, достигащи притеснителна честота на разпространение (170). В допълнение диабетиците имат също и повишен риск от кардио-артериални инциденти (119). При пациенти едновременно с Т2Д и ИБС се отчита от 2 до 4 пъти по-висока смъртност в сравнение с хора единствено с диабет, но без ИБС (5). Ето защо е важно да се проучат много добре рисковите фактори за развитие на Т2Д и ИБС самостоятелно, както и едновременно. Тези рискови фактори включват затлъстяване, поява на метаболитен синдром, наличие на фамилна история за заболяванията, нарушен глюкозен толеранс, ниска физическа активност, увеличени нива на плазмени триглицериди и намалени на HDL-холестерол. Авторите на проучването обсъждат състава на плазмените мастни киселини, като рисков фактор с особено значение, заради ролята на мастните киселини като проводници на възпалителния отговор при нормални и при патологични състояния (137). Всъщност, влиянието на десатуразните ензими върху мастните киселини е идентифицирано като основен фактор за развитието на Т2Д и ИБС (153).

Според авторите, при пациенти с Т2Д и ИБС е отчетена най-ниска делта-5-десатуразна (D5D) и най-висока делта-6-десатуразна (D6D) активности. Повишената делта-9-десатуразна (D9D) активност се асоциира с инсулинова резистентност, мастна дистрофия на черния дроб и метаболитен синдром. Затова се счита, че D9D може да е обещаващ таргет за третиране при инсулинова резистентност (159). *Kroger et.al* (87), установяват, че изчислената D5D активност има негативна корелация с потенциален риск за развитие на диабет, докато изчислената D6D активност корелира силно и положително по отношение на риск от поява и развитие на диабет тип 2.

Въпреки, че не е известен точния механизъм по който инсулиновата резистентност повишава риска от кардиоваскуларни инциденти, D5D и D6D, кодирани от *FADS1* и *FADS2* гените, могат да повлияват глюкозния метаболизъм (32) а оттам и да имат отношение към описаните рискове.

Предходни проучвания предполагат, че плазмените и тъканните концентрации на n-3 и n-6 мастни киселини са свързани с няколко SNPs във *FADS1* и *FADS2* гените (31, 67, 73). Геномни проучвания при хора подчертават влиянието на вариации във *FADS1* и *FADS2* генните клъстери, които оказват влияние върху нивата на глюкоза, общ-холестерол (111) и LDL-холестерол, промотирайки метаболитен синдром и заболявания като инфаркт на миокарда и дислипидемия (40, 151).

Si-Wei Li et al., изхождайки от функциите на *FADS* гените, по отношение на метаболизма и хомеостазата на мастните киселини, изказват предположение, че SNPs във *FADS* гените биха повлияли десатуразната активност на съответните ензими, което от своя страна би променило характеристиките (състав и количество) на мастните киселини в плазмата и би променило риска от едновременно развитие на Т2Д и ИБС. Резултатите от проучването на *Si-Wei Li et al*, недвусмислено показват, че метаболизма на ненаситените мастни киселини, десатуразната активност и *FADS* полиморфизмите допринасят за едновременното развитие на диабет тип 2 и коронарно-артериална болест на сърцето. Авторите считат, че *rs174537* може да се окаже ключов единичен нуклеотиден полиморфизъм във *FADS* генния клъстер, който е свързан с плазмените нива на мастни киселини и десатуразната активност.

Резултатите от проведеното през 2018г проучване от *Abumweis u колектив* обаче, служат като контрапункт на по-горе цитираните проучвания за евентуално взаимодействие между приема на n-3 PUFAs, компоненти на

липидния профил и единичните нуклеотидни полиморфизми във *FADS* гените. В своето изследване *Abumweis* и *колектив* целят да анализират дали обичайните еднонуклеотидни полиморфизми (SNP) в гените, включени в ДНА - синтеза и TAG - метаболизма, са свързани с промяна на концентрацията на липидите, липопротеините и аполипопротеините в кръвта при диетичното лечение с ДНА, осигурено чрез високо-олеиново масло от рапица (НОСО- high-oleic canola oil) (1).

При рандомизирано, кръстосано контролирано хранително проучване, 129 пациенти с метаболитен синдром получават високо - олеиново рапично масло (НОСО) и високоолеиново рапично масло, обогатено с ДНА (НОСО-ДНА), всяко за 4 седмици. По време на фазата на НОСО-ДНА приемът на ДНА варира от 1 до 2.5 g дневно. Субектите са били генотипирани за нуклеотидни варианти, кодиращи определени изоформи на аполипопротеин Е (APOE), както и за наличие на определени SNPs, включително за *FADS1*-rs174561, за *FADS2*-rs174583, *ELOVL2*-rs953413, *ELOVL5*-rs2397142, *CETP*-rs5882, *SCD1*-rs2234970, *PPARA*-rs6008259 и *LIPF*-rs814628 - важни гени, контролиращи метаболизма на мастните киселини. Резултатите показват, че като цяло, консумацията на НОСО-ДНА олио намалило кръвните концентрации на TAG с 24% в сравнение с чистото НОСО олио. Намалването на концентрациите на TAG обаче било независимо от генетичните вариации в изследваните гени. По същия начин, не се доказват подобни терапия-гени взаимодействия в отговора на други липиди, липопротеини или аполипопротеини към ДНА добавки. Въпреки това, в този анализ е наблюдавана по-ниска междуиндивидуална вариация в отговора на TAG към добавянето на ДНА в сравнение с други проучвания. Заключениеето на колектива е, че TAG-понижаващият ефект на допълнителна доза ДНА, изчислена индивидуално въз основа на телесното тегло, не се повлиява от

генетични вариации в *APOE*, *FADS1*, *FADS2*, *ELOVL2*, *ELOVL5*, *CETP*, *SCD1*, *PPARA* и *LIPF* (1).

Разгледаните проучвания установяват важността на *FADS* гените при регулиране на метаболитните пътища, обуславящи рискови фактори, свързани със здраве и болестни състояния. Тези проучвания също така демонстрират необходимостта от провеждане на бъдещи изследвания, които да изясняват в детайли както молекулярните механизми, така и физиологичното въздействие на полиморфизмите във *FADS* клъстера от гени. Нещо повече, наблюдаваното влияние на тези генетични варианти върху метаболизма на липидите в цялото тяло ги позиционира като интригуващи кандидати за бъдещи нутригенетични изследвания.

2.9 Модифициране на хранителното поведение чрез използване на генетична информация

Хранителното поведение на хората се характеризира като изключително трудно подаващо се на промени. Скорошни публикации обаче, показват обещаващи резултати за промяна на хранителния прием, когато човек е запознат с генетично си предразположение към определено заболяване и това може да бъде ефективна стратегия за поемане на лична отговорност по отношение на собственото хранително поведение и навици за хранене. Лична генетичната информация в днешно време може все по-лесно да бъде получена, благодарение на развитието на технологиите за генотипиране и постоянно намаляващите цени на генетичното тестване. В резултат на намаляващите разходи за извършване на генотипиране, физически лица вече могат да получават персонализирана обратна връзка по отношение на тяхната предразположеност към редица различни болестни състояния (18).

Въздействието, което тази информация може да окаже върху здравното поведение е от особен интерес, тъй като честотата на хронични заболявания като сърдечно-съдовите болести и диабет тип 2 е нараснала, превъзчайки ги в значими обществени здравни проблеми (108). Има значителни доказателства, че тези състояния са свързани с определен, подлежащ на промяна начин на живот, който включва хранителният режим, физическата активност, отказване на тютюнопушенето и приема на големи количества алкохол и др. Различни интервенции, насочени към постигане на положителни промени, свързани с начина на живот и здравното поведение, често са неефективни дългосрочно, а за да се смекчи риска за развитие на дадено заболяване е необходим именно дълготраен ефект (39). Като резултат, привържениците на персонализираната медицина твърдят, че здравните препоръки, съобразени с генетичния профил на индивида могат да бъдат по-ефективни при постигане на промяна в поведението отколкото общовалидните (масовите) препоръки, базирани само на епидемиологичните данни от популацията. Нарастващият брой качествени проучвания показват силен обществен интерес в геномиката и персонализирана медицина за профилактика на заболяванията (21, 54, 94, 148), но засега има ограничени количествени доказателства в подкрепа на твърдението, че персонализираната геномика може да се използва като полезно средство за превенция.

Daiva Nielsen и *Ahmed El-Sohehy* от факултета по Хранителни науки към университета в Торонто, Канада са провели двойно-сляпо, рандомизирано контролирано проучване, с паралелни групи, в съотношение 2:1 онлайн, за да се определят краткосрочните и дългосрочните ефекти от разкриване на генетична информация свързана с персонализирано хранене за дневния хранителен прием на кофеин, витамин С, добавена захар и натрий

(116). Участниците са 138 здрави мъже и жени на възраст между 20 и 35 години.

Първата група (n=92) получава персонализирани, ДНК-базирани хранителни препоръки за 12 месеца, а контролната група (n=46) получават общи препоръки за хранене, без генетична информация, в продължение също на 12 месеца. С помощта на Въпросници за хранителната честота, които са попълвани в началото на проучването, както и на 3-тия и 12-тия месец след стартирането, е оценен хранителния прием. Използвани са общи линейни модели за сравнение на промените в хранителния прием между тези, които получават общоприети диетични съвети и тези, които получават ДНК-базирани съвети за хранене. Резултатите показват, че в сравнение с контролната група, в интервенционната група не са наблюдавани значими промени в приема на хранителни вещества за 3-месечен период. По отношение на 12 месечния период, участниците в групата за интервенция, които притежават рисков вариант на *ACE* гена, и са посъветвани да ограничават приема на натрий, значително редуцирали приема на този елемент (мг/ден), в сравнение с контролната група (-287.3 ± 114.1 срещу 129.8 ± 118.2 , $p=0.008$). Тези, които са имали не-рисковия вариант на *ACE* не са променили значително приема на натрий, в сравнение с контролната група (12 месеца: -244.2 ± 150.2 , $p=0.11$). Сред тези, с рисков тип на *ACE* гена, делът на доброволците, които достигат целенасочената препоръката от 1500 мг/ден се увеличава от 19% в началото на проучването на 34% след 12 месеца ($p=0.06$). Изводите, които могат да се направят е, че разкриването на генетична информация за персонализирано хранене води до по-значителни промени в поведението и оттам в приема на някои хранителни компоненти, при съпоставка с диетичните препоръки приети за стандарт за общата популация.

В повечето проведени проучвания, изследващи влиянието на личната геномна информация, отнасяща се до податливостта на индивида към болести, свързани със здравното поведение липсват дългосрочни последващи данни. В резултат на това ефектите от лична геномна информация върху здравното поведение в краткосрочен и дългосрочен план са до голяма степен неизвестни.

Проучването за оценка на риска и образование относно болестта на Алцхаймер (REVEAL) е серия от многоцентрови рандомизирани клинични изпитвания, които изследват влиянието на оценката на генетичния риск (включително на разкриване на *apoE* генотипа) върху възрастни с нормално когнитивно възприятие (60, 128).

ApoE е апопротеин, който има съществена роля в липидния транспорт. Мутациите в *apoE* гена са причинно-следствено свързани с няколко заболявания, включително Болест на Алцхаймер, метаболитен синдром, когнитивни нарушения, имунорегулация и атеросклероза (46). Наличието на ε4 алела увеличава риска от развитие на болест на Алцхаймер с между 5 и 15 пъти, в зависимост от броя на наличните копия (34). Обширни изследвания, проведени в Бостънския Университет са довели до разработването на криви на риска за развитие на Алцхаймер на базата на мутации в *apoE* гена. Кривите на риска позволяват индивидуализирана оценка на риска от Алцхаймер през целия живот, които се основават не само на генотипа, но и на възраст, пол и раса (34). Генетичната оценката на риска за това заболяване понастоящем е достъпна само за изследователски цели и все още не е на разположение за клинична практика (155).

Изпитването REVEAL е едно от първите, което оценява ефекта от разкриване на информация за генетичния риск при болестта на Алцхаймер, сложно, прогресиращо заболяване без известен метод на лечение или

излекуване (155). REVEAL използва няколко метода за събиране на данни, включително валидирани инструменти за събиране на информация за здравословно поведение, хранителен избор и навици за изпълняване на физически упражнения. Допълнителни психологически данни са събирани с помощта на различни валидирани инструменти за събиране на информация за когнитивен статус, стрес и депресия (127). Високите проценти на съдействие от страна на участниците и редовните последващи посещения са допринесли за доброто събиране на данни и са предоставили на изследователите надежден набор от данни. Подробности за цялостното изследване REVEAL, включително обосновка на клиничното изпитване, дизайн на проучването, инструменти за изследване и други резултати са описани в следните статии (60, 156). В проучването REVEAL са представени подробни инструкции за изследване на промените в здравното поведение след оценка на генетичния риск. В първото изпитване REVEAL, *Chao и колектив* (20) определят, че при участниците, които са научили, че имат повишен генетичен риск за болестта на Алцхаймер, е приблизително три пъти по-вероятно да съобщят за промяна на здравословното поведение, свързано с Алцхаймер, отколкото тези, които са *apoE e4* отрицателен профил. Промяната в здравословното поведение е оценена с помощта на съставна променлива, която обхваща промени в диетата, физическите упражнения, хранителни добавки и лекарства и е получена от сравнително малка, хомогенна група изследвани лица. Второто REVEAL изпитване (156), включва 253 когнитивно нормални възрастни индивиди с фамилна анамнеза за болест на Алцхаймер, на които им е предоставена информация за генотип им в *apoE* гена. Резултатите при възрастни, които са *e4* положителни, показват че е над два пъти по-вероятно те да съобщят за промяна в хранителното поведение, свързано с болестта на Алцхаймер, след разкриване на генотипа, в сравнение с участниците, които са

били е4 негативни. При по-обстоятелен анализ е определено, че промяната сред е4 позитивните участници е свързана най-вече с използване на хранителни добавки. При участниците, които били положителни за рисковия алел е отчетен 4.75 пъти по-голям шанс за докладване на промяна при употреба на хранителни добавки (95% CI 2.2 10.1; P<0.0001). Интересното е, че не са наблюдавани значителни разлики в отчетените промени в поведението за общите хранителни навици или физически упражнения между е4 негативните и е4 позитивни участници. Авторите предполагат, че част от промяната на поведението на наблюдаваните доброволци може да се дължи на популярността на хранителни добавки, предлагани на пазара по това време, маркирани като „Здраве на мозъка“, въпреки липсата на научно валидни проучвания, които да докажат, че добавките са полезни при профилактика на болестта на Алцхаймер. Данните от двете REVEAL проучвания са първите, които демонстрират стабилна промяна в поведението, свързано с храненето след проведена генетична оценка на риска (155).

Европейски държави като Норвегия, Франция, Испания, Унгария, Чехия, Обединеното кралство, Холандия, както и такива извън ЕС като Япония обединяват усилията си в широкомащабни проекти с основна тема малнутрицията при възрастни хора. Една не малка част от усилията на изследователите е насочена към изследване на хранителното поведение при възрастни хора и как то се видоизменя, под въздействие на знание за генетични предразположености, на базата на проведени нутригенетични тестове.

Предвижда се набирането на свободно живеещи хора (не са настанени в старчески домове или приюти за бедни или бездомни) в напреднала възраст (над 65 годишна), на които да бъде тествано, дали разкриването на генетична информация за 7 рискови алели, свързани с нивото на консумация на кофеин,

витамин С, захар, сол, мазнини, витамин D и метаболизма на n-3 мастни киселини ще доведе до промяна на хранителния прием. Проучването като цяло няма за цел да валидира клиничната ефикасност на генетични варианти, предвидени в докладите за хранителен прием и насоки за здравословно хранене, а само да покаже променя ли се поведението на човек, когато знае, че е предразположен генетично към дадено състояние. Дизайна на проучването изисква набирането на доброволци в напреднала възраст. При разпределението на участниците се прилага съотношението 2:1 в полза на участниците в групата с интервенция в сравнение с контролната група, тъй като групата за интервенция се състои теоретично от две подгрупи - такива, които носят рисков алел ("рисков" генотип) и такива, които не носят рисков алел ("не-рисков" генотип) за всеки от 7-те генетични варианти. В началото на проучването се извършва генотипиране на ДНК, изолирана от устната кухина с помощта на тампон. Генотипирането става използвайки полимеразна верижна реакция в реално време (Real-Time PCR). Участниците в групата за интервенция получават резултатите си от генотипа на избраните варианти и са им предоставяни съответните диетични препоръки за дневен прием на кофеин, витамин С, добавена захар и сол, мазнини, витамин D и n-3 мастни киселини, базирани на ДНК анализа в началото на проучването. Тези, които притежават генотип разкриващ по-голям риск, са насочвани целево към по-стриктен диетичен режим (по-строг, отколкото препоръчвания текущия общ дневен прием). Пациенти, притежаващи алела с нисък риск получават резултат на генотипа си, заедно с настоящите общи хранителни препоръки. Контролната група получава настоящите общи препоръки без генетичната информация. Първоначалните резултати от проучването са промяна в хранителния прием на кофеин витамин С, добавена захар, сол, мазнини, витамин D и n-3 мастни киселини в групата с разкрита генетична

информация, в сравнение с контролната от изходното ниво за проследяване до последващите оценки, проведени след 3 и 6 месеца. За оценка на хранителния прием се използват 3-дневни диетични записи и въпросник за честотата на хранителния прием. Проучването е текущо, предстоят анализа, интерпретацията и публикуването на резултатите, но то показва големия изследователски интерес към темата. Засяга се въпроса за разкриването на генетична информация не само от гледна точка на прием на определени макро и микро нутриенти, но и като процес, провокиращ психо-социални и психо-емоционални поведенчески ефекти.

Други проучвания обаче не намират сигнификантна връзка между разкриване на генетична информация и промяна в хранителното или като цяло здравословното поведение от страна на участниците (8, 55, 59). В обзорната статия *Guasch-Ferre и сътрудници* (62) разглеждат подробно въпроса за хранителната геномика и отнасящите се към нея генетични тестове и услуги на компании, предлагащи нутригенетични тестове директно до клиента (Direct-To-Consumer Genetic Testing, DTC-GT). Дискутират се предимствата, недостатъците и нуждата от още проучване в тази насока, както и обществено значимия въпрос дали знанието генерирано от тези генетични тестове може да бъде трансферирано и използвано в клиничната практика или в здравни инициативи, свързани с общественото здраве и превенцията като цяло.

В заключение, може да се каже, че категорични научни доказателства в подкрепа на ползата от разкриването на нутригенетична информацията за потребителите остават ограничени, а темата спорна. За да можем да разглеждаме нутригенетичното изследване като средство за подобряване на здравето, от решаващо значение е да има по-голямо разбиране за приложението на генетиката при оптимизиране на човешкото здраве и

забавяне появата на болест, както и за намаляване на тежестта от възникнало заболяване и подобряване на качеството на живот. Генетичната информацията е сложна, а интерпретацията ѝ е вероятностна, и зависи от много фактори, като здравословно състояние, семейната здравна история, етнически произход и др. От години, генетичното консултиране се стреми да развие научно валидни процеси за подпомагане разбирането на хората за генетичния принос към болестта. Хранителната геномика обещава да бъде преведена в персонализирани хранителни препоръки въз основа на генетична податливост към полигенни заболявания, а генетичното тестване трябва да играе ключова роля при този подход (62). Въпреки това, създаване на точни методи за измерване на хранителен прием, генетична податливост и взаимодействие между тях, може да даде по-добра оценка на здравето приложима за населението както и развитието на персонализирани интервенции и публични политики.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

За изпълнението на тези цели си поставихме следните **задачи**:

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

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Изследвана група

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

Подборът на лицата с променен липиден статус е извършван или от личния лекар на доброволеца, със съдействието на лекари от Медицински Университет- Плевен, катедра „Обществено здравни науки“, Факултет „Обществено здраве“ или от специалисти в Националния център по общественото здраве и анализи – София, след внимателна оценка на

резултатите от биохимичните изследвания, (HDL, LDL, Chol-Total, TG, кръвна захар), като са съобразявани референтните стойности за всеки от биохимичните маркери.

На всеки доброволец беше взета ДНК проба по неинвазивен метод, и чрез молекулярно-генетични подходи беше определен генния вариант при всеки индивид.

Въпросниците и анкетите бяха попълнени в присъствие на лекар или специалист от колектива под формата на интервю. Всеки участник в проучването беше запознат писмено с целите, ползите и рисковете на изследването и подписа декларация за информирано съгласие и доброволно участие, одобрено от Комисията по медицинска етика на Националния център по обществено здраве и анализи и Медицински Университет - Плевен, съгласно Декларацията от Хелзинки за спазване на етичните принципи при провеждане на медицински изследвания на хора и действащата актуална нормативна уредба в Българското законодателство (173, 175, 178) (*Приложение №1*).

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

За постигане на поставените цели в настоящата научна работа са използвани следните подходи и методи:

- Методи за оценка на общо здравословно състояние и липиден профил
 - Антропометрични данни
 - Бодиимпедансметрия

- Клинико и биохимични изследвания
- Молекулярно-генетични методи
 - Общи лабораторни методи (събиране на биологичен материал, съхранение и предварителна обработка на пробите)
 - Екстракция на ДНК от биологичен материал
 - Количествена и качествена оценка на екстрахираните ДНК
 - Полимеразна верижна реакция- конвенционален и в реално време (Real PCR) чрез използване на флуоресцентно белязани сонди за алелна дискриминация
 - Визуализация и документиране на резултатите, получени от конвенционалния PCR
 - Секвенционни реакции
- Методи на анкетното проучване
 - Метод за изследване на храненето чрез 24-часово възпроизвеждане по памет на хранителния прием за предшестващо денонощие (24h Dietary Recall Method)
 - Метод Честота на консумация на храни (Food Frequency Questionnaire Method, FFQ)
 - Анкетна карта относно здравен статус и фактори на риска за хронични заболявания
- Статистически методи

4.2 Методи за оценка на общо здравословно състояние и липиден профил

4.2.1 Антропометрични данни

Измерват се ръст (m) и тегло в килограми (kg), изчислява се индекс на телесна маса (ИТМ) в kg/m². Ръстът и теглото се измерват двукратно при всички изследвани лица, записват се и двете стойности и се взима

усреднената стойност, при наличие на разлики. Извършват се измервания на обиколките на талия (см) и ханш (см), двукратно като се взима средна стойност.

4.2.2 Бодимпедансметрия

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

Измерени бяха следните параметри:

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

4.2.3 Клинико и биохимични изследвания

За анализ и оценка на липидния профил са изследвани следните кръвни показатели, чиито референтни стойности са дадени в **Таблица 3**.

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

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

Таблица 3. Референтни стойности на биохимичните показатели в липиден профил

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

*Референтни стойности съгласно препоръките на Европейската общност по атеросклероза (102)

**Референтни стойности съгласно ръководство и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет, (121)

За получаване на достоверни резултати при изследване на липидния профил има някои условия, които трябва да се спазват при пробонабирането. Биологичен материал (венозна или периферна кръв) се взимат сутрин на гладно, 12 часа след последния прием на храна, бедна на мазнини, без употреба на алкохол 2-3 дни преди изследването. Препоръчва се и прекъсване на лечението с медикаменти, свързани с липидния обмен най-малко 2

седмици преди изследването. Кръвта се събира и съхранява в епруветка за серум със сепарационен гел, после се центрофугира и серумът се отделя в рамките на 30 мин. до 1 час. Отделеният серум (чрез гел-бариера или отделен, в подходяща епруветка за транспорт) се съхранява и транспортира при (2-8°C) до 24 часа. Концентрацията на различните показатели на липидния статус в серум или плазма се изчислява най-често по методиката на ензимен колориметричен метод (за холестерол-CHOD-PAP; за триглицериди- GPO-PAP).

Глюкозата се измерва в клинична лаборатория за скрининг на хора с висок риск. Кръвта се взема, след като индивидът не е приемал храна поне 12 ч (една нощ). Глюкозата се измерва в плазмата. Въпреки че методите за анализ на глюкоза проявяват ниска точност при границите на диагностичното решение от 7.0 mmol/l (126 mg/dl) на гладно и 11.1 mmol/l (200 mg/dl), при натоварване с прием на глюкоза, сравнително голямата индивидуална биологична променливост (CV от ~5–7%) може да доведе до грешки в класификацията. На базата на биологични вариации анализът на глюкозата трябва да има аналитична неточност $\leq 3.3\%$, отклонение $\leq 2.5\%$ и пълна грешка $\leq 7.9\%$.

4.3 Молекулярно генетични лабораторни методи

4.3.1 Общи лабораторни методи

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

Проба от букална лигавица се събира от вътрешната страна на бузата посредством стерилен тампон (15.2 см., индивидуално опаковани Кат.№ 25-1506 1 PF 100, Progen ООД) и се поставя в 200 μ l PBS буфер (pH 7.4) за по-нататъшно извличане на ДНК, като съхранението на така разтворената

букална лигавица става в хладилни условия (1-4°C) за не повече от 2 дни. При невъзможност тампона с натривката от булачна лигавица да бъде размит в PBS буфер веднага, той се съхранява в оригиналната опаковка, за да се изсуши и да се избегне растежа на бактериална микрофлора, обитаваща нормално устната кухина.

Използваният за съхранение и транспорт PBS буфер бе приготвен съгласно една от двете* рецептури и посочените указания:

<i>Химичен компонент</i>	<i>I начин</i>	<i>II начин</i>
1. NaCl	8 g	8g
2. KH ₂ PO ₄	0.2g	0.2g
3. KCl	0.2g	0.2g
4. Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.9g	-
5. Na ₂ HPO ₄ безводен	-	1.15g

- *нужните количества от изредените компоненти се измерват;*
- *KH₂PO₄ и Na₂HPO₄ се разтварят отделно, колкото и в малки количества да са;*
- *след разтваряне поотделно, разтворите се смесват;*
- *киселинно-алкалното състояние на получения разтвор се довежда максимално близо до pH - 7.4 като, корекции се правят, чрез добавяне на 2N NaOH;*
- *получения PBS буфер се автоклавира 3 пъти на 100 градуса за по 30 минути на една атмосфера.*

*Рецептата е една и съща, но количеството е веднъж за безводен и веднъж за фосфат с включена вода към молекулата.

4.3.1.2 Екстракция на ДНК от биологичен материал

А. Процедури за извличане на ДНК

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

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

Б. Количествена и качествена оценка на екстрахираната ДНК

Качеството и количеството на екстрахираната нуклеинова киселина беше оценена както чрез спектрофотометрален анализ, така и с електрофореза на агарозен гел.

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

Така получените препарати от ДНК бяха довеждани до работни концентрации от 0.5-2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, разпределяни на аликвоти с цел предпазване от контаминации и съхранявани във фризер до по-нататъшното им анализиране.

Букалната тъкан се използва като материал за проба най-вече заради качеството на ДНК, която се добива и поради неинвазивността на процедурата.

4.3.2 Специфични генетично-молекулярни методи

4.3.2.1 Генотипиране за откриване и определяне на единични нуклеотидни полиморфизми чрез полимеразно-верижна реакция

Според публикувани данни, специфичен единичен нуклеотиден полиморфизъм (*rs174547*) е идентифициран в *FADS1* гена, със значителна връзка между неговите варианти и метаболизма на мастните киселини. За откриването му беше приложена стандартна полимеразни верижна реакция, гел електрофореза и последващо секвениране, както и Real-Time PCR, с флуоресцентно белязани сонди и праймерна двойка.

Лабораторния инструментариум (пипети, епруветки, стативи, връхчета, др.), както и използваните реактиви и химикали бяха предназначени специално за провеждане на молекулярно-биологични изследвания. Работните повърхности и инструменти бяха редовно дезинфекцирани. При всяка реакция бяха включвани необходимите положителни, отрицателни и други контроли. Всички манипулации бяха провеждани при стриктно спазване на изискванията на утвърдените стандарти за Добра Лабораторна Практика.

Всички експериментални анализи бяха провеждани 2-кратно, а при неясни или съмнителни резултати повтаряни, за да се определи възпроизводимостта на резултатите.

4.3.2.2 Секвенционни реакции

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

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

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

Всички PCR реакции бяха проведени в 7300 Teal Time PCR System (Applied Biosystems), съгласно инструкциите на производителя. Реакционният обем е 25 μl и сместа съдържа 12.5 μl TaqMan® Universal PCR Master Mix (кат. № 4304437), 1.25 μl 20X TaqMan SNP Genotyping Assay - съдържащ двойка праймери и флуоресцентно белязана сонда (ThermoFisherScientific, кат. № PN4351379), 6.25 μl RNase/DNase Free Water (Fermentas) и 5 μl разредена ДНК проба. Всички реакции бяха проведени в присъствието на две отрицателни контроли: 1. RNase/DNase Free Water (Non-template control, NTC); 2. Бактериална ДНК. За положителни контрола бяха използвани проби с ДНК, от доброволци с вече доказани и познати генотипове, получени след дизайна на собствената праймерна система и последващо секвениране. PCR амплифициране беше проведено с протокол, описан в **Таблица 4**.

Таблица 4. Основни стъпки и съответните условия за провеждане на полимеразна верижна реакция в реално време за откриване на rs174547 полиморфизъм във FADS1 ген

Стъпка	Условия
1	60 ⁰ C за 120 секунди
2	95 ⁰ C за 600 секунди
3	95 ⁰ C за 15 секунди
4	60 ⁰ C за 60 секунди
5	Отчитане на флуоресценция (plate read)
6	Стъпка No. 3, 4 и 5 се повтарят още 44 пъти (общо 45 цикъла за целия протокол)
8	Охлаждане и задържане на 4 ⁰ C (край)

4.4 Метод на анкетното проучване

4.4.1 Метод за изследване на храненето чрез 24-часово възпроизвеждане по памет на хранителния прием за предшестващо денонощие (24h Dietary Recall Method)

Целта на този метод е да се събере информация за всички храни и напитки, консумирани от респондента предишния ден. Препоръчва се изследване на два непоследователни дни, с пропорционално представено включване на всичките дни от седмицата. Чрез активно интервю в анкетна карта се описва вида храна/напитка, количество на консумираната храна (гр) начина на приготвяне. Използвани са и допълнителни нагледни материали-снимки или макети за по-точно възпроизвеждане на големината на порцията. Така събраната информация се обработва с компютърна програма, съдържаща актуална база данни за състав на храните и напитките. Отчита се и приема на хранителни добавки.

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

Честота на консумация на храни е изследвана чрез стандартизиран въпросник (Food Frequency Questionnaire, FFQ). Разработената анкетна карта

включва ранжирани по честотата на консумация храни/групи храни. Участниците отбелязват честотата, с която те консумират разнообразни храни в продължение на дълъг период от време, в случая една година, с цел оценка на обичаен хранителен прием. Броят на храните варира в зависимост от целта на проучването.

Всички доброволци попълниха анкетна карта за честота на консумация на храни и напитки. За целите на проучването беше използвана модифицирана анкетна карта за честота на консумация (FFQ), използвана в Национално проучване на факторите на риска за здравето сред населението над 20-годишна възраст, проведено през 2014 г. Последното е част от Националната програма за превенция на хроничните незаразни болести 2014-2020, провеждана от Министерство на здравеопазването, съвместно с Националния център по обществено здраве и анализи. За целта на настоящето проучване в анкетната карта за честота на консумация бяха включени като отделни позиции, храни съдържащи, наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини.

Модификацията на анкетната карта се състоеше в по-подробно описание и разделянето на храните, съдържащи n-3 и n-6 мастни киселини. Например вместо само яйца, бяха включени отделно „белтък“, „жълтък“ и „цели яйца“. Това бе направено с цел по-детайлно изследване приема на различни мастни киселини с яйцето, тъй като в различните му части се съдържат различно количество и вид мастни киселини.

Рибите в тази модифицирана версия на FFQ бяха посочени като видове, а не като цяла група - например съомга, скумрия, херинга, сардина, пъстърва, скариди и морски дарове, отново с цел добиване на по-детайлна картина относно честотата на консумация на рибни продукти, основни носители на средно- и дълговерижни мастни киселини за организма на човек.

Ядките също са разделени на отделни категории. Като отделни продукти се посочват семена от чия, ленено семе, сусамено семе и орехи, а обединени в една група са фъстъците, шам-фъстък, бадеми и лешници. Тиквеното и слънчогледовото семе също попадат в една категория.

В анкетната карта за честота на консумация беше добавена и категория „маргарин, обогатен с омега-3/омега-6“. Последното е продиктувано от наличието на пазара на подобни обогатени продукти, които се търсят от потребителите, заради мащабните и агресивни рекламни политики на фирмите производители, продиктувани от нарастващата нужда хората да се хранят по-здравословно и разумно.

Мазнините в течно състояние (олио) също бяха разделени на: слънчогледово, зехтин, царевично, ленено, соево, орехово, конопено, рапично и паста от авокадо, защото всяко от тях е с различна наситеност на LA и ALA.

Хранителни приеми се причисляват към една от 7 дискриминативни категории: по-рядко от 1 път месечно, 1-3 пъти месечно, 1 път седмично, 2-4 пъти седмично, 5-6 пъти седмично, 1 път дневно, повече от 1 път дневно. За по-удобно и разбираемо представяне на резултатите, при анализа на данните, тези седем категории бяха обединени в три: 1) 3 пъти месечно и по-рядко - категория показваща сравнително нисък или дори никакъв прием на съответната храна/продукт; 2) 1-4 пъти седмично – категория показваща умерен прием на съответната храна и 3) повече от 5-6 пъти седмично – категория отчитаща сравнително висок приемна съответната храна.

4.4.3 Здравен статус и фактори на риска за хронични заболявания

Използвана е модифицирана анкетна карта, попълвана при Националното проучване на факторите на риска на здравето при хора над 20 годишна възраст, в рамките на Националната програма за превенция на

хроничните незаразни болести 2014-2010г., проведено от Националния център за обществено здраве и анализи и Министерство на Здравеопазването. Въпросникът се състои от няколко категории въпроси, касаещи личните данни, данни за здравето, навици на хранене, физическа активност, здравословен начин на живот и поведение, вредни навици като тютюнопушене или злоупотреба с алкохол. За целите на настоящето изследване бяха въведени няколко модификации и оптимизации на анкетната карта. Добавен е въпрос относно вземането на лекарствена терапия за лечение на хипертензия, хиперхолестеролемия, атеросклероза, противозачатъчни, както и е отразен прием на витамини и добавки. Въпросите, отнасящи се до използваната мазнина при приготвянето на храна вкъщи са разделени както следва: на приготвяне на храна без топлинна обработка (т.е. за салати и намазване) и приготвяне на топлинно обработени ястия-готвени, пържени, задушени, печени и др.). като всеки един от тези въпроси е допълнен с продукти, които са актуални на пазара в момента и се наблюдава растящ интерес към ползването им, напр. кокосово масло, авокадо и паста от авокадо, маслинова паста, различни видове тахани, обогатени с омега-3 и омега-6 продукти за мазане, подобни на маргарините. В категория „Навици на Хранене“ е добавен въпрос „Какъв хранителен режим бихте спазвали по-стриктно и постоянно“ с цел да се изясни нагласата на българина спрямо общите препоръки за здравословно и балансирано хранене и нагласата, когато има персонализирани такива, въз основа на негови лични метаболитни и/или генетични особености. Последните три въпроса в тази анкета са добавени, за да се изясни поведението и статуса на доброволеца относно приема на различни хранителни добавки, в това число и такива съдържащи омега-3 и омега-6 мастни киселини. (*Приложение №2-Анкетни карти*)

4.5 Статистически методи за анализ

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

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

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

*Статистическата обработка на данните е извършена със съдействието на доц. М.Вуков; гл.експ. Д. Божилова, Дирекция „Промоция на Здраве и Превенция на Болестите”, отдел „Рискови Поведенчески Фактори и Превенция на ХНБ“, Национален Център по Обществено Здраве и Анализи, София и гл.ас. Е.Насева, д.м. в катедра Икономика на Здравеопазването, ФОЗ, МУ-София.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

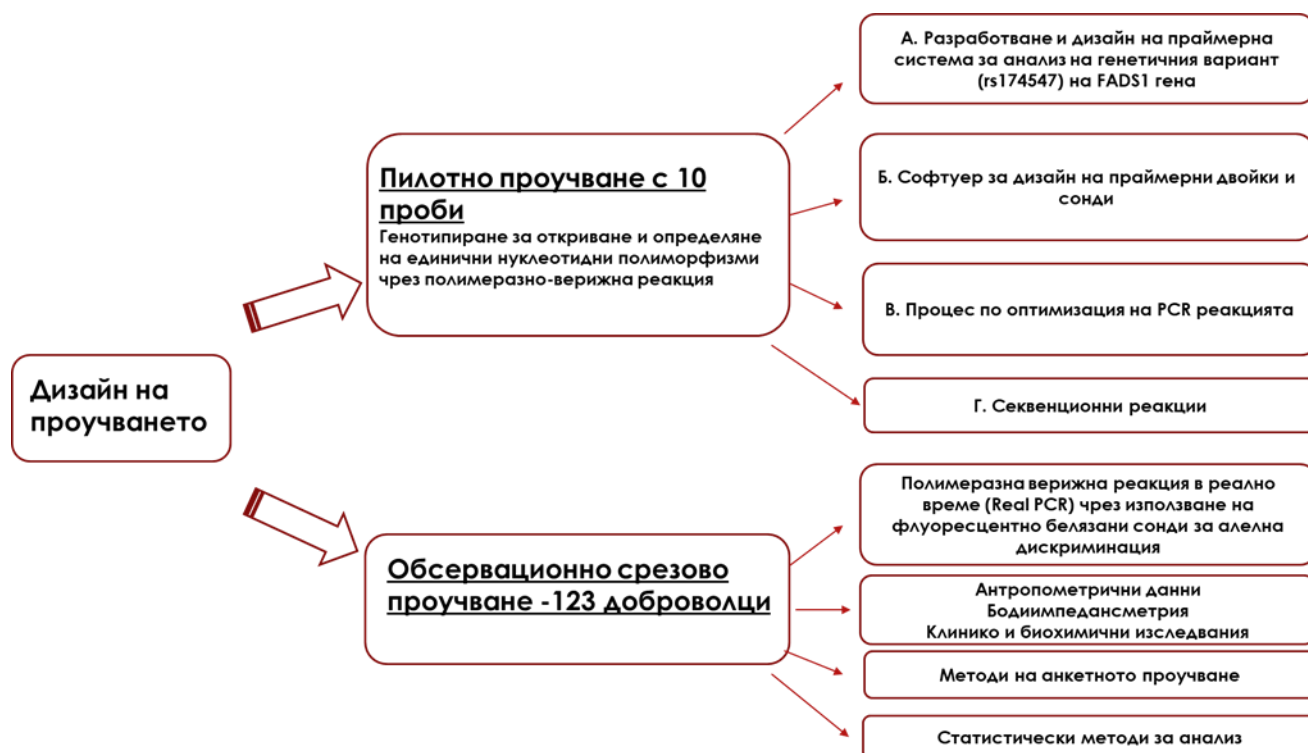
5.1 Дизайн на проучването

Общо 123 доброволци от регионите Плевен и София, на възраст от 28 до 65 години, са изследвани за генния им вариант по отношение на *rs174547* във *FADS1* гена. От тях 43 са мъже (43/123, 35%) и съответно 80 жени (80/123, 65%). Оценено е здравословно състояние чрез снемане на антропометрични данни и попълване на анкета за начина на живот. Проведени са биохимични изследвания за определяне нивата на триглицериди, общ холестерол, HDL и LDL холестерол и кръвна захар. Чрез анкетни методи се събра информация за хранителния, изчислени е приема на енергия, микро- и макро- нутриенти, витамини.

Единичният нуклеотиден полиморфизми (single nucleotide polymorphism, SNP) означен *rs174547*(C/T), разположен в гена *FADS1*, кодиращ едноименната десатураза е обект на особен научен интерес. Според някои изследователи С-алела на този полиморфизъм има отношение към понижени нива на LDL-холестерол в човешката плазма, а също така се описва значима връзка между определени варианти на *rs174547* и съотношението на ALA и LA мастните киселини, постъпващи екзогенно, и нивата на HDL холестерол. В настоящия труд се определят генетичните варианти на *rs174547* полиморфизма при група от доброволци, заедно с оценка за хранителния прием, (с основен фокус насочен към хранителните мазнини), данни за липидния и общ здравен статус. Оценявани са и факторите на риск за развитие на хронични заболявания, както и цялостния начин на живот.

За определянето на точния генен вариант на всеки доброволец е използван следният подход. Първоначално е разработена авторска система за провеждане на полимеразна верижна реакция, чрез която се размножават ампликони, съдържащи търсеният полиморфизъм във *FADS1* гена, чрез

праймерна двойка, конструирана от нас специално за тази цел. Следващата стъпка е потвърдителен секвенционен анализ в лаборатория в чужбина. След което, праймерната система е съпоставена със съществуващ на пазара готов амплификационен кит за детекция на *rs174547*. Системата е успешно валидирана, като се потвърди, че секвенираните ДНК ампликони, съдържат и двата варианта на този полиморфизъм. В по-нататъшната лабораторна дейност те служиха за надеждни и потвърдени позитивни контроли. (Фиг.10)



Фигура 10. Дизайн на проучването и използваните методи във всеки етап

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

5.2 Разработване и имплементиране на методология за анализ на rs174547 генетичен полиморфизъм

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

Целта на разработването, адаптирането и проверката на собствена праймерна двойка за откриване и анализ на генетични варианти на *FADS1* (*rs174547* SNP) беше да се тества в малък мащаб (пилотно проучване) методология, която в последствие да се приложи в по-мащабно проучване. От особена важност беше и чрез получените резултати да отдеференцираме и надеждни позитивни контроли, които да използваме в по-нататъшните експерименти.

За тази цел, пилотна група от 10 субекта от български доброволци беше избрана на случаен принцип и тествана с цел да се проверят оптимизираните условия. След стандартно извличане на ДНК от букална лигавица бе провеждана полимеразна верижна реакция, намножаваща 243 bp фрагмент, с търсения С или Т SNP, съдържащ се вътре. Ампликонът се визуализира след 40 минутна хоризонтална електрофореза върху 2% агарозен гел. След това продуктите - ампликони, съдържащи интересувания ни генен участък, бяха анализирани на капиларен секвенатор (чрез секвениране по метода на Сангер) и получените данни бяха разчитани и анализирани със софтуера MEGA5.

Б. Софтуер за дизайн на праймерни двойки и сонди

За дизайн на праймери и сонди бе използван софтуер Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Техниката изисква въвеждане на човешка частична геномна последователност (**Фиг. 11**),

получена от базата данни на dbSNP генома (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) чрез номер за присъединяване на целевия SNP (*rs174547*).

```

1   CGGCGAAGGC TGACAGCAGG GGCTTGGACT GGTACTCTAT GCCATGCTTG GCACACAAGG
61  ACTGCACCAG GGGAGCCACT TTGTGGTAAT TGTGTCGAGG CATCGTGGGA AAAAGACTTT
121 AGGGAGAACG GGGGAGTCAG TGGTTCCTGC TTCTCTGCTC CCACCTGTAC CCAACACTTA
181 CACCCTCCCC AGGACCCTGC TTCCCCAGGC TCCCTACTCA CTGGTGCTCA ATCTGGAAGT
241 TGAGGTGTCC ACTGAACCAG TCATTGAAGG CAGACTTGTG GACATTGCAT GTGGCCTGGA
301 GCTGGCGGAA AAGGTCAGGG GAGAGCATGT TGAATATCAG ATGGAAAGGC CAGCCCAGCA
361 TTCTCCAGGT AAAGCTGGCT GAGGAAGGGA CATGAGACTG TCTTGGTCAC TCCCTTCACA
421 TGGTTGCAGA ACAAGAGCCT CAGGCTAATG AGAAAATGCT GTTTGGGGGA CTTTTTGTTT
481 TTGCTGTTTT CACCTAOGCA
Y (rs174547)
502 CCTTTCAAT AGTGTGTGTTA TGCTCCAGTC TTCTGAGTGA CTGTCCCTTA CCTGGGTGGA
562 AACCCAGTCC ATGTTCCGGT CATGATCAAT GTGCATGGGA ATATGGTTCA TCTGTGTCC
622 CCACACAAAC CAGTTGCTTT CCAGGAACCT GTTAGATGTA TTACACAGAC AAAAAACAGTA
682 CACACAGAGC CCAGAATTCT GATTCCCCC TCAGATAACT GCTCCAGCCT GTCTACTTTC
742 CCAAGCCAAC TCCTGAAACA CCCACTGTTA CCCAAGGCC CAGCACGGCC CCTAGACCAG
802 ACTGGTCACT CCCCACATT TCCTCACCA GTCCTATCC GCCCCCACCG AATACTACTC
862 GACTATGAAG AAAAGGCCCA GGAAGGCTTT CAGCCCCAAT AGTGGCACAT AAGTGAGGAA
922 GAAGCGGACG TAGAAGGTAА TCATCCAGGC CAAATCCTAT AGTGAGAAAA GCAGCGAGCA
982 TAACAGTCAC GAACAАCTC

```

Фигура 11. Човешка частична геномна последователност, съдържаща таргетното SNP *rs174547* отбелязано като Y; Праймер F и Праймер R са индикирани с удебеляване и подчертани

При генерирането на праймер се определят няколко параметъра, като например: размера на ампликона; съдържанието на GC; и др. Когато завърши дизайна на сета от праймери, се генерира доклад с подробна информация за всяка двойка. Няколко последователности бяха избрани за синтез, като най-добрите първоначални резултати бяха получени с праймерна двойка, именувана FADS1-F и FADS1-R. Избраният специфичен праймерен сет, определен за целевия SNP регион, амплифицира 243 bp ДНК последователност. Един праймер се състои от 20 bp със следната последователност: **CAC TCC CTT CAC ATG GTT GC**; а другият бе също с дължина от 20 bp, с дадена последователност: **GGT TCC TGG AAA GCA ACT GG** (Таблица 5).

Таблица 5. Параметри на проектирания праймерен сет, съдържащ *FADS1-F* и *FADS1-R* праймери

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

В. Процес по оптимизация на PCR реакцията

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

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

Амплификационните продукти с таргетния С/Т SNP вътре се визуализират след 40 минути хоризонтална електрофореза върху 2% агарозен

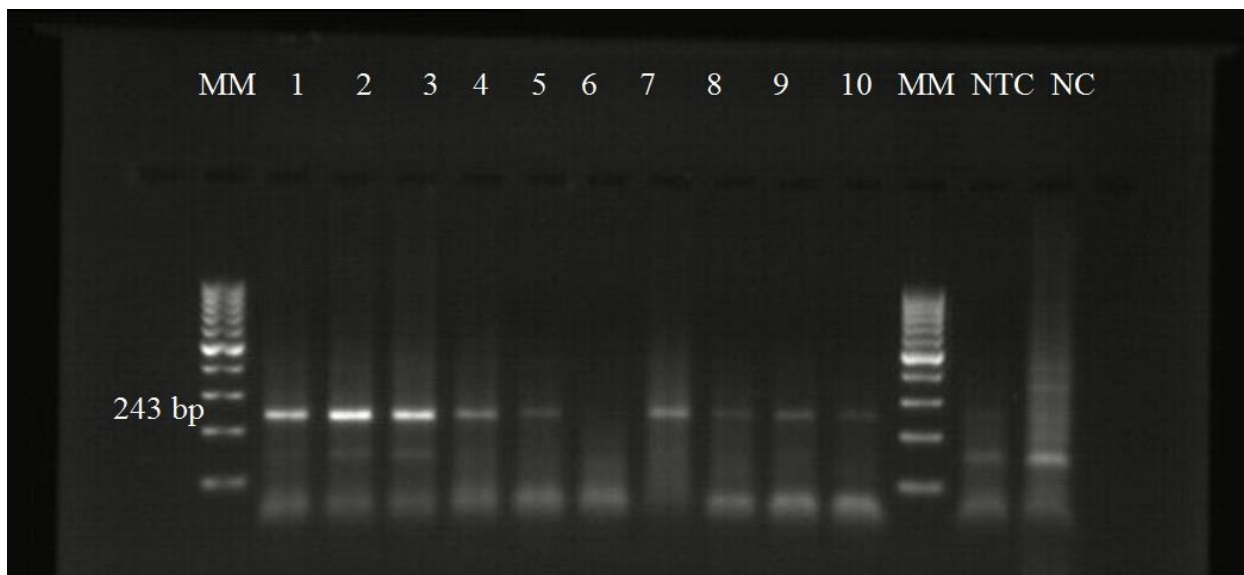
гел, оцветен с етидиев бромид, като се използва 6x Orange Loading Dye® и 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

За приготвяне на 1%, 1.5% или 2% агарозен гел беше използвана висококачествена агароза (Merck KGaA, Germany, Cat.No K3573739 705), разтапяна в 50 ml 1 x TBE буфер с помощта на микровълнова печка (Whirlpool JT359). След охлаждане на сместа до около 60°C беше добавян етидиев бромид (1%, 10 µl/100 l H₂O) за получаване на крайна концентрация от 0.5 mg/ml. Агарозата беше изливана внимателно, като не се позволява образуване на мехурчета, в мини-вана за хоризонтална електрофореза (SCIE-PLAS, HOLO HU10, UK) със съответен гребен за образуване на стартови позиции. След полимеризацията на агарозата (за 30-45 минути на стайна температура) бе добавян електрофоретичният буфер (1X TBE) и пробите бяха нанасяни на стартовите позиции в обем от 24 µl (20 µl проба + 4 µl 5X loading buffer). Електрофорезата бе провеждана за 40 минути при постоянна сила на тока и напрежение от 100 V

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

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

Агарозен гел след електрофореза, проведена непосредствено след конвенционалния PCR анализ е показан на **Фигура 12**. Визуализирани са продуктите на реакцията и е отбелязан таргетния ампликон от 243 базови двойки (bp).



Фигура 12. Гел електрофореза след проведена конвенционална PCR реакция за визуализация на целевия продукт. Очакваният ампликон е с размер от 243 bp, а на позиции от 1 до 10 са визуализирани продукти от непознати проби; MM-молекулен маркер (100 bp DNA Ladder); NTC (non template controls) - контроли без генетичен материал; NC (negative control)-отрицателна контрола (бактериална ДНК)

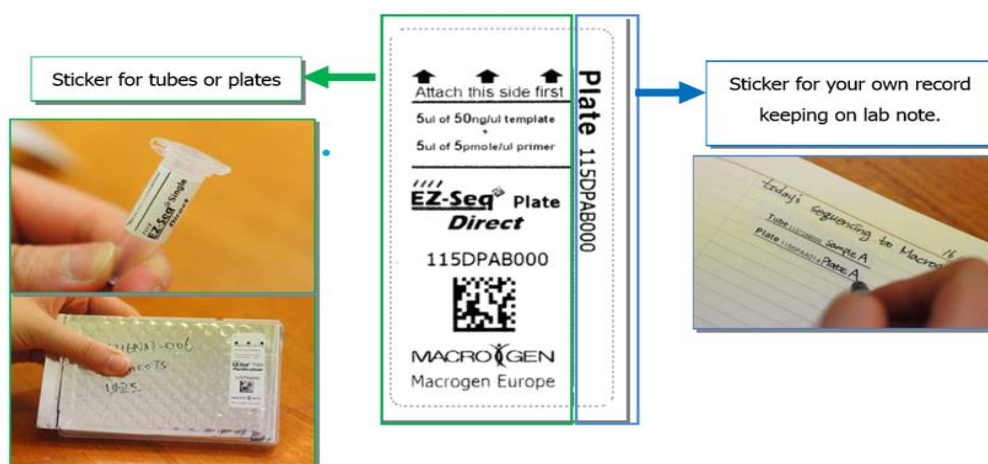
Резултатите от електрофорезата на агарозния гел показват много отличителна илюминираща ивица като PCR продукт, разположена между 200 и 300 bp в сравнение с молекуления маркер. Има и други продукти (ивици), които могат да се видят на агарозния гел между 100 и 200 bp, което показва наличието на друг PCR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

Специфичността на получените продукти беше проверена чрез секвениране по Сангер в независима лаборатория в Холандия (Macrogen Europe, Amsterdam, Netherlands). За целта пробите бяха подготвени и етикетирани със специални стикери, според указанията на лабораторията изпълнител. Получените данни бяха прочетени със софтуера MEGA5, като

беше създадено консенусно изравняване и беше определен С/Т полиморфизма за всяка проба.

Процеса на подготовка на пробите за изпращане в лаборатория Macrogen (Amsterdam, the Netherlands) може да се види на следващите снимки (Фиг. 13).

Подготовката включва пречистване на PCR продукта, предварително смесване на праймерите с пробата ДНК и кодиране съгласно специални EZ-seq кодираща система на външната лаборатория, с цел запазване на конфиденциалност и протекция от загуба на информация или грешка.



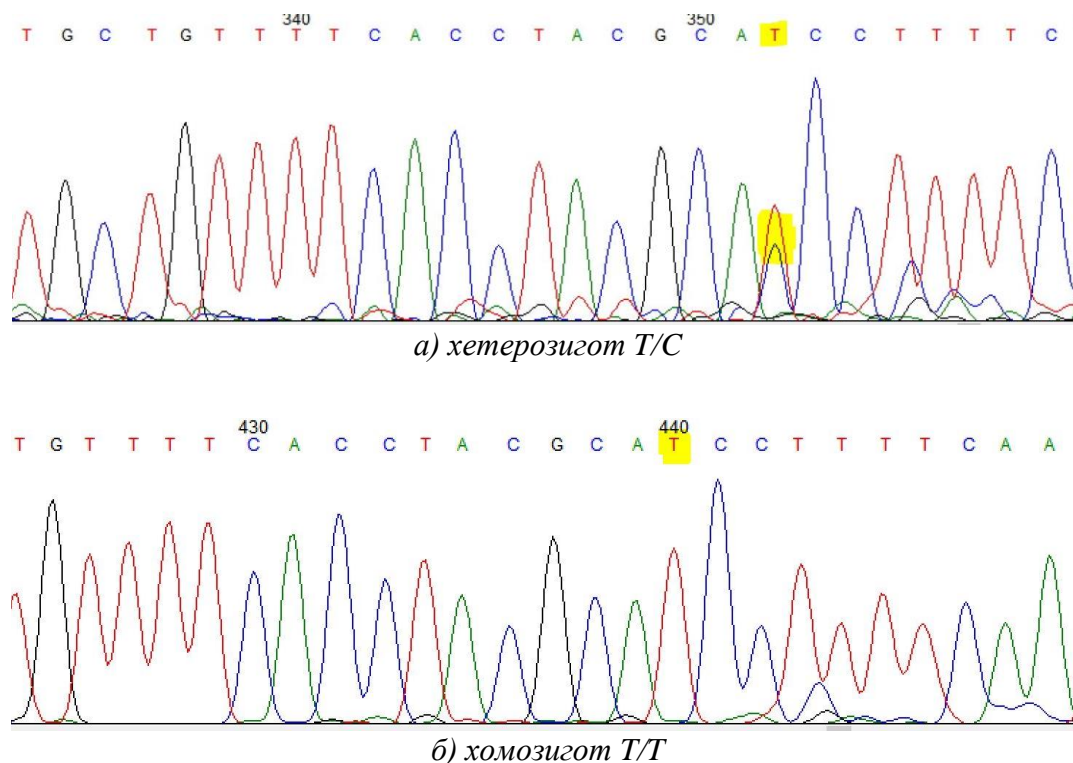
Фигура 13а) Схема на системата за етикетиране на пробите EZ-seq при секвениране



Фигура 13б) Подготовка на реалните проби на доброволците от пилотното проучване

Представителни секвенции след процеса на секвениране, показващи анализирания полиморфизъм $rs174547$ в хетерозиготен и хомозиготен вариант са дадени на Фигура 14. Отбелязано е мястото, на което се появяват

два секвенционни пика (с червен и син цвят), отговарящи съответно на нуклеотидните бази Т и С (хетерозиготен вариант) или се установява само единия алел, в случая Т (хомозиготен вариант.) На отбелязаното място ясно личи само един секвенционен пик (с червен цвят), отговарящ на нуклеотидната база Т.



Фигура 14 Представителни секвенции, показващи анализирания полиморфизъм rs174547: а) хетерозиготен вариант (т.е притежава и двата алела С и Т). Мястото, на което се появяват два секвенционни пика (отбелязани с червен и син цвят), отговарят съответно на нуклеотидните бази Т и С; б) хомозиготен вариант - наблюдава се само единия алел отбелязан с червен цвят, отговарящ на нуклеотидната база Т; Данните са обработени и визуализирани с *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5 Software)*

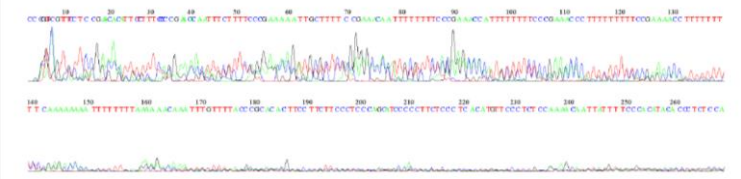
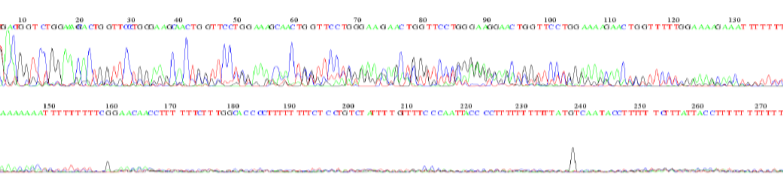
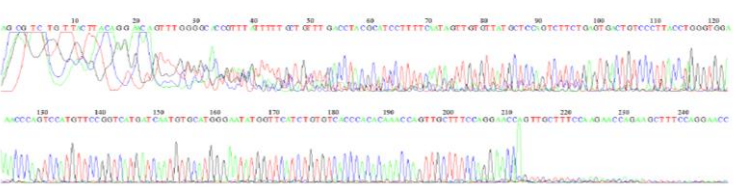
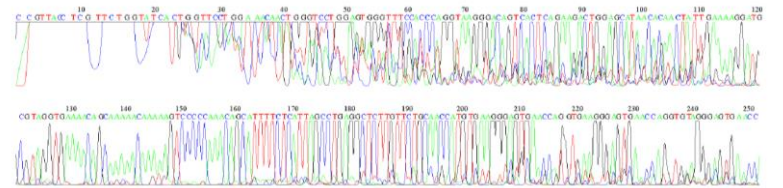
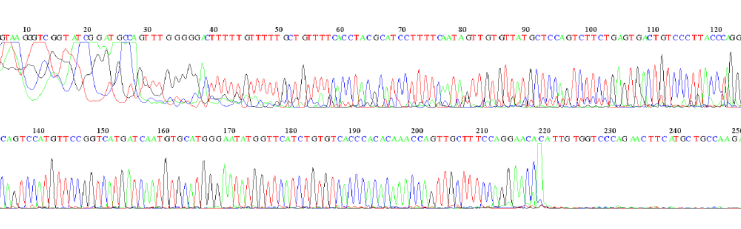
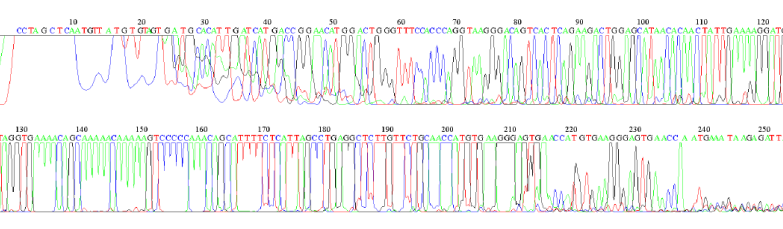
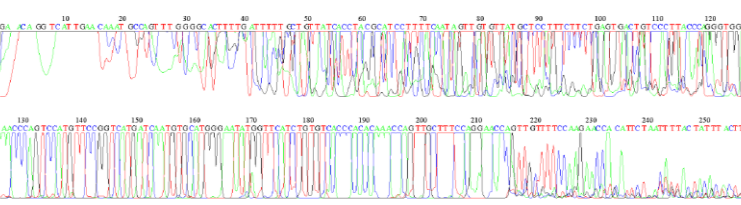
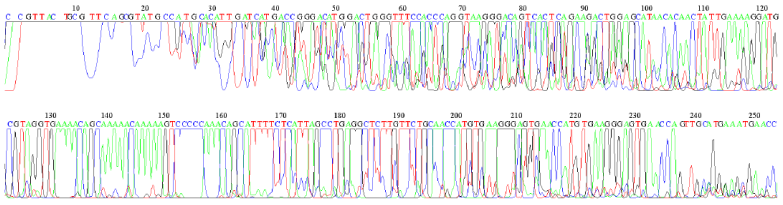
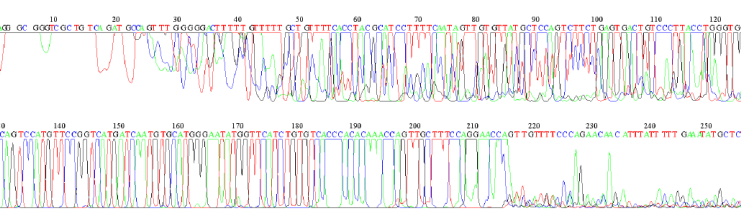
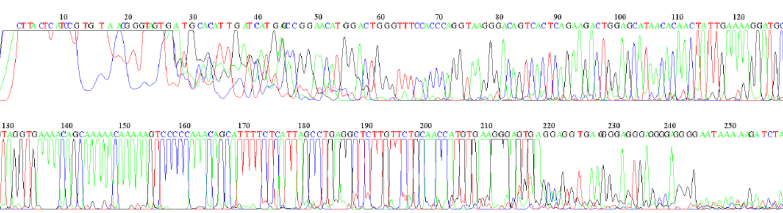
Части от секвенционните протоколи на десетте проби от пилотното проучване означени с S1 до S10 са показани на **Таблица 6**. С помощта на програма за четене на секвенции и молекулярно-генетични анализи MEGA5

Software, са открити точните позиции на единичния нуклеотиден полиморфизъм, който ни интересува и е съставено т.нар. секвенционно подравняване за сравняване на последователностите и диференциране на съответния олигонуклеотид в ДНК последователността.

Резултатите показват, че в първите две проби S1 и S2 се откриват и двата алелни варианта, защото на тази позиция има обособени два секвенционни пика и следователно носителите на този генетичен вариант са хетерозиготни.

Останалите секвенции от S3 до S10 имат само по един пик – за нуклеотидната база тимин (Т), което значи, че носителите на този генетичен вариант са хомозиготни и имат само Т алелен вариант (**Таблица 6**).

Както се вижда от резултативните данни от секвенирането в тези 10 проби няма хомозиготни представители на С варианта т.е С/С. Това се потвърждава и в следващите етапи на проучването, където броят на изследваните проби е 113 и показва, че този вариант на полиморфизма *rs174547* е сравнително рядък в популацията, от която е направена извадката.

Sample DNA	Forward seq (F)	Reverse seq (R)
S6		
S7		
S8		
S9		
S10		

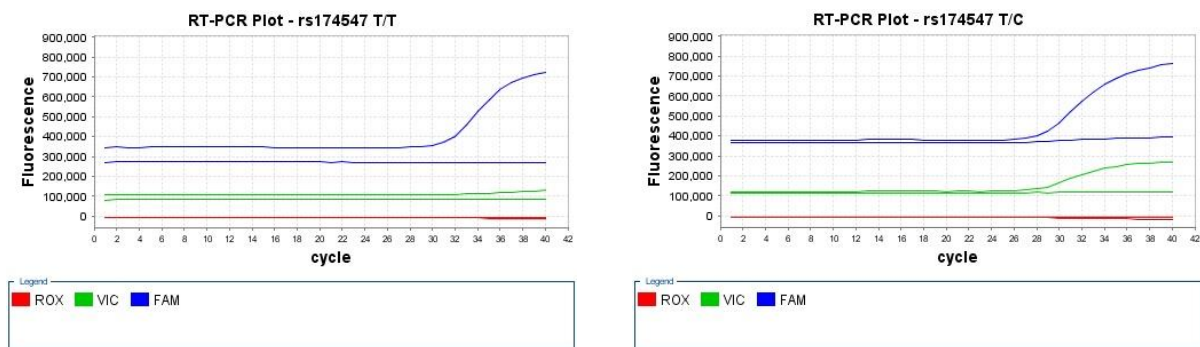
Получените след анализ резултати от секвенционното подравняване са обобщени на **Фигура 15**. Маркираната в сиво колона, е точната позиция на изследвания от нас *rs174547* полиморфизъм, с двата алелни варианта – Т и С съответно. На първия ред на таблицата е представена частична геномна последователност на човека, получена от dbSNP геномната база данни, служеща за референтна ДНК последователност.

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

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

Представителни резултативни амплификационни плотове, след проведена Real-Time PCR реакция са показани на **Фигура 16**. Получените флуоресцентни криви на непознатите ДНК проби, са съпоставени спрямо данните от негативна контрола. За провеждане на дадените Real-Time PCR реакции са използвани готови комерсиални китове, които включват специфично проектирани флуоресцентно белязани сонди (детектори). При протичане на реакция детекторите генерират сигнал, който се отчита в съответен цвят (канал с филтри за детекция на флуоресценция с точно определени параметри). Генерираният сигнал съответства на намножен (амплифициран) участък от ДНК, който ни интересува и по този начин се

получава PCR амплификационната крива на съответната непозната ДНК проба. На **Фигура 16** отчетливо е визуализирано логаритмично нарастване само на една амплификационна крива (син цвят, **Фиг. 16а**) спрямо използваната негативната контрола при хомозиготите и подобно логаритмично нарастване и на двете криви (син и зелен цвят, **Фиг. 16б**) при пробите на лица с полиморфизъм определен като хетерозиготен.



а)

б)

Фигура 16. Real Time PCR амплификационна графика: **а)** наблюдава се специфична амплификационна крива (визуализирана като сигмоидна крива на нарастване на флуоресцентния сигнал) и липса на амплификация (прави линии), съответно в проба съдържаща само алел Т (хомозиготен индивид по алел Т) и негативна контрола; сигналите за алел Т са индикирани чрез детектор излъчващ във FAM-канал, който на графиката е показан със син цвят; **б)** амплификация на ДНК последователности, съдържащи и двата алела-Т и С (сигмоидни криви) и липса на амплификация при отрицателна контрола (прави линии); сигналите при проба на индивид определен като хетерозиготен в изследвания полиморфизъм са индикирани чрез детектор излъчващ във FAM-канал, който на графиката е показан със син цвят за алел Т и чрез детектор генериращ флуоресценция във VIC-канал - в зелен цвят, за алел С.

В заключение, с получените резултати демонстрираме, че проектираната FADS1 двойка праймери е специфичен и надежден инструмент за получаване на целевия ампликон. Последващото секвениране по Сангер разкрива точната нуклеотидна вариация, класифицирайки неизвестните проби като хомозиготи (проби, имащи само алел С или алел Т) и хетерозиготи (проби, имащи и алел С, и алел Т). Тази информация дава на изследователите визия за степента на влияние на

дадения SNP върху метаболитните пътища и също така има прогнозна роля за развитие на бъдещи хронични заболявания и състояния.

Науката за нутригеномиката и нутригенетиката определено има оптимистична позиция по отношение на това знание и доказва, че повечето отрицателни последици, предвидени от присъствието или отсъствието на определен SNP, могат да бъдат модифицирани и повлияни от прости промени в начина на живот и хранителните навици (2). Това дава на човечеството друга, доказана от науката линия на защита срещу развитието на бъдещи хронични заболявания като сърдечно-съдови заболявания, диабет тип 2, затлъстяване, инсулинова резистентност, болест на Алцхаймер и други.

От приложените молекулярно-генетични методи и подходи за генотипиране и получените резултати при изследваните лица могат да се направят следните изводи:

- ✓ Използвайки предложената методология, веднъж открит и определен SNP *rs174547* може да предостави ценна информация относно метаболизма на отделните мастни киселини и може да подкрепи диетолозите, когато се преценяват хранителните изисквания за омега-3 и омега-6 мастни киселини.
- ✓ Разработената и валидирана методология би могла да даде на изследователите инструмент за получаване на епидемиологични данни относно генетичното разпространение на конкретния SNP сред българското население, което е новаторство за България.
- ✓ Въвеждането на C/T SNP като молекулярен биомаркер би позволило да се направи индивидуална оценка на метаболизма на мастните киселини. По този начин, ако така разработената и изпитана методология се приложи в по-широк мащаб, ще помогне да се проучи връзката и

влиянието между генетичната предразположеност, индивидуален метаболизъм и прием на храна.

- ✓ Предложената система за откриване и анализ на SNPs в гена FADS1 беше оптимизирана и изпробвана за първи път в България. Резултатите от пилотното проучване представляват първични данни, произхождащи от български индивиди.
- ✓ Показано беше, че при оптимизирани реакционни параметри, избраната праймерна система произвежда ампликон с очаквания размер, който съдържа фрагмент от FADS1 гена, с анализирания C/T SNP вътре.

5.3 Основни характеристики на популационната група

Генният вариант на *rs174547* във FADS1 гена е изследван при общо 123 доброволци от регионите Плевен и София. Включените лица са на възраст от 28 до 65 години, като от тях 43 са мъже (43/123, 35%) и съответно 80 жени (80/123, 65%). Средната възраст на групата е 53 (SD=11, Me=54), като при мъжете тя е 53 (SD=11, Me=54), а при жените 52 (SD=11, Me=54) (Таблица 7).

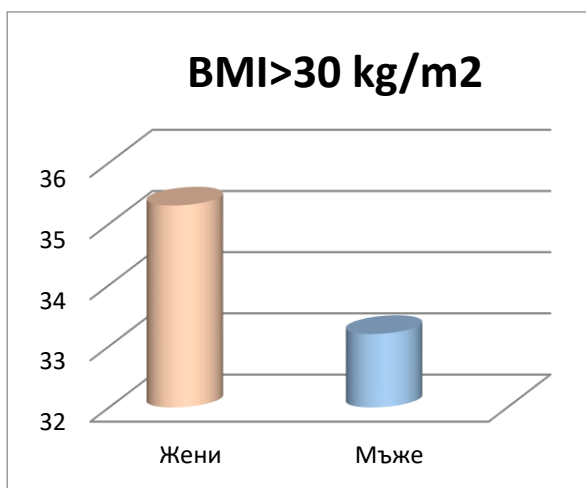
Таблица 7. Основни характеристики на изследваната група – средна възраст, среден индекс на телесната маса (BMI), средни нива на артериално налягане (А.Н.), разделени по пол

Показател	Общо			Жени			Мъже		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Възраст	53	11	54	52	11	54	53	11	54
BMI (kg/m ²)	29.4	5.5	28.8	29.1	6.0	28.1	29.9	4.5	30.0
Затлъстяване (BMI > 30kg/m ²)	34.4	4.2	33.3	35.3	4.7	34.3	33.2	3.3	32.1
Систолно А.Н. (mmHg)	130	21	130	128	22	130	134	19	130
Диастолно А.Н (mmHg)	83	11	80	82	12	80	85	9	85

В изследваната група средната стойност на BMI (kg/m^2) е 29.4 ($\text{SD}=5.5$, $\text{Me}=28.8$). Забелязва се тенденция към по-висок индекс на телесната маса при мъжете 29.9 ($\text{SD}=4.5$, $\text{Me}=30.0$), отколкото при жените – 29.1 ($\text{SD}=6.0$, $\text{Me}=28.1$). Парадоксално на тези резултати при жените със затлъстяване (т.е с BMI повече от $30 \text{ kg}/\text{m}^2$), средната изчислена стойност на BMI е 35.3, докато при мъжете средната стойност на BMI е $33.2 \text{ kg}/\text{m}^2$ (Фиг. 17 и Фиг. 18).



Фигура 17 Средната стойност на BMI в g/m^2 при двата пола



Фигура 18. Доброволци със затлъстяване ($\text{BMI} > 30 \text{ kg}/\text{m}^2$)

Индексът на телесната маса (BMI) е важна антропометрична характеристика, служеща за определяне на хранителния статус и нормалното, здравословно тегло в зависимост от ръста. ИТМ се изчислява като се раздели теглото в килограми на ръста в метри повдигнати на квадрат: $\text{ИТМ} = \text{тегло в кг.}/(\text{ръст в метри})^2$. За възрастни над 20 години ИТМ попада в една от следните категории, представени на **Таблица 8**.

Както може да се види от резултатите повечето от изследваните лица попадат в категорията на предзатлъстяване ($\text{BMI}=25-29.99$), като са по-близо до горна границата т.е близо до същинското затлъстяване. Направеният статистически анализ показва, че общо 50 човека (42%) са с $\text{BMI} \geq 30.0$ и така попадат в групата на хората със затлъстяване, което има

пряко влияние върху сърдечно-съдовия риск и холестероловия профил (90).

Таблица 8. Индекс на телесната маса (ИТМ, BMI) според Световната здравна организация (не са взети предвид възрастта и пола)

Индекс на телесна маса (BMI, kg/m ²)	Хранителен статус
< 18,5	Поднормено тегло
18.5–24.9	Нормално тегло
≥ 25,0	Наднормено тегло
25 — 29,99	Предзатлъстяване
≥ 30,0	Затлъстяване
30 — 34,99	Затлъстяване I степен
35 — 39,99	Затлъстяване II степен
≥ 40,0	Затлъстяване III степен

Референтните граници на BMI се основават на ефекта, който прекомерната телесна мазнина оказва върху заболяемостта и смъртността и тези взаимодействия са едни от най-изучаваните в медицината. BMI е разработен като индикатор за риск от заболяване - с увеличаване на BMI, нараства и рискът за развитие на някои болест. Често срещани състояния, свързани с наднорменото тегло и затлъстяване, включват: сърдечно-съдови заболявания и дислипидемии, високо кръвно налягане, остеоартрит, някои видове рак и диабет тип 2 (3, 16, 83, 176).

В настоящето изследване се установява, че средната стойност на систолното артериално налягане (RR) е 130 mmHg (SD=21, Me=130), като е леко по-високо при мъжете - 134 mmHg (SD=19, Me=130), отколкото при жените - 128 mmHg (SD=22, Me=130) без тази разлика да е статистически значима. Средната стойност на диастолното RR е 83 mmHg (SD=11, Me=80), като отново при мъжете се наблюдават леко по-високи стойности RR=85 mmHg (SD=9, Me=85) в сравнение с жените RR=82 mmHg (SD=12, Me=80) отново без статистически значима разлика. Според критериите на СЗО за артериална хипертония (**Таблица 9**) доброволците от настоящето проучване попадат на границата между нормално и високо нормално артериално налягане.

Таблица 9. Класификацията на хипертонията според Световната здравна организация:

Категория	Систолно RR /mmHg/	Диастолно RR /mmHg/
Оптимално	<120 и	<80
Нормално	120-129 и / или	80-84
Високо нормално	130-139 и / или	85-89
Хипертония I степен	140-159 и / или	90-99
Хипертония II степен	160-179 и / или	100-109
Хипертония III степен	≥180 и / или	≥110

Артериалното кръвно налягане е един от „виталните признаци” и е важен индикатор за здравословното състояние на човека. Абнормно повишеното артериално налягане е маркер за хипертония, която от своя страна е основен рисков фактор за сърдечно-съдови, мозъчно-съдови, бъбречно-съдови и други съдови заболявания. Хипертонията се определя като постоянно повишено артериално налягане, тоест налягане което превишава условно приетото за нормално ниво.

Прави впечатление, че към момента на измерване на кръвното налягане повечето участници в проучването (60.8%) са с нормални стойности, но 58.8% (n=70) от тях съобщават в анкетната си карта, че имат поставена диагноза артериална хипертония. От тях 54.7% (n=41) са жени и 65.9% (n=29) са мъже (**Таблица 10**). Нормалните стойности на артериалното налягане най-вероятно се дължат на добро овладяване на състоянието или чрез медикаментозно лечение или чрез подходящ хранителен и двигателен режим. Диагнозата „хипертония” трябва да бъде основана на множество измервания на артериалното налягане при няколко посещения в лекарския кабинет. Приема се диагноза артериална хипертония, когато при две измервания в две амбулаторни посещения средната стойност на артериалното налягане надвишава 140/90 mmHg.

Трябва да се отбележи, че нивото на артериалното налягане търпи значителни колебания в рамките на денонощието или на по-големи периоди от време. Артериалното налягане се влияе от нивото на активност

– натоварване, почивка, степен на бодрост или сън, фактори на средата като температура, настроение, емоционални и физиологични фактори, които повлияват отговора към външни и вътрешни дразнители.

На **Таблица 10** са представени обобщени резултатите относно вече диагностицирани заболявания при доброволците, базирани на отговорите им на анкетните въпроси, отнасящи се до здравословно състояние и начин на живот.

Таблица 10. Участници в проучването с поставени преди това диагнози съгласно отговорите на попълнените анкети, разпределени по пол

Поставена диагноза		Общо		Жени		Мъже	
		n	N %	n	N %	n	N %
Артериална хипертония	Да	70	58.8%	41	54.7%	29	65.9%
	Не	49	41.2%	34	45.3%	15	34.1%
Повишен кръвен холестерол	Да	53	44.2%	31	40.8%	22	50.0%
	Не	67	55.8%	45	59.2%	22	50.0%
Повишена кръвна захар	Да	33	28.7%	22	29.7%	11	26.8%
	Не	82	71.3%	52	70.3%	30	73.2%
Инфаркт на миокарда	Да	3	2.6%	2	2.7%	1	2.4%
	Не	111	97.4%	71	97.3%	40	97.6%
Стенокардия (гръдна жаба)	Да	17	14.5%	12	16.0%	5	11.9%
	Не	100	85.5%	63	84.0%	37	88.1%
Сърдечна недостатъчност	Да	7	6.1%	5	6.8%	2	5.0%
	Не	107	93.9%	69	93.2%	38	95.0%

От всички анкетирани (n=120), 58.8% са докладвали, че в миналото са били диагностицирани с диагноза артериална хипертония, от които 54.7% са жени, а 65.9% са мъже. Повишен кръвен холестерол докладват 44.2% от всички отговорили, като 40.8% от жените и 50.0% от мъжете са отговорили с „да“ на този въпрос.

За повишена кръвна захар докладват общо 33 от анкетираните, като 22 са жените, а 11 мъжете. Процентното съотношение спрямо всички изследвани лица е 29.7% жени и 26.8% мъже, които са дали позитивен отговор на въпроса „Поставяна ли Ви е диагноза повишена кръвна захар?“. За инфаркт на миокарда съобщават едва 2.6% от хората, като от тях 2 жени

и един мъж, а за стенокардия 17 човека или 14.5% от всички анкетиранни - от тях 12 жени и 5 мъже. Диагноза сърдечна недостатъчност в миналото е била поставена на общо 7 доброволци в проучването или 6.1% от всички анкетиранни - 5 от които са жени, а останалите 2-ма са мъже.

Всички по-горе описани диагнози имат пряка или косвена връзка с повишените нива на метаболитите от холестероловия профил, което пък от своя страна би могло да е в някаква степен повлияно от изследвания от нас единичен нуклеотиден полиморфизъм *rs174547*, чрез различни молекулярно-генетични и метаболитни взаимодействия.

Небезизвестен факт е, че тютюнопушенето оказва редица неблагоприятни ефекти върху мрежата от кръвоносни съдове, плазмения холестерол, оксидативния стрес и общото възпаление и така повишава значително риска от сърдечно-съдови инциденти (113)

Данните в **Таблица 11** обобщават отговорите на участниците в проучването относно навика тютюнопушене. Прави впечатление, че само 49 човека се самоопределят като пушачи или 40.5% от всички анкетиранни. От тях 37 са жени и 12 - мъже. Относителният дял на жените пушачки е 48.1% от всички изследвани жени, а този на мъжете пушачи – 27.3% от всички мъже.

Таблица 11. Участници в проучването пушачи/непушачи, разделени по пол

	Общо		Жени		Мъже	
	N	N %	n	N %	n	N %
Пушачи	49	40.5%	37	48.1%	12	27.3%
Непушачи	72	59.5%	40	51.9%	32	72.7%

На **Таблица 12** са показани обобщените данни от бодиимпедансметрията на участниците в проучването. Анализът на телесния състав е извършен с Tanita Body Composition Analyser, като в него са включени теглото и преизчислен индекс на телесната маса (BMI),

базален метаболитен разход на енергия, процентно съдържание на мазнини в тялото, мастна маса и съдържание на вода в организма.

Таблица 12. Основни характеристики на телесния състав на тялото при доброволците, разделени по пол.

	Общо			Жени			Мъже		
	Mean	SD	Me	Mean	SD	Me	Mean	SD	Me
Ръст (см)	166	13	165	161	13	163	175	7	176
Тегло (кг.)	81.9	17.3	79.6	76.5	16.1	73.6	91.2	15.1	92.6
BMI (kg/m ²)	29.4	5.5	28.8	29.1	6.0	28.1	29.9	4.5	30.0
BMR (kcal)	1590	277	1527	1440	172	1421	1846	230	1852
Fat %	34.9	8.4	34.6	38.4	7.3	40.0	29.1	6.8	29.7
Fat Mass (kg)	29.8	11.2	28.8	30.7	12.0	29.2	28.3	9.6	27.7
FFM (kg)	52.1	10.6	50.0	45.6	5.2	44.7	63.3	7.9	63.8
TBW (kg)	40.3	8.8	38.5	35.6	6.4	33.5	48.4	6.0	48.3

Анализът на телесния състав е извършен с Tanita Body Composition Analyser; телесно тегло в kg, индекс на телесна маса (BMI) в kg/m², мастна тъкан (Fat Mass) в kg, мастна тъкан в %, свободна мастна маса (FFM) в kg, обща вода в организма (TBW) в kg, основна обмяна (BMR) в килокалории (kcal)

Средната стойност на теглото на участниците в проучването е 81.9 kg. (SD=17.3 Me=79.6). Средното тегло при жените е 76.5 kg. (SD=16.1 Me=73.6), а при мъжете 91.2 kg. (SD=15.1 Me=92.6). BMI на изследваните лица и категориите на обезитет, в които попадат те, беше представен по-нагоре в настоящата глава.

Базалното метаболитно ниво (BMR) е индикатор колко енергия използва ("изгаря") организма в състояние на покой, извършвайки нормалните си метаболитни функции. То може да бъде представено в килокалории или килоджаули. Често експертите използват този индикатор, за да оценят колко бърз е метаболизма и да съставят хранителен и двигателен режим за различни цели - редуциране/покачване на теглото, изграждане на мускулна маса и т.н. Средната стойност на BMR на

участниците в това проучване е 1590 kcal (SD=277 Me=1527). Очаквано за жените този показател е по-нисък BMR=1440 kcal (SD=172 Me=1421), а при мъжете BMR=1846 kcal (SD=230 Me=1852).

Процентното съдържание на мазнини (Fat %) при доброволците средно е 34.9% (SD=8.4 Me=34.6). Разликата в средните стойности на телесните мазнини от 38.4% (SD=7.3 Me=40) при жените и съответно за мъжете 29.1% (SD=6.8 Me=29.7) е 9.3%. Измерена е и мастната маса в килограми (kg) като обобщените данни показват средна стойност на телесната маса от 29.8 kg (SD=11.2 Me=28.8) – където 30.7 kg е средно за жените (SD=12.0 Me=29.2) и съответно 28.3 kg - за мъжете (SD=9.6 Me=27.7). Бодиимпедансметрията дава възможност да се изчисли и свободната мастна маса в тялото (FFM). Средно за участниците в това проучване тя е 52.1 kg (SD=10.6 Me=50.0) – 45.6 kg (SD=5.2 Me=44.7) при жените и 63.3 kg (SD= 7.9 Me=63.8) при мъжете.

Резултатите от анализа на телесния състав показват, че средната стойност на общата вода в организма (TBW) в килограми е 40.3 kg (SD=8.8 Me=38.5). Тази стойност е доста по-ниска при жените - 35.6 kg. (SD=6.4 Me=33.5), отколкото при мъжете – 48.4 kg. (SD=6.0 Me=48.3).

5.4 Клинични и биохимични показатели на участниците в проучването

Биологичната роля и функции на липидите и липопротеините, както и връзката им с кардиоваскуларните заболявания са едни от най-изучаваните в биологията и медицината. Липопротеините в плазмата транспортират липиди до тъканите за оползотворяване на енергия, отлагане на липиди, производство на стероидни хормони и образуване на жлъчна киселина. Липопротеините се състоят от естерифициран и нестерифициран холестерол, триглицериди и фосфолипиди и белтъчни компоненти. Последните се наричат аполипопротеини и действат като

структурни компоненти, лиганди за свързване с клетъчните рецептори, както и ензимни активатори или инхибитори. В кръвта се приемат шест основни липопротеина: хиаломикроци, липопротеини с много ниска плътност (VLDL), липопротеин със средна плътност (IDL), липопротеини с ниска плътност (LDL); липопротеин (a) (Lp (a)) и липопротеин с висока плътност (HDL). (Таблица 13)

Таблица 13. Физически и химически характеристики на плазмените липопротеини при човека.

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

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

Измерването на липидите и липопротеините се използва за оценка на риска от артеросклеротично кардиоваскуларно заболяване (Atherosclerotic cardiovascular disease - ASCVD) и като ръководство за терапевтично вземане на решения от специалистите. Количествена оценка на плазмените липиди може да се извърши с кръвна плазма, а количествено определяне на липопротеините се постига чрез измерване на техния протеинов компонент. Липопротеините се класифицират въз основа на тяхната плътност (вж. Таблица 13).

Ролята на липидите и липопротеините в патофизиологията на атеросклеротичните сърдечно-съдови заболявания също е един от най-дискутираните проблеми в науката. Всички съдържащи ApoB липопротеини с диаметър <70 nm, включително по-малки липопротеини, богати на TG и техните остатъчни частици, могат да преминат ендотелната бариера, особено при наличие на ендотелна дисфункция. Когато преминат ендотелната покривка, тези частици могат да „попаднат в капан“ в резултат на взаимодействие с редица извънклетъчни структури като например някои протеоглигани (150). Съдържащите ApoB липопротеини, задържани в артериалната стена, провокират сложен процес, който води до отлагане на липиди и често до инициране на атером (епидермални кисти, които могат да се развият, ако мастна жлеза или нейния канал се увреди или блокира). Продължителното излагане на липопротеини, съдържащи ApoB, води до задържане с течение на времето на допълнителни частици в артериалната стена, и до растежа и прогресията на атеросклеротични плаки. Най-общо, хора с по-високи концентрации на плазмени ApoB-съдържащи липопротеини ще задържат повече частици и ще натрупват липиди по-бързо, в резултат на което ще се наблюдава по-бърз растеж и прогресия на атеросклеротичните плаки. Тъй като плаките нарастват с времето в следствие на задържането на допълнителни липопротеинови частици, съдържащи ApoB, размера на общата тежест на атеросклеротичните плаки ще бъде детерминирана както от концентрацията на циркулиращ LDL-с (LDL-холестерол) и други ApoB-съдържащи липопротеини, така и от общата продължителност на излагане на въздействието на тези липопротеини. Следователно, общата тежест на атеросклеротичните плаки ще бъде пропорционална на кумулативната експозиция на тези липопротеини (48).

В крайна сметка увеличаването на тежестта на атеросклеротичните плаки, заедно с промени в състава на плаката достига критична точка,

което може да доведе до нарушаване на плаката с образуването на надслояващ тромб, който остро възпрепятства притока на кръв и води до нестабилна стенокардия (ангина пекторис), миокарден инфаркт или смърт. Следователно, рискът от преживяване на остро кардио-васкуларно събитие нараства, колкото повече се увеличават липопротеините, съдържащи АпоВ и се задържат, като така увеличават атеросклеротичната тежестта на плаката. Това дава обосновка за насърчаване на здравословен начин на живот за поддържане на ниски нива на съдържащи АпоВ липопротеини през целия живот, с цел да се забави прогресията на атеросклерозата. Тези процеси мотивират и препоръките, както и широката употреба на медикаменти (статици) за понижаване на LDL-с и други АпоВ-съдържащи липопротеини. Целта е както първична профилактика на ASCVD, така и вторичната профилактика на повтарящи се кардиоваскуларни събития (48). Резултатите от обобщените данни за биохимичните лабораторни показатели на доброволците от настоящето проучване са показани на **Таблица 14.**

За референтни граници на биохимичните показатели са приети граници съгласно препоръките на Европейската общност по атеросклероза (за липидния профил) (102) и съгласно Ръководство и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет (за кръвна глюкоза) (121). Все повече и по-систематични стават доказателствата за причинно-следствените ефекти на липидите и липопротеините върху риска от атеросклеротични сърдечно-съдови заболявания.

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

Таблица 14. Клинични и биохимични показатели (mmol/l) на участниците, с разпределение по пол

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

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

Богатите на триглицериди VLDL частици и техните остатъци носят по-голямата част от циркулиращите триглицериди в кръвта. Следователно, плазмената концентрация на TG отразява концентрацията на циркулиращи ApoB- съдържащи липопротеини, богати на TG. Повишените нива на TG в плазмата са свързани с нарастващ риск от ASCVD, но тази асоциация става нула след корекция за не-HDL-с, оценка на общата концентрация на всички ApoB съдържащи липопротеини (28). Изследователите предполагат, че всички съдържащи ApoB липопротеини имат идентичен ефект върху риска от кардиоваскуларни инциденти (49). Заедно, тези проучванията категорично предполагат, че причинно-следствения ефект на богатите на TG липопротеини и техните остатъци върху риска от ASCVD

се определят от концентрацията на циркулиращите ApoB-съдържащи частици, а не от самото съдържание на TG.

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

LDL-c в плазмата е мярка за холестеролната маса, пренасяна от LDL-частици, най-многобройните от съдържащите ApoB липопротеини, и е оценка на концентрацията на циркулиращия LDL. Многобройни епидемиологични и рандомизирани проучвания последователно демонстрират логаритмично-линейна връзка между абсолютните промени в LDL-c в плазмата и риска от атеросклеротични кардиоваскуларни заболявания (26, 28, 50, 72, 139). Освен това се установява забележителна съгласуваност между резултатите и съответно изводите от тези проучвания. Те в допълнение към биологичните и експериментално натрупаните данни, дават убедителни доказателства, че нивата на LDL-c са причинно обвързани с риска от развитие на ASCVD, както и че постигнати понижения в абсолютните стойности на LDL-c намаляват пропорционално риска от ASCVD (47). Освен това рандомизирани проучвания са показали че дългосрочната експозиция на по-ниски нива на LDL-c е свързана с много по-нисък риск от кардиоваскуларни събития в сравнение с по-краткосрочното излагане на по-нисък LDL-c (както се постига например при рандомизираните проучвания) (25, 50). Тези данни осигуряват силна подкрепа за концепцията, че LDL частиците имат както причинен, така и кумулативен ефект върху риска от ASCVD. Следователно, ефектът на LDL-c върху риска от ASCVD изглежда се определя както от абсолютната величина, така и от обща продължителност на излагане на LDL-c (47).

Определената средна стойност на липопротеините с висока плътност (HDL-Chol) при изследваните в това проучване лица е 1.45 mmol/l (SD=0.48 Me=1.34). Наблюдават се леки разлики между средните стойности на мъжете HDL-c=1.37 mmol/l (SD=0.48 Me=1.29) и жените HDL-c=1.49 (SD=0.48 Me=1.43). Според Европейската общност по атеросклероза без повишен риск са жени с HDL-c над 1.68 mmol/l и мъже с HDL-c над 1.45 mmol/l. (Таблица 3. Референтни стойности на биохимичните показатели в липиден профил).

Обратната връзка между плазмения HDL-c и риска от ASCVD е сред най-последователните и възпроизводими асоциации в обсервационната епидемиология (27, 28). За разлика от тях, Менделовите рандомизационните проучвания не предоставят убедителни доказателства, че HDL-c има причинно-следствена връзка с риска от ASCVD (52, 72). Тези проучвания обаче трябва да се тълкуват с повишено внимание, тъй като повечето генетични варианти, свързани с HDL-c, също са свързани с противоположни промени в TG, LDL-c или и двете. Така дизайна на Менделовото рандомизиране прави доста трудно изготвянето на оценки на ефекта на HDL-c върху риска от ASCVD.

Средното ниво на кръвна глюкоза, взета на гладно при участниците е 5.68 mmol/l (SD=1.25 Me=5.32). Отново не се наблюдава съществена разлика между половете: средна кръвна глюкоза при жените е 5.66 mmol/l (SD=1.30 Me=5.29), а при мъжете 5.72 mmol/l (SD=1.18 Me=5.47) като разликата е в рамките на лабораторната грешка. Относителния дял на лицата с повишени нива на кръвна глюкоза на гладно в настоящето проучване е 13.3% (n=13), спрямо 86.7% (104) на хората без отклонение в този показател. Референтни стойности съгласно Ръководството и препоръки за лабораторен анализ при диагнозата и лечението на диабет е 7.0 mmol/l (126 mg/dl), на гладно и 11.1 mmol/l (200 mg/dl), след натоварване с глюкоза или хранене. Кръвната глюкоза е лесен за

измерване кръвен показател, който участва в оценката на въглехидратния метаболизъм и диагностицирането на диабет, метаболитен синдром и затлъстяване. Често именно хората с дадените метаболитни нарушения са стратифицирани във високо-рискови групи по отношение развитието на атеросклеротични кардиоваскуларни инциденти. Затова включването в проучването и измерванията на показателя кръвна глюкоза води до цялостен панел от лабораторни показатели и по-адекватна оценка в състоянието на изследваните лица.

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

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

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

Алелната честота или честотата на гена е относителната честота на алел (вариант на ген) в определен локус в популация, изразена като част или процент. По-конкретно, фракцията от всички хромозоми в популацията носеща този алел. Съответно процеса на микроеволюция е

промяната в честотите на определени алели, като микроеволюционните процеси протичат с течение на времето в рамките на една популация.

Честотата на генотипа може да се използва за бъдещи предположения („геномно профилиране“), за да се предскаже, дали някой има или е предразположен към развитие на заболяване или дори вроден дефект (138). Може да се използва и за определяне на етническото разнообразие.

Честота на минорния алел (MAF- Minor Allele Frequency) е честотата, при която вторият най-често срещан алел се среща в дадена популация. MAF се използва широко в популационната генетика, тъй като предоставя информация за разграничаване на често срещаните и редките варианти сред дадена популация.

Действителните изчисления на алелните честоти от честотите на генотипа зависят от пloidността на вида за автозомни гени (които са отговорни за определянето на соматичните характеристики). За моноплоиди честотата (p) на алел А е част от броя на копията (i) на алела А и популацията или размера на пробата (N), което се изразява чрез формулата: $p = i / N$. Когато става дума за диплоиди алелната честота се изчислява по следния начин: ако $f(AA)$, $f(AB)$ и $f(BB)$ са честотите на трите генотипа в локус с два алела, тогава честотата p на А-алела и честотата q на В-алела в популацията се получават чрез преброяване на алели:

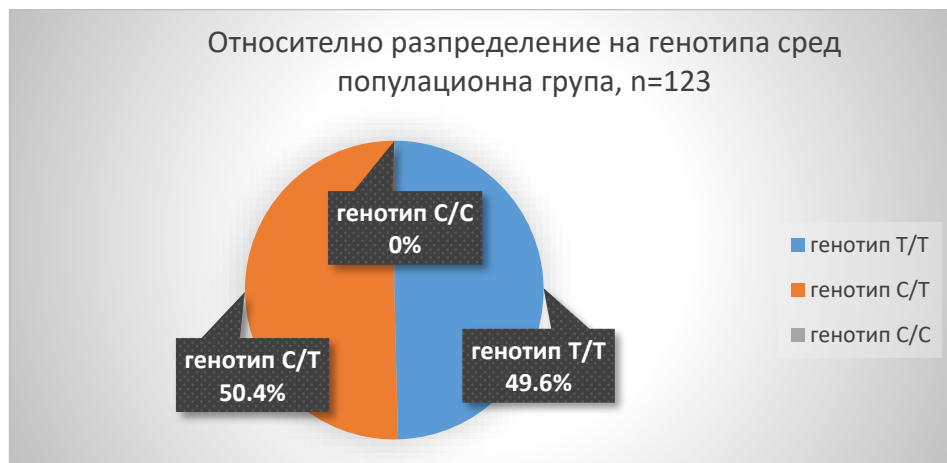
$$p = f(AA) + \frac{1}{2} f(AB) = \text{честота на А}$$

$$q = f(BB) + \frac{1}{2} f(AB) = \text{честота на В}$$

Тъй като p и q са честотите на единствените два алела, присъстващи в този локус, те трябва да сумират до 1. За да се провери това: $p + q = f(AA) + f(BB) + f(AB) = 1q = 1 - p$ и $p = 1 - q$.

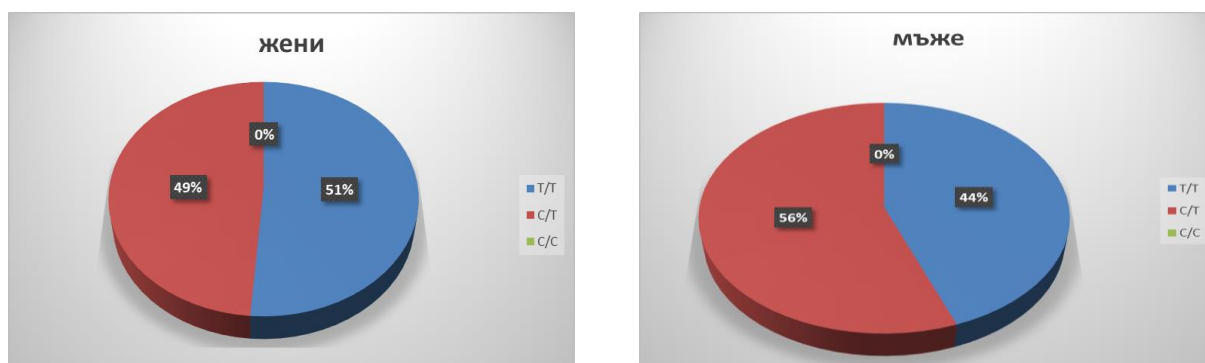
В дадената по-горе формула алел А и В могат да бъдат заменени, с която и да е нуклеотидна база от четирите, изграждащи двойноспиралната ДНК молекула: аденин (А), тимин(Т), гуанин (G), цитозин (С).

За първи път бе определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред хора от българска популация по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1*. Данните показват, че в цялата изследвана популационна група в настоящето проучване, хомозиготните Т/Т носители (на един и същи алел Т и в двете копия на гена) са определени като 49.6% (61/123), а хетерозиготните С/Т носители (носители на Т алел в едното копие на гена и С алел в другото копие) са съответно останалите 50.4% (62/123). Респективно хомозиготни С/С носители не бяха регистрирани в изследваната от нас група. (Фиг.19)



Фигура 19. Процентно разпределение на генотипа *rs174547* сред изследваната популационна група

Получените резултати за разпространението и честотата на генотипа сред двата пола са показани на **Фигура 20** а) и б). Разпределението на индивидуалните генотипове по пол показва, че сред изследваните жени малко по-разпространен е Т/Т генотипа (51%), а сред мъжете - С/Т (56%).



Фигура 20. Разпределение на генотипа rs174547 сред жени **а)** и сред мъже **б)**

Честотата на Т алела въз основа на получените данни е изчислена като 0.75, аналогично на съотношение Т:С от 3:1 (184:62; изразено процентно - 75%:25% в полза на Т-алела). Съответно честотата на С алела е 0.25 (62/246, 25%).(**Таблица 15**)

В получените резултати изненадващо е както почти равностойното разпределение между индивидуалните генотипове С/Т и Т/Т, така и липсата на лица с определен хомозиготен генотип само по С алела (С/С). Възможно е получените резултати да са следствие от броя на индивидите в изследваната група (ограничен до 123 доброволци), но като цяло те са в унисон и отразяват по-ниската честота на С алела в световен мащаб. Този алел се приема за прародителски вариант, като според базата данни Ensembl (www.Ensembl.org) средната му честота е изчислена на MAF=0.30 (С), а най-висока регистрирана популационна стойност е MAF=0.588. В глобален план алелната честота е Т=0.702 (3516), С=0.298 (1492), а честотата на съответния генотип Т/Т=0.560 (1401), С/С=0.155 (389) и С/Т=0.285 (714). Прави впечатление обаче относително малкия брой на изследваните лица, което обособява и нужда изследванията да продължат като се добавят повече индивиди от съответните популационни групи.

Таблица 15. Аелна и генотипна честота на *FADS1* rs174547 T>C SNP в изследваната българска популация, съпоставени с други популации и държави

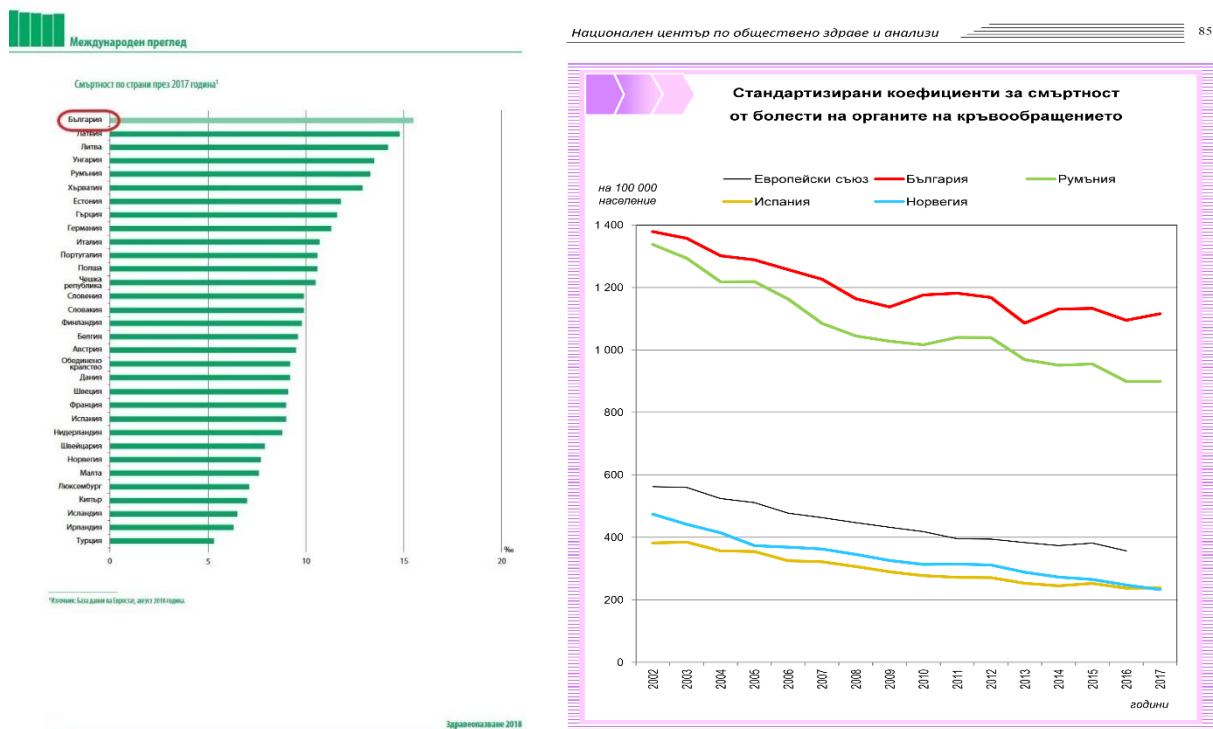
Държава / популация	извадка (N)	алелна честота - С алел	алелна честота - Т алел	генотип-честота			Източник на данните
				T/T п (%)	C/T п (%)	C/C п (%)	
България	123	0.250	0.750	61 (49.60)	62 (50.40)	0 (0.00)	Настоящото проучване
Китай	951	0.343	0.657	326 (34.30)	437 (45.90)	188 (19.80)	Данни за Китай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

Сравнено с данните от други проучвания на същия полиморфизъм, алелната честота на С алела е по-ниска при Африканци, Афроамериканци и Южноазиатци (**Таблица 15**). Не е известно да са налични данни за този конкретен полиморфизъм за други съседни Балкански държави.

От получените резултати се вижда, че сред Българската популация по-разпространен е Т алелът - 75%, който според *Fengqiong et al.* е по-неблагоприятния генетичен вариант на *FADS1*, тъй като представлява рисков фактор за коронарно-артериална болест. Важно е да се отбележи, че Т-алелът се свързва с по-висок риск от КАБ само сред индивиди с по-ниски хранителни приема на ЕРА и ДНА, но не и при тези с по-висок прием на тези дълговерижни полиненаситени мастни киселини. Отдавна е известно, че балансирания хранителен прием на n-3 и n-6 мастни киселини е есенциален за доброто здраве, с оглед, че те участват в множество важни биологични процеси и структури (168). Като се вземат предвид и данните от проучването на (124), в което се доказва, че България е на едно от последните места по прием на гореспоменатите мастни киселини (ДНА и ЕРА), може да се предположи, че при българското население се наслагват едновременно, неблагоприятна генетична предразположеност към КАБ, и сериозни неблагоприятни рискови фактори на околната среда, като оскъден достъп до риба и рибни продукти, като основните храни, съдържащи ДНА и ЕРА. Очаквано статистическите данни за България от последните десетилетия поставят страната ни начело по отношение отчетената заболяемост и смъртност от КАБ и МСБ.

По данни на Националния Статистически институт в международен контекст смъртността за 2017 год.(данни, актуални към периода на провеждане на проучването-2016 и 2017г.) в България (общо 109791 или 1456 на 100000 души от населението) е най-високата сравнена с други страни от ЕС (**Фиг. 21**), като България е на първо място по смъртност, причинена от болести на органите на кръвообръщението (1022.5 на 100 000

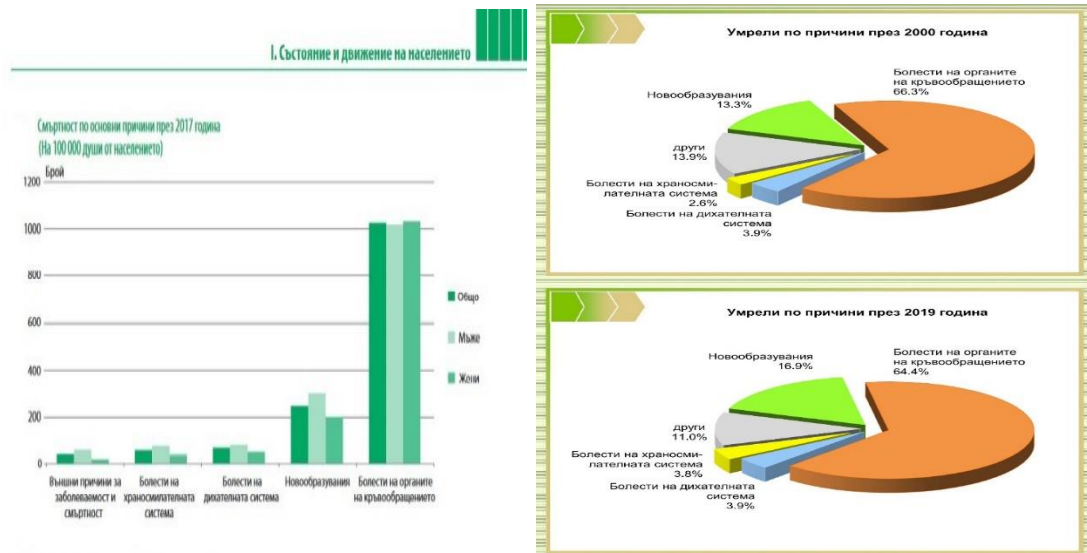
стандартизирано население, данните са за 2017 год.). Категорията болести на органите на кръвообращението включва хипертонична болест, исхемична болест на сърцето, в това число остър инфаркт на миокарда, както и мозъчно-съдови болести (Фиг. 22).



Фигура 21. Смъртност по страни през 2017 и 2020 год, данните са на Национален статистически институт и НЦОЗА.

България е сред лидерите по мозъчно-съдови болести, в частност инсулти. На Световния ден за борба с инсулта – 29 октомври 2019, на информационна среща в София са представени данни относно увеличаващата се честота на инсултите, като се предвижда до 2035 г. случаите на инсулт в ЕС да се увеличат с 34% (<https://news.bg/health/balgariva-sred-liderite-po-insult-v-evropa.html>). Очаква се годишният брой на инсултите в страните от Европейския съюз да се увеличи от 613 148 през 2015 г. на 819 771 през 2035 г. Епидемиологичният доклад на Световната здравна организация (СЗО) сочи, че България е една от водещите държави по инсулт в Европа. Данните сочат, че през 2015 г. у нас от исхемичен инсулт са починали

близо 154 на 100 000 души. Това означава, че смъртността в България е близо четири пъти по-висока спрямо другите страни в ЕС. Посочените по-горе негативни тенденции за смъртността и заболяемостта към 2017г са актуални и към днешна дата.



Фигура 22. Смъртност по основни причини през 2017,2019 и 2020 година (на 100000 души от населението). Данните са взети от Националния статистически институт, София

Съществуват два основни вида инсулт. Най-чест е исхемичният инсулт - на него се дължат около 85% от случаите. Той възниква, когато притокът на кръв към мозъка е блокиран от тромб или стеснени кръвоносни съдове. Вторият вид е хеморагичният инсулт, който се развива при разкъсване на кръвоносен съд. И двата вида инсулти са животозастрашаващи и потенциално инвалидизиращи, ако не се стигне до навременна медицинска намеса. Инсултът както и другите болести попадащи в графата на болестите на органите на кръвообращението са с голяма социална значимост, защото последствията от тях в някои случаи драстично намаляват качеството на живот на човек. Преживелите инсулт обикновено изпитват редица нарушения, включително проблеми с мобилност, зрение, говор, памет, промени в личността, умора и депресия.

Според Националната програма за превенция на незаразните хронични болести (2014-2020) основните фактори на риска за възникване на сърдечно съдови заболявания са хипертония, диабет, тютюнопушене, високи кръвни нива на липиди, ниска физическа активност, нездравословен модел на хранене, затлъстяване, стрес и обременена фамилна анамнеза (174). Не на последно място генетичния терен и индивидуалните вариации на гените също оказват влияние, особено като се отчетат и факторите на околната среда и начина на живот. Горепосочените рискови фактори често съществуват заедно, което увеличава многократно риска за здравето и налага те да бъдат третирани по комплексен начин. Например в зависимост от нивото на холестерола в кръвта при хипертоници пушачи има от три до шест пъти по-висок риск от смъртност, свързана с исхемична болест на сърцето, отколкото при нормотонични непущачи. Пациенти с артериална хипертония имат двойно по-висок риск от инфаркт на миокарда, а при хипертония и силно увеличени нива на холестерола рискът от инфаркт на миокарда е приблизително 15 пъти по-висок. Рискът от заболяване на периферните артерии се повишава три пъти при пушачи, които имат артериална хипертония. Превантивните стратегии за контрол на сърдечносъдовите заболявания се основават на въздействие върху факторите на риска, водещи до тяхното възникване. Повечето от сърдечносъдовите инциденти са предотвратими, ако срещу посочените фактори на риска се предприемат интегрирани действия.

Нездравословно хранене като рисков фактор е особено интересен поради преплитането на два на пръв поглед противоречащи си фактора - малнутрицията на основни микроелементи от една страна и тенденцията към затлъстяване на населението от друга. Негативните характеристики на храненето, както и неблагоприятните тенденции в модела на хранене на населението в България, водят до увеличаваща се честота на наднормено тегло и затлъстяване, включително и при децата, висока заболеваемост и

смъртност от хронични болести, свързани с храненето. От друга страна обаче се доказва ниската консумация на риба и рибни продукти, а оттам и на есенциални мастни киселини сред българското население със всичките негативни здравни последици, които те предполагат.

През 2011 г. Petrova et.al. провеждат проучване с цел да се оцени валидността на данните на Организацията за храни и земеделие (FAO) относно наличността на рибни и растителни масла като индикатор за национален прием на мастни киселини n-3 и да се оцени населението в световен мащаб, живеещо в страни с нисък прием на мастни киселини n-3 (124). За целта са били измерени концентрациите на незаменими n-3 мастни киселини (FAs) - алфа-линоленова киселина (ALA) и докозахексаенова киселина (DHA), в мастната тъкан на мъже и жени от България, участници в това проучване. Същите биомаркери, са взети за други 11 страни от вече публикувани данни и са били използвани за валидиране на наличността на ALA и риба, оценена от FAO. Въз основа на валидираните данни на FAO за наличността на ALA и на риба, те са изчислили глобалното разпространение на ниска наличност на n-3 FA и заключили, че тази ниска наличност е широкообхватна и в големи мащаби. Приблизително половината от световното население живеещо в страни със средни и ниски доходи е с ограничен достъп до n-3 FAs (риба по-малко от 400 g/седмица и ALA по-малко от 4% от общите растителни мазнини), като най-големият дял е сред държавите в Югоизточна Азия (53.6%), следвани от населението на Африка (27.1%) и Източна Европа (8.5%). От тях 33% живеят в страни като България, където n-3 FAs са почти недостъпни (риба по-малко от 200 g/седмица и ALA по-малко от 2% от общите растителни мазнини). Силна положителна корелация е намерена между концентрацията на DHA в мастната тъкан и наличност на риба ($r=0.88$) и между концентрацията на ALA в мастната тъкан и наличността на ALA ($r=0.92$). Резултатите показали, че концентрациите на ALA и DHA в

адипоцитната тъкан на доброволците от България са най-ниски в сравнение с 11-те други държави с налични данни. Установено е, че в България има най-ниската наличност на ALA (1.1% от общото растително масло) и най-ниската концентрация на ALA в адипоцитната тъкан (0.34%) както и най-ниския среден прием на риба (57 g/седмица) и концентрация на DHA в мастната тъкан (0.11%).

Базирайки се на получените резултати, *Petrova et al.* (124) правят извода, че този голям сегмент от населението в света, които няма достъп и наличност от n-3 МК вероятно ще има сериозни последици поради недостатъчност на приема на n-3 мастни киселини. Разнообразието от биологичните процеси, в които участват n-3 мастните киселини, както и множеството здравни ползи от тях, отдавна са обект на интерес на много изследователи. В своя систематичен обзор *Riediger et al.* описват и систематизират изучените досега здравни позитивни ефекти и ролята на n-3 МК за поддържане на здравето, както и за развитие на болестта (126). N-3 МК са основните съставки на фосфолипидните мембрани и определят флуидността на клетъчната мембрана, модулират ензимната активност, функцията на белтъците преносители и мембранните рецептори. Те са също и прекурсори на активни метаболити, известни колективно като ейкозаноиди (простагландини, простациклини, тромбокساني и левкотриени), които регулират нашите клетъчни функции и имат изявено участие в каскадната реакция на възпалителния отговор. Множество епидемиологични, клинични и обсервационни проучвания описват разнообразната роля на n-3 МК, като се започне от фетуса в утробата и ранното детско развитие; различни видове рак и злокачествени заболявания; сърдечно-съдови заболявания; и се стигне до различни психични заболявания, включително депресия, разстройство с хиперактивност с дефицит на внимание и деменция. Действието на n-3 МК в много случаи е с плейотропен ефект, т.к. засяга работата на много

биологични процеси, като например ефектите на n-3 МК при моделиране на възпалителния отговор, агрегацията на тромбоцитите, високото кръвно налягане и хиперлипидемията (168). Като следствие от всички тези проучвания много автори препоръчват увеличаване на консумацията на n-3 МК като цяло от населението и все повече храни започват изкуствено да се обогатяват с n-3 МК (126).

Интересно е проучването на *Fengqiong et al.* чиято цел била да оцени дали n-3 LC-PUFAs, в това число (ЕРА) и (ДНА), приети с диетата, могат да модулират ефекта на *rs174547* полиморфизма във *FADS1* гена върху коронарно-артериалната болест на сърцето (КАБ) (98). За целта *FADS1* еднонуклеотидни полиморфизми *rs174547* са били определени във 440 КАБ пациенти и 838 здрави контроли. Диетичния прием на ЕРА и ДНА са били оценени с валидиран въпросник за хранителната честота. Взаимодействията между *rs174547* полиморфизъм и LC-PUFAs са анализирани чрез използване на множествена логистична регресия. Авторите наблюдавали, че носителството на *rs174547* Т алел представлява рисков фактор за КАБ. Тези взаимодействия били модулирани от ЕРА и ДНА прием с храната. При това, колкото по-нисък бил приема на ЕРА и ДНА, толкова повече се увеличавала КАБ. По-конкретно, Т алелът на *FADS1 rs174547* повишавал риска от КАБ (OR=1.36, 95% CIs 1.03-1.80) и се наблюдавало значително взаимодействие между *rs174547* и диетични приема на ЕРА върху КАБ (P=0.028). Трябва да се отбележи, че Т-алелът се свързва с по-висок риск от КАБ само сред индивиди с по-ниски хранителни приема на ЕРА, но не и при тези с по-висок прием на ЕРА. По подобен начин се наблюдава значително взаимодействие между *rs174547* и диетичния прием на ДНА върху КАБ (P-взаимодействие = 0.020). *Fengqiong et al.* направили следните изводи: първо, че хранителния прием на n-3 LC-PUFA може да модулира взаимодействието между *FADS1 rs174547* полиморфизъм и КАБ. И второ, високия прием на n-3 LC-PUFA

би могъл да обезсили неблагоприятния ефект на генетичния вариант на *FADS1* върху КАБ във Китайско население в средна и напреднала възраст.

Разбира се, данните и изводите направени за нутригенетичните взаимодействия между LC-PUFAs и *rs174547* върху КАБ за китайската популация не могат дословно да бъдат прехвърлени върху българската популация, но повдигат някои въпроси, които си струва да бъдат проучени в бъдеще от по-обстойни нутригенетични проучвания и в по-широки мащаби.

Тези открития, отнасящи се за китайското население, както и доказани нисък прием на риба и рибни продукти, а оттам и на n-3 LC-PUFAs, провокираха екипа ни да проучи генетичния терен на българското население, касаещо метаболизма дълговерижните полиненаситени мастни киселини, и в частност генетичния вариант във *FADS1* гена *rs174547*. Подобно проучване, доколкото е известно на нашия колектив не е правено в България засега, а резултатите от него биха хвърлили светлина по въпроса с все по-нарастващата заболяемост от болести на органите на кръвообращението, в това число и коронарно-артериална болест, различни степени на дислипидемия, исхемична болест и др. Поставихме си за цел да проучим дали неблагоприятни варианти на гени, свързани с липидния метаболизъм в Българското население допринася за това да държим едно от първите места по смъртност от сърдечно-съдови болести, инсулти и инфаркти.

Проблемът с високата смъртност от болести на кръвообращението в България, разбира се е доста по-мащабен. Генетичните маркери са само малка част от показателите, които обуславят повишения риск от сърдечно-съдови заболявания. Налице са и доста социални, културни и финансови фактори, които оказват влияние върху заболяемостта като стресогенната среда, ниската финансова обезпеченост, лошите хранителни навици и незадоволителната здравна култура на населението като цяло. Според

програмата за превенция на незаразните хронични болести: 2014-2020, основните рискови фактори за възникване на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) в България са хипертония, диабет, тютюнопушене, високи кръвни нива на липиди, ниска физическа активност, нездравословен модел на хранене, затлъстяване и обременена фамилна анамнеза (174). Много често в действителност те се преплитат и допълват, като така риска за здравето се увеличава многократно. Епигенетичните фактори в случая не са за подценяване, но за разлика от генетичните те могат да бъдат повлияни. Повечето от сърдечносъдовите инциденти са предотвратими, ако срещу посочените фактори на риска се предприемат интегрирани действия.

Въвеждането на молекулни биомаркери позволява индивидуална оценка на пътищата на обмяна на веществата и поведението на основните ензими, отговорни за метаболизирането на хранителните вещества. От полза ще бъде и включването им в панели от нутригенетични профили, отнасящи се до мастния и холестероловия метаболизъм на дадена популация. Данните в представеното предварително проучване върху *FADS1* генотипния профил сред българите като цяло са съизмерими с по-ниската честота на С алела в световен мащаб, като е леко занижена спрямо данните за Европейската популация, и почти два пъти по-ниска от тази при Северноамериканската популация. В последното десетилетие постиженията на генетиката на храненето позволяват развитието на индивидуален подход при рискови групи и прилагане на персонализирана медицина, в това число персонализирано хранене и спорт.

Въз основа на определените алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1* сред българската популация, могат да бъдат направени следните изводи:

- ✓ За първи път бе определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред хора от българска популация по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1*.

- ✓ Определена е за първи път генетичната вариабилност във FADS1 кльстерите, сред българска популация.
- ✓ Делът на носителите на Т-алел на полиморфизма *rs174547* във FADS1 гена е доста висок (75%) сред българското население.
- ✓ Делът на С-алела сред българите е 25%, което е в унисон с по-ниската честота на С алела в световен мащаб.
- ✓ Изследвания *rs174547* може да бъде потенциален фактор при развитието на сърдечно-съдови заболявания.
- ✓ В комбинация с ниската наличност и прием на n-3 PUFAs, този генетичен терен е сериозна предпоставка за повишения риск от исхемична болест на сърцето и висока смъртност.

5.6 Честота на консумация на обичайни групи храни и храни, богати на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини

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

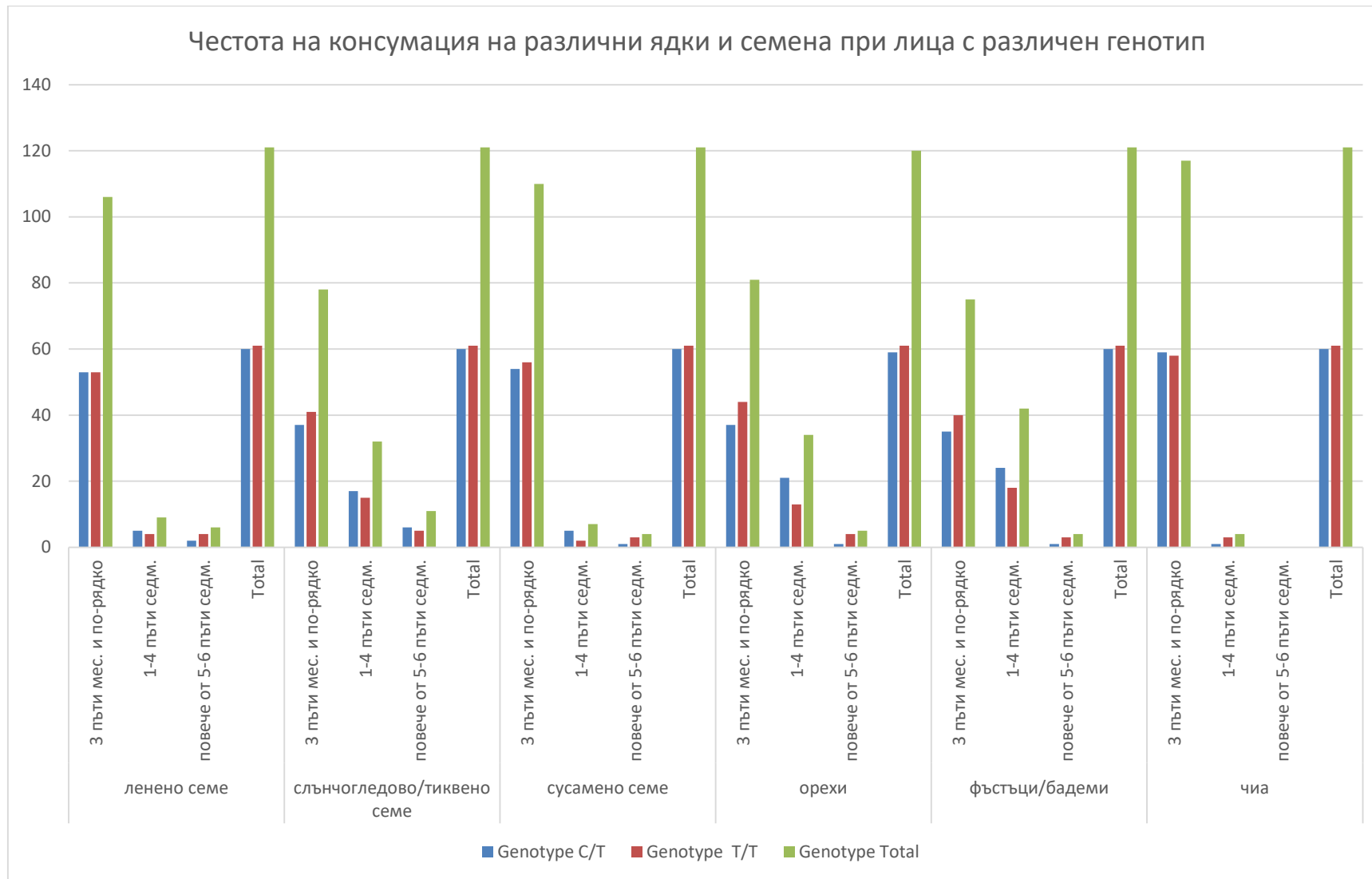
Резултатите от анкетата за честота на консумация на различни видове ядки и семена са представени на **Фигура 23**. Те показват, като цяло, рядка консумация на ядки и семена. За всички изброени в анкетата видове ядки и семена, най-висок е процентът на хората отговорили, че консумират съответната храна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

От анкетираните ленено семе консумират рядко (3 пъти месечно и по-рядко) 87.6%, средно (1-4 пъти/седмично) едва 7.4% и често (повече от

5-6 пъти/седмично) едва 5.0%, без разлика към кой генотип спадат. F-критерият на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и честотата на консумация на ленено семе в популацията, от която е направена извадката – $P=0.836$.

Тенденцията се запазва подобна при консумацията на сусамено семе- 90.9% от анкетиранияте са отговорили , че го консумират 3 пъти месечно и по-рядко, 5.8% от хората имат средна консумация, а често т.е. повече от 5-6 пъти седмично, само 3.3%. F-критерият на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и честотата на консумация на сусамено семе в популацията, за която е извадката - $P=0.381$.

Резултатите от анализа на данните показват, че слънчогледовото и тиквеното семе са по-предпочитаните семена от българите, като 64.5% отбелязват, че ги консумират рядко, 26.4% ги консумират с умерена честота, а 9.1% съобщават за по-честа консумация. Отново не се наблюдават значителни разлики в честотата на консумация по генотип, като критерият на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двете променливи (честота на консумация и генотип) в популацията, от която е направена извадката - $P=0.848$.



Фигура 23. Честота на консумация на различни ядки и семена, богати на мастни киселини, при лица с различен генотип

Ядките, особено сурови стават все по-предпочитана алтернатива за бърза междинна закуска между храненията, защото са достъпни (все по-лесно е да ги намери човек в търговската мрежа) и засищащи сетивата. Все по-популярни стават и по-екзотичните разновидности като чия и конопено семе, богати на омега-3 мастни киселини, бразилски орех, кедрови ядки, ядки pekan (американски орех), като всички те имат своя уникална комбинация от мастнокиселинен и микроелементен състав.

Орехите са важна част от храните доставящи незаменими мастни киселини на организма и не случайно са известни като „храна за мозъка“. Те са богати на PUFA - общо мазнини на 100g продукт – 65.8g, от които PUFA- 43.4g. (*База данни за химически състав на храните*, НЦОЗА). Общата тенденция на консумация на орехи също е ниска, но все пак малко по-висока, сравнена с другите ядки и семена. Отговорите от анкетата показват, че 67.5% консумират орехи рядко (3 пъти месечно и по-рядко); 28.3% от 1 до 4 пъти седмично, а едва 4.2% повече от 5-6 пъти седмично т.е. имат сравнително висока консумация на орехови ядки. И тук няма статистически значима разлика в честотата на консумация на орехи между двата генотипа – F-критерия на Фишер е $P=0.138$ в популацията, за която е направена извадката.

Що се отнася до честотата на консумация на фъстъци, бадеми, лешници и щам-фъстък, тя следва общата сравнително ниска честота. Тук обаче разликата между хората отговорили, че консумират рядко (62.0%) и тези с относително средна консумация (34.7%) е видимо по-малка, отколкото при другите видове ядки и семена. Остава нисък относителния дял на хората (3.3%), които често консумират фъстъци, бадеми, лешници и щам-фъстък.

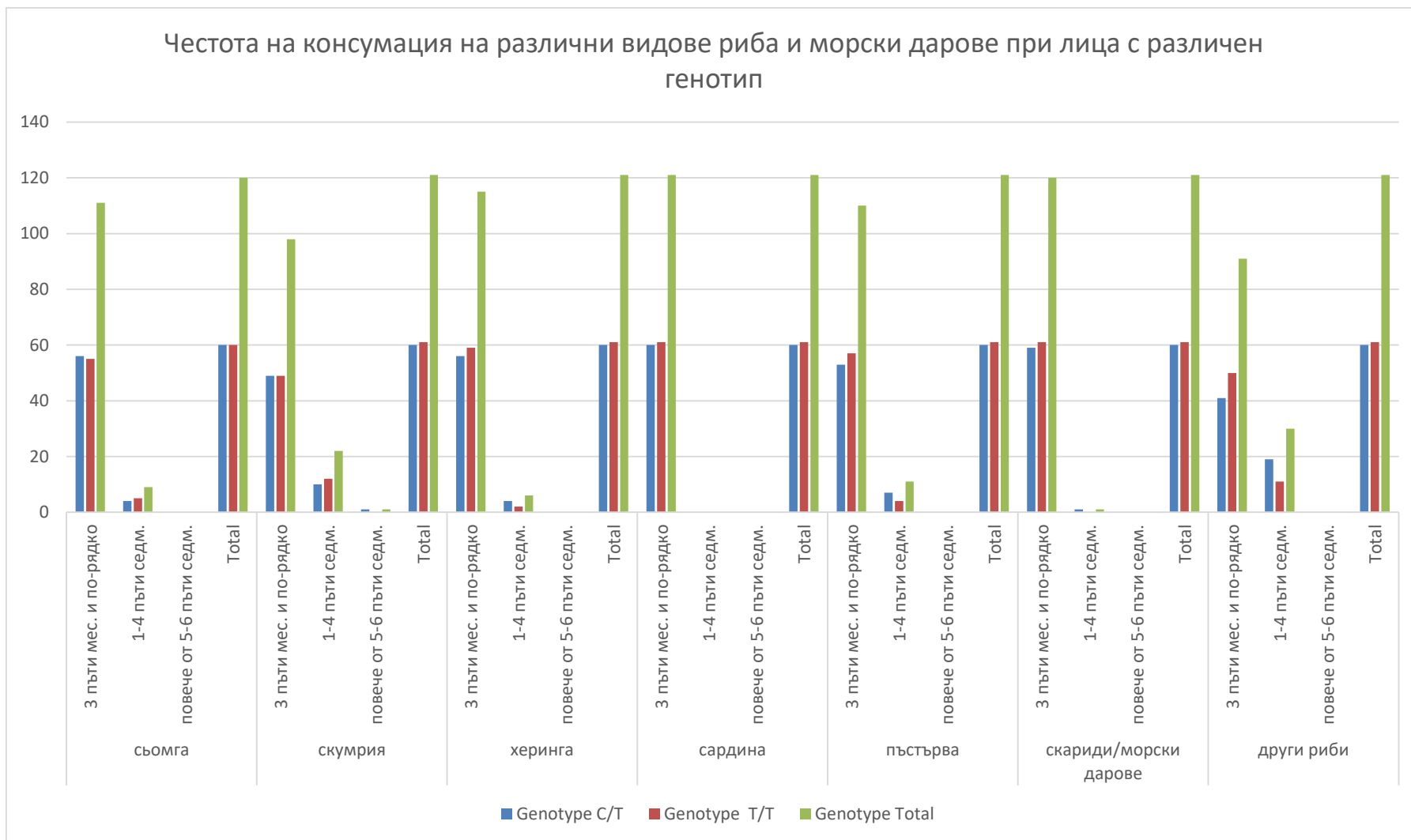
Както и при другите видове ядки и тук не се забелязва значима разлика в честотата на консумация при хората от различните генотипове. Критерият на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост

между двете променливи в популацията, от която е направена извадката – $P=0.335$.

Семената от чия са модерна храна, която се слави с много високо съдържание на n-3 мастни киселини - общото количество мазнини на 100 g чия е 30.7 g., от които PUFA - 23.7g. (*База данни за химически състав на храните, НЦОЗА*). Чия семената доста често служат като подходящ източник на тези мастни киселини при вегани и строги вегетарианци, където приема на месни продукти и риба е много оскъден и често се развиват дефицити на определени макро- и микронутриенти, включително и дълговерижни полиненаситени мастни киселини. Честотата на консумация на чия е доста ниска като цяло – 96.7% са отговорили, че консумират тази храна 3 пъти месечно и по-рядко, едва 3.3% имат средна консумация, а нито един от анкетираните не е посочил, консумация 5-6 пъти седмично. Точният критерий на Фишер показва, че отсъства статистически значима зависимост между двата генотипа и обичайната честота на консумация на чия в популацията, за която е направена извадката – $P=0.619$.

Резултатите за честотата на консумация на различни видове риба и морски дарове, разделени по генотип са представени на **Фигура 24**.

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



Фигура 24. Честота на консумация на различни видове риба и морски дарове, при лица с различен генотип

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

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

Херинга, сардина, пъстърва и морски дарове се консумират изключително рядко, като няма анкетиран, който да е посочил консумация повече от 5-6 пъти седмично. Повечето от доброволците попадат в групата на рядка консумация (3 пъти месечно и по-рядко). Отново разпределени равномерно между генотиповете. Един до четири пъти седмично консумират херинга (5%), пъстърва (9.1%), скариди и морски дарове (0.8%) и други риби (24.8%). F-критерия на Фишер показва, че няма статистически значима зависимост между двете променливи (генотип и честота на консумация) в популацията, от която е направена извадката. За обичайната честота на консумация на херинга - $P=0.679$, за сардина - $P=0.207$, за пъстърва - $P=0.322$, за скариди и други морски дарове - $P=1.000$; за други видове риба (прясна, замразена, консерва) - $P=0.139$.

Една от причините за тази ниска честота на консумация е трудния достъп до риба и морски дарове, ниската наличност, съчетана с сравнително високата цена на тези продукти и липсата на култура на консумация в исторически план.

Консумацията на риба и рибни продукти, като ценен източник на незаменими мастни киселини интересува научната общност и органите, следящи здравето на населението. През 2011 г. *Petrova et.al.* провеждат проучване с цел да се оцени валидността на данните на Организацията за храни и земеделие (FAO) относно наличността на риба и растителни масла като индикатор за национален прием на мастни киселини n-3 и да се оцени населението в световен мащаб, живеещо в страни с нисък прием на мастни киселини n-3. Резултатите показали, че България е една от страните където рибата и съдържащите се в нея n-3 мастните киселини са били почти недостъпни (риба по-малко от 200 g/седмица и ALA по-малко от 2% от общите растителни мазнини), което пряко се отразява на мастнокиселинния състав на адипоцитната тъкан. Важният извод, които правят базирайки се на получените резултати, *Petrova et al.* е, че този голям сегмент от населението в света, които няма достъп и наличност от n-3 МК вероятно ще има сериозни последици поради недостатъчност на n-3 мастни киселини (124).

Резултатите от анкетата за честотата на консумация на яйца, са представени на **Фигура 25**. От графиката се вижда, че яйцата в общия случай се консумират цели, въпреки ширещото се в миналото убеждение, че хора с повишен холестерол не трябва да консумират жълтъка на яйцето. Най-висока е умерената консумация на цели яйца – 61.2% от участниците в проучването, 30.6% консумират 3 пъти месечно или по-рядко, а повече от 5-6 пъти седмично – само 8.3%. Отново не се наблюдава разлика в честотата на консумация на яйца между групите на двата генотипа. Статистическите анализи показват, че критерия на Фишер е $P=0.343$ за

цели яйца, $P=0.529$ за консумация само на белтък и $P=1.000$ за честотата на консумация само на жълтък.



Фигура 25. Честота на консумация на яйца, при лица с различен генотип

В тази версия на анкетната карта яйцата бяха разделени на „белтък“, „жълтък“ и „цели яйца“. Това бе направено с цел по-детайлно изследване приема на различни мастни киселини с яйцето, тъй като в различните му части се съдържат различно количество и вид мастни киселини. (<https://www.gov.uk/government/publications/nutrient-analysis-of-eggs>).

Мастният нутриентен състав на цяло кокоше яйце, само белтък и само жълтък е представен на **Таблица 16**. Може да се види разликата в съдържанието на SFA, MUFA и PUFA като данните са от База данни за химически състав на хранителна Националния център по общественото здраве и анализи, София.

Таблица 16. Нутриентен състав на кокоше яйце - съдържание на наситени (SFA), мононенаситени (MUFA) и полиненаситени (PUFA) мастни киселини

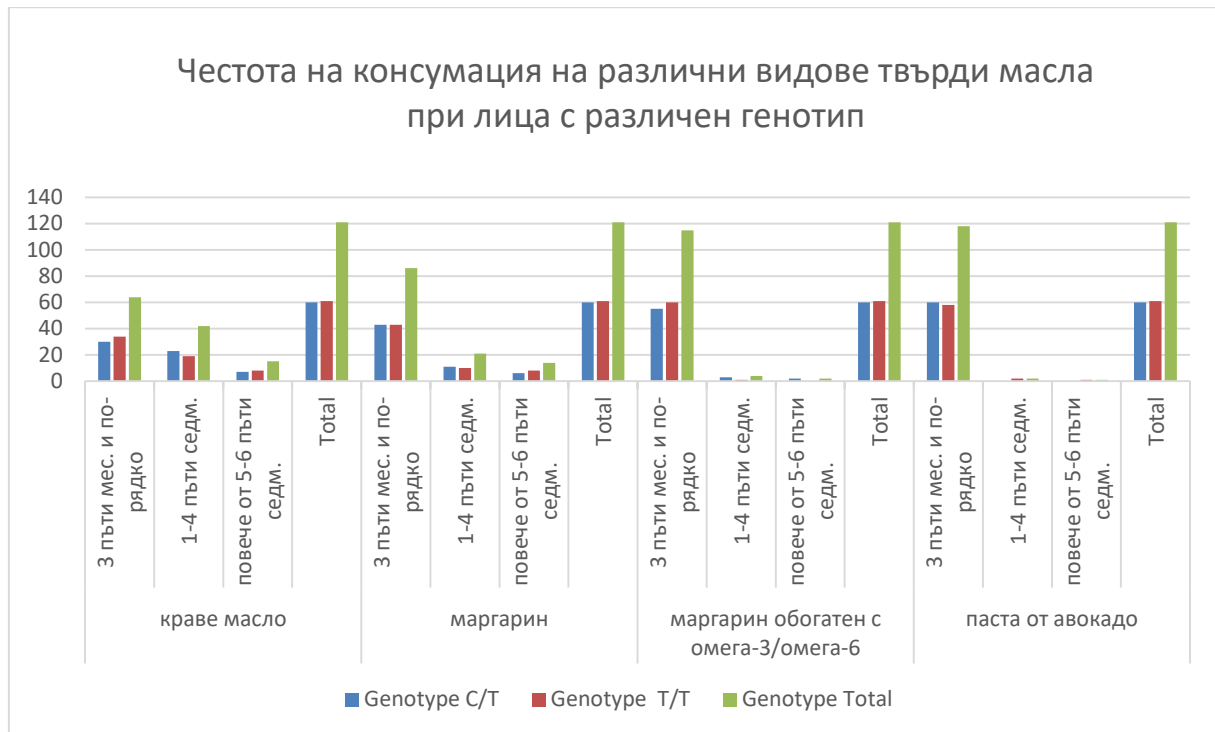
	Наситени мастни киселини g/100g	Мононенаситени мастни киселини g/100g	Полиненаситени мастни киселини g/100g	Общо мазнини g/100g
Яйце, Кокоше, цяло	2.7	4.3	3.2	10.2
Яйце, Кокоше, жълтък	9.9	13.4	5.5	29.7
Яйце, Кокоше, белтък	0	0	0	0.2

От друга страна сред общопрактикуващите лекари в България все още съществува разбирането, че жълтъка на яйцето не трябва да бъде консумиран от хора с високи кръвни нива на тоталния холестерол, защото е богат на хранителен холестерол и би могъл да повиши значително кръвния показател. Тази теория има своите привърженици, но все повече научни публикации сочат, че приетия с храната холестерол сам по себе си не е отговорен за повишен плазмен холестерол (88).

Отчетените резултати за честотата на консумация на различни видове твърди масла са представени на **Фигура 26**. Данните показват, че най-голям процент от хората – 52.9% консумират краве масло 3 пъти месечно или по-рядко. Умерена консумация на масло (от 1 до 4 пъти седмично) отбелязват 34.7%, а повече от 5-6 пъти седмично масло консумират едва 12.4%. Критерият на Фишер ($P=0.813$) показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и обичайната честота на консумация на краве масло в популацията, от която е направена извадката.

Маргаринът се консумира още по-рядко от маслото като 71.1% от анкетираните са отбелязали, консумация 3 пъти месечно или по-рядко, 17.4% умерена честота на консумация, и едва 11.6% консумират маргарин 5-6 пъти седмично. F-критерия сочи, че няма статистически значима

зависимост между двете променливи в популацията, от която е направена извадката – $P=0.917$.



Фигура 26. Честота на консумация на различни видове твърди масла, при лица с различен генотип

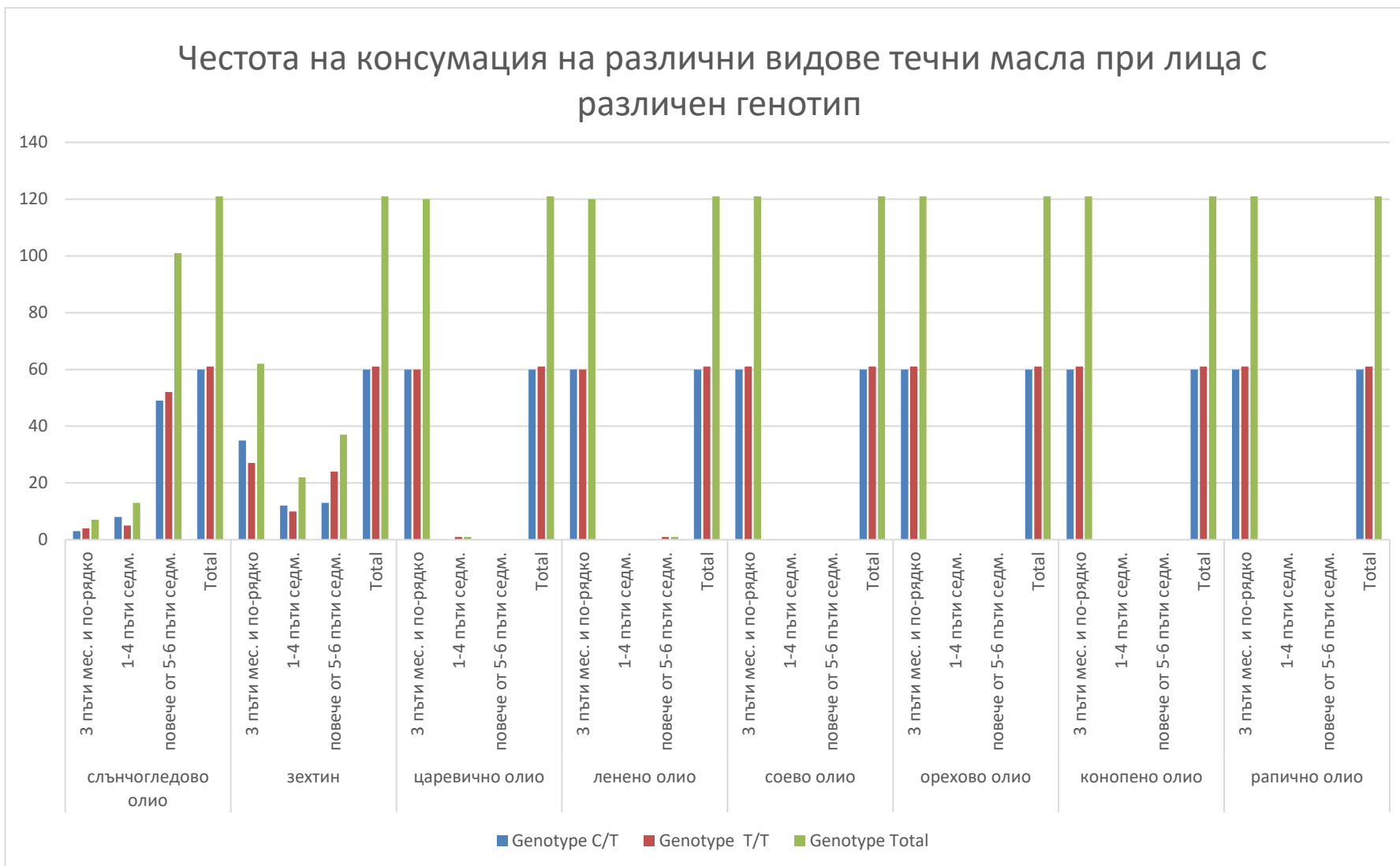
Още по-ниска е честотата на консумация на маргарин, обогатен с омега-3 и омега-6 мастни киселини. Повечето хора (95.0%) в проучването отбелязват, че рядко консумират „обогатен“ маргарин, 3.3% посочват умерена консумация, и 1.7% често (повече от 5-6 пъти седмично). Няма статистически значима зависимост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

Тези резултати са интересни от гледна точка на нарастващото изобилие на новоразработени хранителни продукти, на базата на твърдите масла с добавени високоверижни полиненаситени мастни киселини. Обяснението може да се търси или в недостатъчната информираност на потребителя за ползите от подобно обогатяване или ако не се чете

хранителното съдържание на етикета при избор на продукт в магазинната мрежа.

Напоследък в България се увеличи значително предлагането на екзотични продукти като например авокадо. То е богато на ненаситени мастни киселини (общо мазнини - 19.3g/100g; от които 12.9g MUFA и 1.8g PUFA на 100 грама продукт) и набира популярност като продукт, който може да замести животинските мазнини при строги вегетарианци и вегани. За съжаление не може да издържа на високотоплинна кулинарна обработка, което го лимитира по отношение на начина на употреба. Данните за честотата на консумация на авокадо и паста от него обаче сочат, че въпреки ценните си хранителни качества като цяло то се употребява рядко. От анкетиранияте 97.5% консумират този продукт 3 пъти месечно и по-рядко, 1.7% умерено, а едва 0.8% повече от 5-6 пъти седмично. F-критерия на Фишер ($P=0.244$) показва, че статистически значима разлика в честотата на консумация на авокадо между двата генотипа също няма.

Обобщените резултати за честотата на консумация на друга голяма група храни, носители на хранителни мастни киселини за човека, а именно различните видове течни мазнини (олио), употребявани както в сурово състояние (дресинги за салати, добавки към смути и др.), така и след преминаване на термична обработка са представени на **Фигура 27**. В анкетата бяха включени и по-нетрадиционни, но все по-често използвани от хора, стремящи се към здравословен начин на живот, течни масла като например ленено, соево, рапично, конопено и орехово масло (олио). Достъпността на подобни различни растителни масла нарасна значително в последните години, особено сред хора, посветени на здравословното хранене и посещаващи специализирани „био“ и „здравословни“ магазини като всяко от тях има различна наситеност на LA и ALA и пропорция между двете мастни киселини.



Фигура 27. Честота на консумация на различни видове течни масла (олио), при лица с различен генотип

По време на човешката еволюция е имало баланс между прием на LA и ALA, като съотношението им е било около $n-6:n-3=1:1$, докато в днешно време това съотношение е значително изместено в полза на LA, поради висок прием на растителни масла (соево, царевично, слънчогледово, шафраново, ленено семе), които са богати именно на ω -6 мастни киселини. Съгласно съвременните разбирания оптималното съотношение в приема на $n-6$ и $n-3$ мастни киселини е 4:1.

В лененото масло съотношението $n-6$ към $n-3$ МК е 1:4.2, в зехтина - 13:1, в слънчогледовото олио - 781:1, соевото - 7.4:1, при ореховото съотношението е 5:1, а при рапичното – 2:1.

От анализа на обобщените данни, представени на **Фигура 27** ясно може да се види, че предпочитаните за консумация (в суров вид и след топлинна обработка) течни масла са слънчогледовото олио и зехтинът (маслиново олио).

Често (повече от 5-6 пъти седмично) слънчогледовото олио се използва от 83.5% от отговорилите, 1 до 4 пъти седмично - от 10.7%, а сравнително рядко (три пъти месечно и по-рядко) го консумират едва 5.8% от хората. Интересно е да се отбележи, че в групата на умерено консумиращите слънчогледово олио има 13.3% с генотип С/Т и 8.2% с генотип Т/Т. Проведеният статистически анализ показва, че няма статистически значима зависимост между двата генотипа и честотата на консумация на слънчогледово олио в популацията, от която е направена извадката - критерият на Фишер е $P=0.564$.

Зехтинът е продукт, при които честотата на консумация между групите (консумиращи често, умерено и рядко зехтин) е сравнително по-плавно разпределена. Анкетираните, отбелязали повече от 5-6 пъти седмично са – 30.6%, от 1 до 4 пъти седмично -18.2%, а 3 пъти месечно и по-рядко – 51.2%.

Отново не се забелязва статистически значима разлика в честотата на консумация на зехтин при двата различни генотипа С/Т и Т/Т. Статистически изчисления критерий на Фишер е $P=0.110$.

Данните сочат, че почти не се консумират или се консумират много рядко царевичното, лененото, соевото, ореховото, конопеното и рапичното олио. F-критерия на Фишер за всички тези течни масла е $P=1.000$ и показва, че няма статистически значима зависимост между двете променливи в популацията, от която е направена извадката.

Трябва да се вземе под внимание, въпреки, че хората не включват рапичното олио съзнателно и преднамерено в менюто си, то присъства като съставка в технологично обработени храни, десерти, сосове и дресинги за салати. Затова ако консумацията на подобни продукти в менюто е значителна се повишава и относителната консумация на рапично масло с храната.

Интересно е да се отбележи, че от всички групи храни и хранителни продукти, включени в анкетата статистически значима разлика в честотата на консумация между съответните генотипове се откри само при продуктите в категория „Макарони и спагети“- F-критерий на Фишер е $P=0.022$.

От данните събрани от анкетата за честота на хранителната консумация (FFQ) на основни продукти, богати на мазнини, при лица с различен генотип, могат да се направят следните изводи:

- ✓ Честотата на консумацията на ядки и семена сред изследваната група е сравнително ниска (не повече от 9.1%), като предпочитани са ядките от групата на слънчогледовото и тиквеното семе.
- ✓ Честотата на консумацията на различни видове риба и морски дарове е доста ниска, като най-голям процент от хората (повече от 81.0%) в

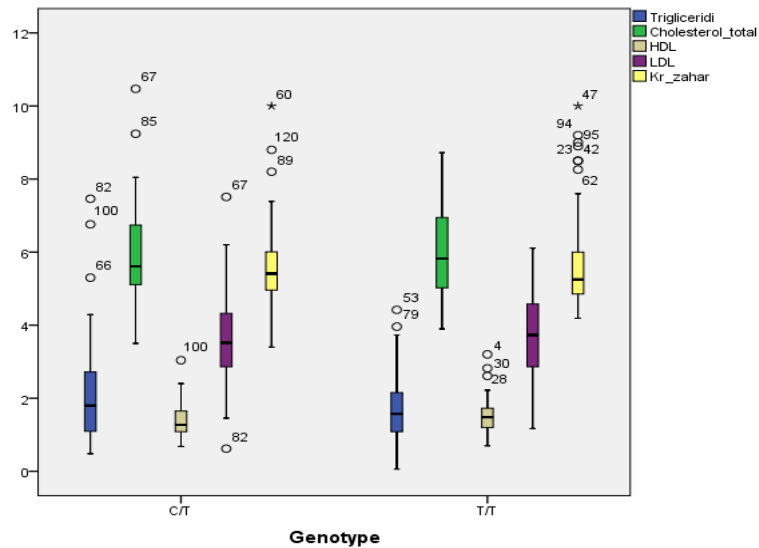
проучването са отговорили че приемат риба само 3 пъти месечно и по-рядко.

- ✓ От течните масла (олио) най-често се използват слънчогледово олио (83.5%) и зехтин (30.6%), и почти няма консумация на други видове течни мазнини.
- ✓ Най-използвани от твърдите масла са кравето масло (34.7%) и маргарина (17.4%), като честотата на консумация е умерена - от 1 до 4 пъти седмично.
- ✓ Няма разлика в честотата на консумация между различните генотипове T/T и C/T, регистрирани в проучването ($P > 0,05$).

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

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

На следващата **Фигура 28** са показани графично разпределенията на различните променливи - биохимични маркери на холестероловия профил и кръвна захар.



Фигура 28. Честотно разпределение на всички биохимични маркери при двете генотипни групи

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

Чрез непараметричния критерий на Mann-Whitney (при ненормално разпределение на променливите поне в едната група) или чрез Т-критерия на Student (когато и в двете групи разпределението е нормално), за независими извадки са сравнени характеристиките на променливите в двете групи на генотипа. Резултатите са представени на **Таблица 17**.

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

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

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

Тези данни се потвърждават от резултатите на *Dumont et.al*, които посочват връзката между *rs174547* и плазмените нива на липидите, като доказват, че минорния алел C на *rs174547* е значително свързан с по-ниски нива на HDL-холестерол ($\beta=-0.05$ mmol/L, $p=0.0002$), но само при хора, консумиращи големи количества линолова мастна киселина с диетата си (42).

Подобни изводи правят и *Liu et.al*. (99), които установяват значителни разлики в концентрациите на TG и HDL-C сред генотиповете T/T, T/C и C/C на *FADS1 rs174547* ($P=0.017$ и 0.003 , съответно, множествена линейна регресия). Вариантът C/C с *rs174547* е значително свързан с хиперлипидемия в сравнение с варианта T/T (коригирано съотношение на шансовете

(OR)=1.71, 95% доверителни интервали (CI): 1.16-2.54). Вариантът FADS1 *rs174547* C/C също е свързан със значително повишен риск от исхемична болест на сърцето в сравнение с варианта T/T и T/C (коригиран OR=1.53, 95% CI: 1.01-2.31) и ефектът е по-очевиден сред непушачите и представителите на женския пол.

От данните събрани от анкетите за стойностите на холестеролия профил и кръвна глюкоза при носителите на различен генотип, могат да се направят следните изводи:

- ✓ Има статистически значима разлика при нивата на HDL холестерола (P=0.044, при P<0,05) между двата генотипа.
- ✓ при носителите на C/T генотип се наблюдават по-ниски средни стойности на (1.38 mmol/l) на концентрацията на HDL холестерола, отколкото при носителите на T/T вариант- (1.51 mmol/l)
- ✓ Няма статистически значима разлика в нивата на триглицеридите, общия холестерол, LDL холестерола и кръвната глюкоза (P>0.05) между носителите на двата генотипа

5.8 Оценка на влиянието на единичния нуклеотиден полиморфизъм *rs174547* във FADS1 гена върху кардиоваскуларния риск

За да оценим има ли взаимодействие и какво е то между генетичния терен, в частност изследвания полиморфизъм в гена за десатураза на мастните киселини и риска от кардиоваскуларни инциденти направихме статистически модели, чрез които обособихме три групи хора, в зависимост от степента на риска от сърдечно-съдови събития.

За целта използвахме SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) таблица за оценка на риска (различни за висок и нисък кардиоваскуларен

риск) базирана на пол, възраст, общ холестерол, систолично артериално налягане и тютюнопушене. SCORE таблицата за оценка на риска често се използва от кардиолози и други специалисти по препоръка на Европейското кардиологично дружество и Европейското дружество по атеросклероза (102). Таблицата за оценка на риска SCORE са изготвени като отделни диаграми за региони в Европа с висок и нисък риск.

SCORE системата за оценка на коронарния риск може да бъде калибрирана за използване в различни популации чрез адаптиране към промените в смъртността от сърдечно-съдови заболявания и разпространение на рисковите фактори. Калибрираните версии за много европейски държави са вече достъпни и могат да бъдат намерени на интернет страницата на: <http://www.heartscore.org>. Те се актуализират постоянно, за да осигурят калибрирани таблици с най-актуални данни, специфични за всяка европейска държава. За съжаление България попада в SCORE таблицата за Европейски държави с висок риск, като изрично се подчертава, че някои от тях са изложени на много висок риск и диаграмите може да подценят реалния риск от сърдечно-съдови заболявания. Те включват Албания, Алжир, Армения, Азербайджан, Беларус, България, Египет, Грузия, Казахстан, Киргизстан, Латвия, Македония, Молдова, Руска федерация, Сирийска Арабска република, Таджикистан, Туркменистан, Украйна и Узбекистан. (Двете SCORE таблици за Европейските държави с нисък и висок риск са дадени като *Приложение №4*).

Както може да се види от оригиналната SCORE таблица в нея са въведени 7 рискови групи за кардиоваскуларни инциденти, които могат да възникнат в следващите 10 години при високорисковите региони в Европа, като се вземат под внимание пол, възраст, систолично артериално налягане, общ холестерол и тютюнопушене, а именно: <1% (тъмно зелено); 1% (светло

зелено); 2% (жълто); 3-4% (оранжево); 5-9% (светло червено); 10-14% (тъмно червено) и 15% и нагоре (червено кафяво). За целите на настоящето проучване беше направен математически модел, който да обхваща тези групи, но да ги сведе до 3 категории, а именно: 1) хора с нисък сърдечно-съдов риск: до 2% вкл.; 2) хора със среден сърдечно-съдов риск: от 3 до 9% вкл.; 3) хора с висок сърдечно-съдов риск: 10% и повече, като се вземе в предвид и генотипа.

Така обособените рискови групи преминаха статистически анализ, в който беше изследвана връзката им от една страна със съответния генен вариант на единичния нуклеотиден полиморфизъм *rs174547* във *FADS1* гена, а от друга с лабораторните резултати от холестеролия профил и кръвната захар.

Разпределението показва, че от изследваните доброволци, 61.2% (74 човека) попадат в категорията на хора с нисък сърдечно-съдов риск: до 2% вкл., 33.8% (41 човека) попадат във втората категория - на хора със среден сърдечно-съдов риск: от 3 до 9% вкл., а 5% (6 човека) попадат в третата категория на хора с висок сърдечно-съдов риск: 10% и нагоре (**Фиг. 29**).



Фигура 29. Процентно разпределение на изследваните доброволци във трите категории за риск от сърдечно-съдов инцидент

Последващия дисперсионен анализ ANOVA показва, че има статистически значима разлика между средните стойности на три от лабораторните показатели в рамките на трите рискови групи, а именно: общ холестерол ($p=0.002$), LDL холестерол ($p=0.022$) и кръвна глюкоза ($p=0.029$), при коефициент на значимост <0.05 (Табл.18).

Таблица 18. Статистическа значимост на разликите в средните стойности на лабораторните показатели между различните групи, обособени по степен на риск от сърдечно-съдови инциденти

Рискови групи % риск от ССЗ	%	TG	Total Cholesterol	HDL	LDL	Blood Glucose
		Разлика в средните стойности в трите рискови групи Sig (P -value)				
до 2%	61,2	0.461	0.002	0.512	0.022	0.029
3-9%	33,9					
=>10%	5,0					

Получените резултати са очаквани, имайки предвид, че риска от сърдечно-съдови инциденти се влияе пряко от повишени нива на общия холестерол и LDL холестерола. Повишената кръвна глюкоза пък е значим предиктор за изява на метаболитен синдром в бъдеще и така индиректно се отразява и на сърдечносъдовия риск. Статистически значима разлика вътре в рамките на една рискова група между генотиповете T/T и C/T не беше намерена ($P > 0.05$). Това показва, че риска от сърдечно-съдови инциденти е многофакторен и изследвания полиморфизъм *rs174547* не е толкова силен предиктор за пряко определяне на риска.

Анализирахме и как се променя индекса на телесна маса (BMI) във всяка от трите рискови за сърдечно-съдови инциденти групи.

Резултатите от анализа са представени на Табл. 19 и Фиг. 30А, 30Б и 30В.

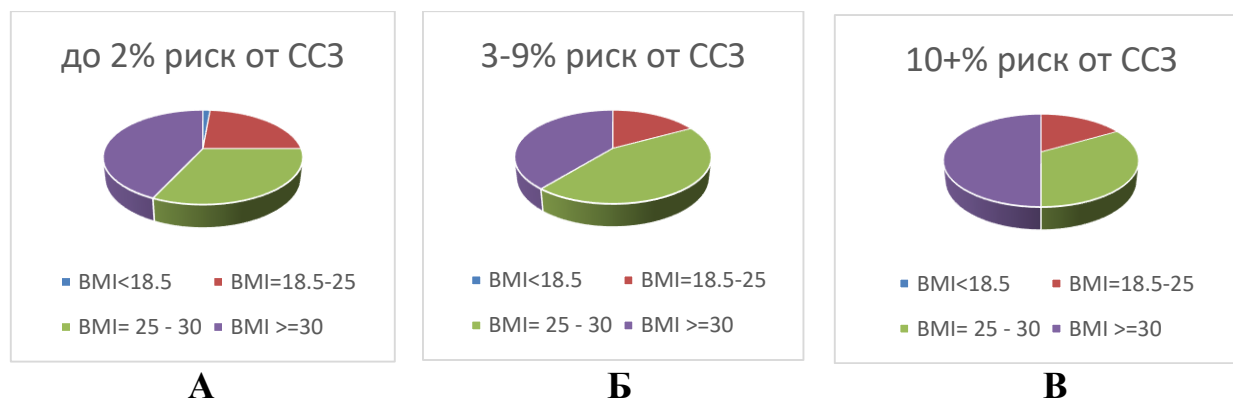
Таблица 19. Процентно разпределение на хората с различен ВМІ в различните групи по степен на риск от сърдечно-съдови инциденти

Рискови групи за кардиоваскуларни инциденти	ВМІ<18.5	ВМІ=18.5-25	ВМІ=25-30	ВМІ >=30
до 2% риск от ССЗ (нисък)	1.40%	23.60%	31.90%	43.10%
3-9% риск от ССЗ (среден)	0%	17.10%	43.90%	39%
10+% риск от ССЗ (висок)	0%	16.70%	33.30%	50%

От хората, попадащи в групата със нисък риск от ССЗ (до 2%) най-голям дял имат тези с ВМІ >=30 (43.10%), следвани от тези с ВМІ=25-30 (31.9%) Най-нисък е относителния дял на доброволците попадащи в категория ВМІ<18.5 т.е с поднормено тегло според класификацията на СЗО.(Фиг.30А).

Във групата със среден риск от ССЗ (3-9%), най-голям е относителния дял на хората с ВМІ=25-30 (43.9%), следвани от тези със ВМІ >=30 (39%), което се категоризира като затлъстяване, а най-малък дял имат хората с ВМІ=18.5-25 (17.1%) т.е с оптимално тегло според класификацията на СЗО.(Фиг.30Б).

Очаквано се наблюдава увеличаване на относителния дял на хората със съответния риск, заедно с повишаването на ВМІ. От участниците с висок риск от ССЗ (10+%), най-голям е относителният дял на хората с ВМІ >=30 (50.0%), като намалява при тези с ВМІ=25-30 и ВМІ=18.5-25 (33.3% и 16.7% съответно).(Фиг.30В)



Фигура 30. Относителен дял на хората с различен ВМІ във всяка една от рисковите групи по степен на риск от сърдечно-съдови инциденти

В настоящето проучване няма доброволци с поднормено тегло ($BMI < 18.5$) нито в групата със среден, нито в групата с висок риск от ССЗ.

От получените резултати може да се направи извода, че вариабилността *rs174547* в *FADS1* гена е от значение за риск от дислипидемии и кардиоваскуларни инциденти, но не може да служи като категоричен биомаркер за бъдещо развитие на тези състояния.

В разработения математически модел от по-съществено значение за увеличаване на риска от посочените състояния се явяват нивата на общия и LDL холестерола, както и нивата на кръвната глюкоза.

Влияние оказва и BMI , като с неговото повишаване се повишава и риска от ССЗ, без да има разлика в носителството на двата генотипа.

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

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

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

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

В нашето проучване 91 (75.8%) от изследваните 120 лица са без метаболитен синдром. Това са хора, които нямат или имат по-малко от три от изброените показатели за метаболитен синдром. Обособени са две групи лица: идентифицирани с метаболитен синдром и такива без метаболитен синдром. Изследвана е връзката на *rs174547* полиморфизъм с изявата на метаболитен синдром. Резултатите са представени на **Таблица 20**.

Таблица 20. Връзка между генотипната честота на *rs174547* в *FADS1* гена и изявата метаболитен синдром

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

От лицата, с метаболитен синдром, по горните критерии, 16 (55.2%) са с генотип Т/Т, а 13 (44.8%) са с генотип Т/С. При сравняването на двете изследвани групи настоящето проучване, не установихме статистически значима разлика между генотиповете при изявата на метаболитен синдром ($p=0.522$).

На база на получените резултати от анализите на връзката между изследвания генотип и кардиоваскуларния риск, както и на генотипа и изявата на метаболитен синдром, могат да бъдат направени следните изводи:

- ✓ Не се установява статистически значима разлика между генотиповете в рамките на всяка една рискова за кардиоваскуларен инцидент група.
- ✓ Не са установени категорични доказателства за ролята на носителство на изследвания полиморфизъм *rs174547* и изявата на затлъстяване и метаболитен синдром.

- ✓ Въпреки малката извадка се наблюдават някои сходни тенденции с описаните в научната литература.

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

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

Много кандидат-гени и асоциативни проучвания на целия геном (GWAS) свързват минорните алели на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) в гените *FADS1-FADS2* с по-ниски концентрации на LC-PUFA в кръвта. Минорния алел на нуклеотидния полиморфизъм *rs174547* е често свързан с по-високи концентрации на субстрати на десатурационните процеси (като хранителните LA и ALA) и по-ниски концентрации на продуктите на десатурация (като AA, EPA и DHA) (9, 41, 61, 110, 132, 134). Въз основа на данните от тези проучвания е направено заключението, че субектите, носещи *FADS* минорни алели, могат да проявят по-ниска десатуразна активност. Освен това, мета-анализи на данните от някои GWAS проучвания също съобщават за връзки между *FADS* клъстерни SNP и плазмените нива на триглицериди и общ, HDL- и LDL-холестерол (29, 152).

Въпреки че много епидемиологични проучвания свързват хранителния прием на PUFAs със сърдечно-съдови рискови фактори като плазмени липиди и затлъстяване (4, 120, 131), малко проучвания изследват взаимодействието между приетите с храната PUFAs и вариабилността на генния клъстер на FADS върху тези рискови фактори (42, 68, 100). Ето защо целта на настоящето проучване е да се оцени дали и как приемът на SFA, MUFA и PUFA с диетата променя връзката между полиморфизма FADS1 *rs174547* и метаболитните холестеролови маркери в българска популация.

Доброволците взели участие в проучването попълниха детайлни въпросници за начина на хранене и като цяло начина има на живот, като също така трябваше да водят записки на всичко, което консумират като храни и напитки и алкохол за предходните 24 часа в два различни дни от седмицата, като препоръчително беше единият да е работен ден, а другият почивен. Така беше оценен хранителният им прием по отношение на консумацията на SFA, MUFA и PUFA. Статистическия анализ на резултатите е направен с помощта на пакет за статистическа обработка на данни SPSS ver. 17.

Обработени и обобщени данни от средните стойности на биохимичните показатели, разделени по пол и генотип са представени на **Таблица 21**.

От данните се вижда, че средната стойност на триглицеридите в групата на мъжете с генотип C/T е 1.82 ± 1.2 mmol/l, а на мъжете с генотип T/T е 2.08 ± 0.98 mmol/l. Сравнено с референтните стойности (0.3-1.17 mmol/l) и при двата генотипа се отчитат повишени стойности.

Средната концентрация на общия холестерол при мъжете, носители на C/T генотип е 5.57 ± 1.11 mmol/l, а при носителите на T/T генотип 6.41 ± 1.09 mmol/l. Вижда се, че и при двете групи има завишени средни стойности спрямо референтните такива (3.5-5.2 mmol/l).

Таблица 21. Средна стойност, стандартно отклонение и статистическа значимост на разликите на биохимичните плазмени показатели разделени по генотип и пол

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

За статистически значима разлика е приета $p < 0.05$

Статистически значимите разлики са дадени в **Bold**. ($p < 0.05$); TG-триглицериди; Chol-total-общ холестерол; HDL-липопротеини с висока плътност; LDL-липопротеини с ниска плътност; BG-кръвна захар

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

Обобщените данни за LDL холестерола показват средна стойност от 3.58 ± 1.01 mmol/l при мъже носители на C/T генотип и 3.73 ± 1.19 mmol/l при носителите на T/T генотип. Според референтните стойности, посочени от Европейската общност по атеросклероза, тези стойности попадат в графата

гранично високи (от 3.37 до 4.13 mmol/l) и покзват увеличен риск от дислипидемии и сърдечно-съдови заболявания.

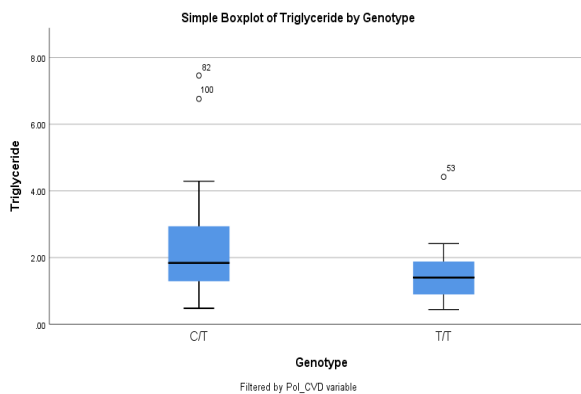
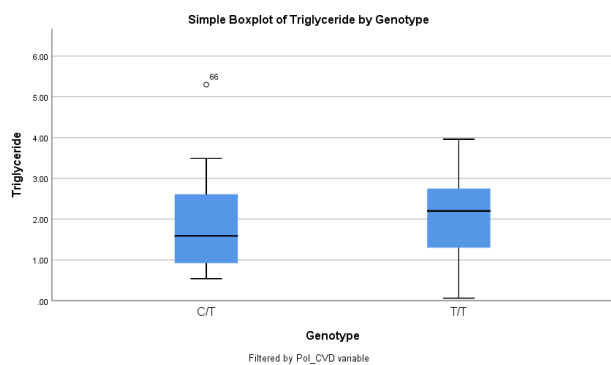
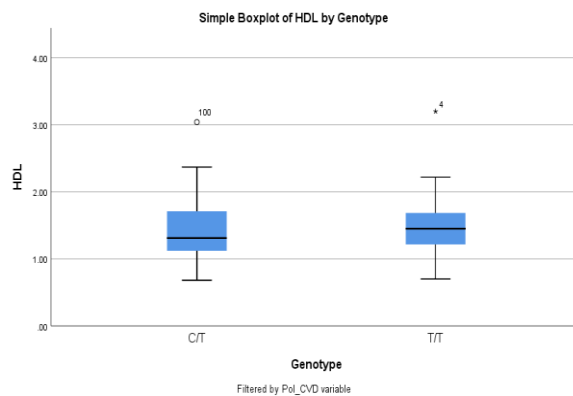
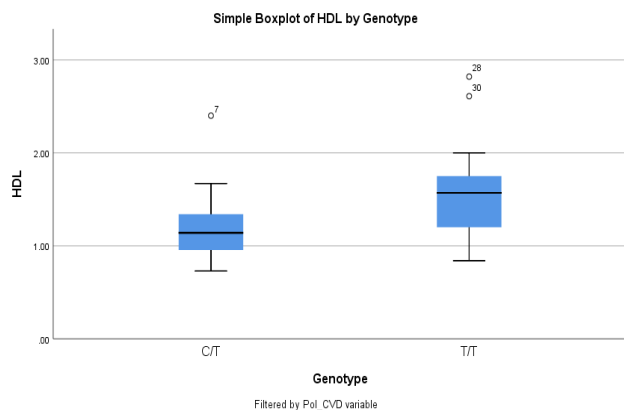
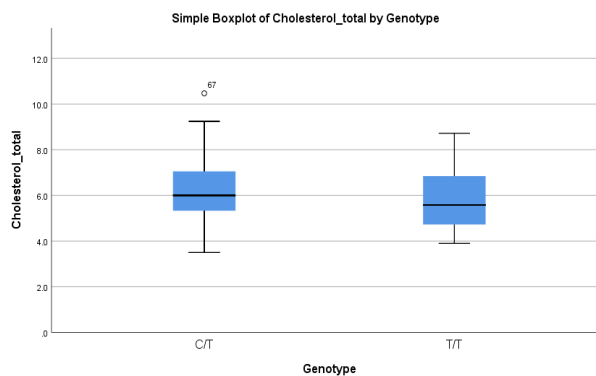
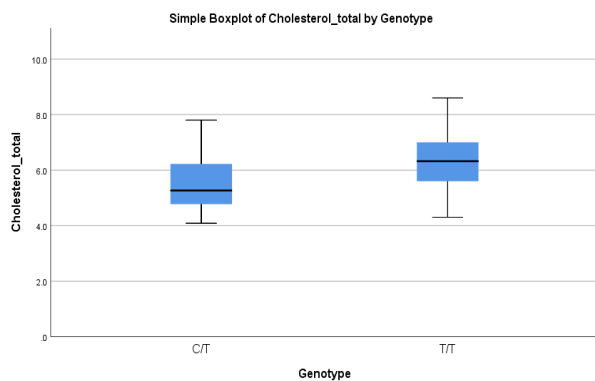
При жените с генотип С/Т средната стойност на триглицеридите е 2.34 ± 1.55 mmol/l, а при генотип Т/Т е 1.49 ± 0.73 mmol/l. Отклонение от референтните стойности (0.3-1.7 mmol/l) показват само носителките на С/Т генотип.

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

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

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

За да анализираме дали има статистически значима разлика между средните нива на триглицеридите (TG), различните фракции на холестерола (HDL, LDL, Chol-total), кръвната захар при носителите на двата генотипа (С/Т и Т/Т), отново беше проведен тест на Mann-Whitney за сравнение на средни стойности между две независими извадки, при ненормално разпределени количествени променливи. Резултатите от статистическите тестове са представени в **Таблица 21** и графично на **Фигура 31**.



А) Мъже

Б) Жени

Фигура 31. Графично представяне на разликите в средните нива на общ холестерол (Cholesterol total), LDL холестерол и триглицеридите (Triglycerides) при различните генотипове (C/T и T/T) разделени по пол: А) мъже; Б) жени

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

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

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

Статистическия анализ за значима разлика между среднодневния прием на различни мастни киселини (SFA, MUFA и PUFA) при носителите на двата генотипа (C/T и T/T), беше осъществен чрез тест на Mann-Whitney за сравнение на средни стойности между две независими извадки, при ненормално разпределени количествени променливи. Резултатите от тестовете са представени в **Таблица 22** и графично на **Фигура 32**.

Разликата в среднодневния прием на наситени мастни киселини, постъпили с храната между носители на C/T генотип (36.91 ± 18.57) и T/T генотип (37.25 ± 19.74) при мъжете е $P=0.647$, а при жените (27.16 ± 13.38 за C/T и 26.47 ± 11.06 за T/T) е $P=0.059$. (при значимост $P<0.05$). Разликите в среднодневния приема на мононенаситени мастни киселини между носителите на двата генотипа е $P=0.842$ при мъжете (31.51 ± 16.56 за C/T и 30.81 ± 14.36 за T/T) и $P=0.054$ при жените (22.03 ± 9.46 за C/T и 24.38 ± 13.30 за

T/T). И при средно дневния прием на полиненаситени мастни киселини отново не се достига статистически значима разлика между представителите на C/T (30.00±15.17 за мъже и 22.13±10.86 за жени) и T/T (31.08±16.12 за мъже и 24.76±11.59 за жени) генотип (P=0.647 в групата на мъжете и P=0.111 при жените при значимост P<0.05).

Таблица 22. Средна стойност, стандартно отклонение и статистическа значимост на разликите в среднодневния прием на мастни киселини, разделени по генотип и пол

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

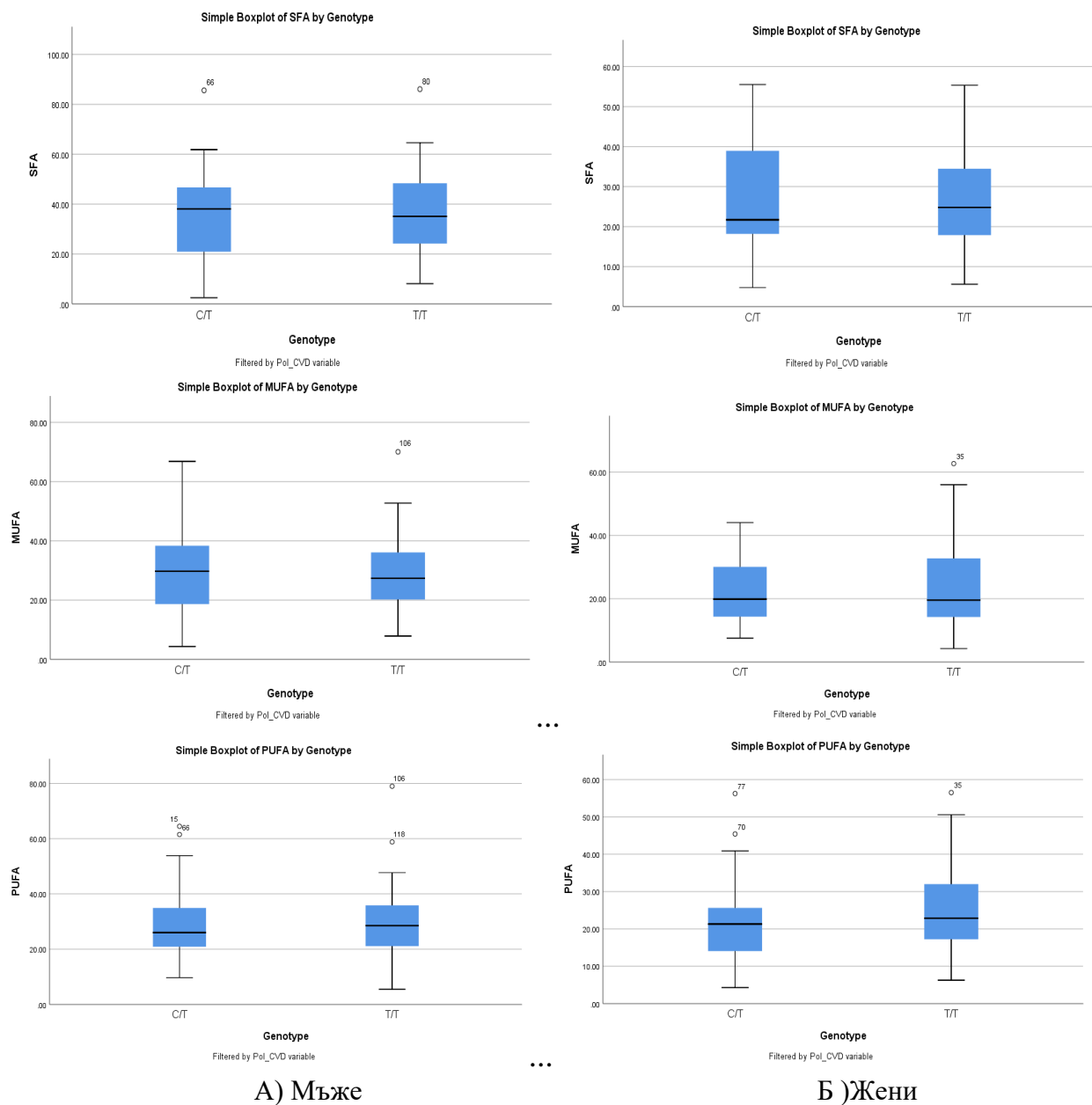
SFA - наситени мастни киселини (среднодневен прием, g.)

MUFA- мононенаситени мастни киселини (среднодневен прием, g.)

PUFA- полиненаситени мастни киселини (среднодневен прием, g.)

От проведените статистически тестове **не** беше открита статистически значима разлика в среднодневния прием на различни мастни киселини (наситени, мононенаситени и полиненаситени) между носителите на двата генотипа C/T и T/T. Както може да се види от **Табл. 22**, нито един от изследваните параметри не покри критерия за статистическа значимост

$P < 0.05$. между двете изследвани групи. Трябва да се отбележи, че разликите са още по-незначителни, ако двете групи са разделени само по генотип, но не и по пол. Този факт сочи, че е възможно да съществуват полово обусловени разлики при приема на различните мастни киселини.



Фигура 32. Разлики в среднодневния прием на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини, приети с храната, при различните генотипове (C/T и T/T) и разпределени по пол А) мъже; Б) жени

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

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

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

- ✓ Не се наблюдава статистически значима корелация между среднодневния прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и LDL плазмен холестерол при жените с T/T генотип ($r = -0.115$, $p=0.485$).
- ✓ Не е установена и статистически значима корелация между среднодневния прием на мононенаситени мастни киселини (MUFA) и LDL плазмен холестерол при мъжете с C/T генотип ($r=-0.206$, $p=0.347$).
- ✓ Не се намира и статистически значима корелация между плазмените нива на фракциите на холестерола (HDL, LDL, Total-Chol) и триглицеридите и среднодневния прием на полиненаситени мастни киселини (PUFA), нито по пол нито по генотип.
- ✓ Проведения регресионен анализ показва, че променливите генотип, прием на мононенаситени и полиненаситени мастни киселини имат влияние, но обясняват едва 1.9% от стойността на общия холестерол, което е ясна индикация, че вариабилността в холестероловия профил е сложен и многопластов процес, който има множество детерминанти, както генетични, така и епигенетични.

Получените от нас резултати донякъде съвпадат с резултатите на *Dumont et.al.*, които за да определят дали приемът на различните нисковерижни PUFAs с храната може да промени въздействието на *rs174547* върху липидния профил и някои фенотипни белези на затлъстяване, провеждат статистически анализ на взаимодействието между гените и храненето. Техният анализ потвърждава връзката между *rs174547* и плазмените нива на липидите и разкрива връзка с обиколката на талията и индекса на телесна маса. Тези асоциации не са модифицирани от хранителния прием на ALA (всички p -взаимодействия > 0.05). За разлика от това, асоциациите с нивата на HDL-холестерол, обиколката на талията и ИТМ са модулирани от хранителния прием на LA (p взаимодействие <0.05). Само при

хора, консумиращи високи количества LA, минорния алел *rs174547* е значително свързан с по-ниски нива на HDL-холестерол ($\beta=-0.05$ mmol/L, $p=0.0002$). Освен това всяко копие на минорния алел *rs174547* е свързано с 1.58 cm по-ниска обиколка на талията ($p=0.0005$) и 0.46 kg.m² по-нисък ИТМ ($p=0.01$) в групата с нисък прием на LA, но не и в групата с висок LA прием.

Тези резултати предполагат значително въздействие на минорния алел *FADS1 rs174547 C* върху плазмените липиди (общ и LDL-холестерол). Минорните алели на SNP при неравновесие с висока връзка с *rs174547* са последователно свързани с по-високи нива на субсатурационни субстрати (като LA и ALA) и по-ниски нива на продукти за десатурация (като AA, ейкозапентаенова киселина и докозапентаенова киселина). Тези открития обаче не бяха потвърдени от резултатите в нашето проучване. Това може да се дължи на сравнително ограничени брой доброволци, по-различния подход или на факта, че ние използваме двукратен запис на хранителния прием, а в цитираното по-горе проучване са използвали данни от 3-дневен хранителен дневник.

Hellstrand et al. съобщават за връзка между висок прием на хранителни ALA/LA и по-високи концентрации на HDL при *rs174547 C* носители на минорния алел (68). В метаболитно отношение една по-ниска *FADS1* активност (както се наблюдава при минорния алел *rs174547*) в комбинация с висок прием на LA може да доведе до натрупване на LA, което може да потисне производството на n-3 LC-PUFAs (58, 97) и следователно може да намали ефекта им на повишаване на HDL холестерола (78, 160, 166). Въпреки че са необходими функционални експерименти за изясняване на основните биологични механизми, данните сочат, че обичайния приема на LA може да модулира ефектите от генетичната вариабилност на *FADS* върху концентрациите на HDL-холестерола.

От проведените анализи и получените резултати за взаимодействието между генотипа и холестерола и модифицирането на тази връзка от приема на мастни киселини с храната, могат да се направят следните изводи:

- ✓ Сред мъжете има статистически значими различия в средните нива на общия холестерол ($P=0.012$) и HDL холестерол ($P=0.008$) между двата проучвани генотипа. Статистически сигнификантна разлика в нивата на триглицеридите ($P=0.189$), LDL холестерола ($P=0.259$) и кръвната глюкоза ($P=0.112$) между двете генотипни групи не беше намерена.
- ✓ В групата на жените се установи статистически значима разлика между двете генотипни групи само в нивата на триглицеридите ($P=0.007$), но не при другите кръвно-плазмени показатели (за Chol-total: $P=0.121$, за HDL: $P=0.950$, за LDL: $P=0.975$ и за кръвна глюкоза: $P=0.678$, при $P<0.05$).
- ✓ Не се открива статистически значима разлика в среднодневния прием на различни мастни киселини (наситени, мононенаситени и полиненаситени) между носителите на двата генотипа C/T и T/T.
- ✓ Настоящото проучване установява, че хранителният прием на различни видове мастни киселини (SFA, MUFA, PUFA) може да модулира връзката между вариантите на гена *FADS1* и концентрацията на някои от фракциите на холестерола и триглицеридите, и тези взаимодействия са полово обусловени.
- ✓ Резултатите от проведените анализи сочат, че въпреки че генотипът, и приемът на мононенаситени и полиненаситени мастни киселини имат влияние, те обясняват едва 1.9% от стойността на общия холестерол, което е ясна индикация, че вариабилността в холестероловия профил е сложен и многопластов процес, който има множество детерминанти - както генетични, така и епигенетични.

6. ОБОБЩЕНИЕ

В настоящето проучване е разработена цялостна и завършена методология за откриване и проучване на единичния нуклеотиден полиморфизъм *rs174547* във десатуразния ген *FADS1* с помощта на специфични молекулярно-генетични методи и подходи. Проучени са неговите ефекти върху плазмения холестеролов статус, кръвна захар и някои антропометрични параметри. Като цяло липсва цялостно разбиране за детерминантите на регулирането на метаболитния път на десатурация и удължаване на мастните киселини. Въпреки че, често срещаните генни вариации на *FADS1* постоянно се свързват със LC-PUFA - статуса, точният мащаб на ефекта е сравнително неопределен и функционалните варианти на FADS все още не са напълно установени.

Потърсена е взаимовръзка на генетичните варианти на *FADS1* гена с развитието на кардиоваскуларни инциденти, както и с наднорменото тегло и затлъстяването, често срещани състояния както в нашата страна, така и в световен мащаб.

Като особен принос към тази научна разработка може да се подчертае, че подобен тип проучвания не са правени досега за българска популация, както по отношение на разпространението на генотипа на българска територия, така и по отношение на нутригенетичното му взаимодействие със среднодневния прием на различни видове мастни киселини, постъпващи с диетата - наситени, мононенаситени и полиненаситени. Интерес предизвикват и разликите на тези нутригенетични взаимодействия при мъжете и жените, като се оказва, че при мъжете тя е по-осезаема, като се отразява на повече компоненти на холестероловия профил.

Очертани са и насоките на търсене на подходящо имплементиране на тези научни открития и резултати в реални подходи за персонализирано

хранене и медицина, както в условията на развитието на диетологията у нас, така и практиките, използвани от чуждестранни специалисти в областта на храненето, диететиката и персонализираното хранене. Специално внимание е обърнато на напредъка на директното генетично тестване в диетологията и науката за хранене и развитието на бизнес моделите на фирми, предлагащи генетични тествания с различен характер и как, и дали разкриването на генетичната информация носи ползи в посока на корекция на хранителното поведение и начина на живот като цяло.

Достигането до оптимални за конкретния индивид и неговия генетичен терен, съвети за хранене и предписания за начина на живот всъщност е една от главните задачи на нутригенетиката и нутригеномиката. Осигуряването на оптимални условия за изявата на благоприятните за здравето генетични варианти чрез осъзнато приемане на полезни нутриенти и съответно избягване на вредни вещества, токсини или нутриенти, натоварващи метаболизма е целта на персонализираното хранене и по-общо персонализираната медицина

Ключова част от персонализираната медицина включва изследователска работа, която разглежда влиянието на различни генетичните вариации при човека, свързвани с модифициране на индивидуалният отговор към хранителния прием, насочен към разнообразни здравни резултати (79). Засяга се ролята на храненето като може би един от най-важните модификатори на риска от хронични заболявания (115). Все повече на фармацевтичния пазар навлизат генетични тестове насочени пряко към потребителите. Повечето от тях, обаче дават оценки базирани на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), определящи податливостта към различни заболявания или индивидуален ефект от някои медикаменти. При тези варианти на генетичните тестове не се вземат под внимание факторите на

околната среда. За сложни, мултифакторни заболявания, включително такива свързани с храненето и хроничните заболявания, оценка на риска, основана единствено на генетичните различия, без разглеждане на взаимодействията им с околната среда, могат да бъдат крайно неточни (161) Следователно, генетични тестове за персонализирано хранене на базата на модифициращи или метаболитни гени, могат да имат потенциала да бъдат по-полезни, отколкото генетични изследвания, определящи податливостта на дадения индивид към болестта. Това е така, защото съветите, които биха могли да се дадат на база на резултатите от нутригенетични тестове са по-специфични и базирани се на тях може да се действа веднага, отколкото могат да бъдат спазвани здравни съвети, произтичащи от тест за предразположение към заболяване. Всъщност, проучване на *Nielsen* и *El-Sohemy* показва, че хората смятат ДНК-базираните диетични съвети, за по-полезни и разбираеми от общоприетите, базирани на популацията препоръки за здравословно и рационално хранене. Индивидите в проучването докладват, че те биха били по-мотивирани да променят диетата си, ако им е осигурена персонализирана информация за хранителния режим на базата на тяхната генетика (117). Лица, на които са били анализирани геномите докладват, че генетичната информация се е отразила върху тяхното хранително поведение, въпреки че генетичната информация, която те са получили не е задължително свързана с конкретна диетична модификация (80).

Очакванията, че съобщаването на ДНК базирани оценки на риска променя поведението, не се подкрепя от всички съществуващи доказателства. Резултатите от някои проучвания не подкрепят използването на генетични тестове или търсенето на генетични варианти за често срещани сложни заболявания, въз основа на това, че те мотивират поведението за намаляване

на риска. По-скоро се показва, че нямат голямо влияние върху поведението и избора на начина на живот (71).

Понастоящем нарастват специализираните компании, предлагащи услуги за генетично тестване без прякото участие на клиницисти и други специалисти от областта на храненето. Това развитие е пряка последица от значителното намаляване на разходите за генотипиране и секвениране. Онлайн базираните компании предлагат прогнози за риска от развитие на сложни заболявания в хода на живота на дадения клиент и дават предложения за промяна на стила на хранене и грижа за здравето. Към момента съществуват няколко компании, които предоставят услуги в областта на нутригенетиката, но броят им нараства бързо. Тези компании предлагат диетични модификации въз основа на личния генетичен терен, тъй като вече е известно, че храненето е централен въпрос в превенцията и етиопатогенезата на специфични заболявания. При този подход обаче, диетичните модели се определят въз основа на ограничен набор от генетични маркери. Критичният анализ и наблюденията на изследователите в областта ясно подчертават необходимостта от конкретни насоки, за да се осигури набор от минимални стандарти за качество на хранителните услуги, предлагани на клиента.

От друга страна регистрираните диетолози се разпознават като основните експерти по клинично хранене и диететика, но техните знания и нагласи по отношение на нутригенетиката все още не са очертани и хармонизирани. В скорошно проучване от 2018 г., са изследвани данни за знания и нагласи към нутригенетиката, както и информация за обучение по нутригенетика. В него са взели участие 169 специалисти, участници в конференция по хранене и диететика, като по-голямата част от тях били регистрирани диетолози. Резултатите показали, че персонализираното хранене се възприема от 93.5% от участниците като изключително важно или

важно; 94% от анкетиранияте обаче посочват, че не са достатъчно добре информирани относно персонализирано хранене и само 9.5% са преминали обучение по нутригенетика. Диетолозите признават значението на все по-напредващите проучвания в областта на нутригенетиката, но имплементирането им в клиничната практика става резервирано и плахо.

В заключение може да се каже, че персонализираното хранене е бързо развиваща се област, която включва използването и интерпретирането на генетична информация и само чрез придобиване на необходимите знания диетолозите могат точно да преведат тази нутригенетична информация в клинична практика. Всяко ново знание в областта на нутригенетиката за дадена популация е значим принос в хранителната епидемиология и подобряването качеството на живот. Именно това са инструментите за превенция на хроничните незаразни болести.

7. ИЗВОДИ

- ✓ Разработена и валидирана е надеждна методология за откриване и анализ на генетични варианти *rs174547* във *FADS1*, високо специфична за анализирания C/T SNP.
- ✓ За първи път е определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред българска популация по отношение на *rs174547* SNP полиморфизъм в гена *FADS1*.
- ✓ Установено е, че молекулярният биомаркер *rs174547* позволява да се направи индивидуална оценка на метаболизма на мастните киселини и да се проучи взаимодействието между генетичната предразположеност, индивидуалния метаболизъм и приема на храна.
- ✓ Установена е ниска честотата на консумация на храни, богати на полиненаситени мастни киселини сред изследваната група. Няма статистически значима разлика в честотата на консумация на тези храни между различните генотипове T/T и C/T, регистрирани в проучването.
- ✓ В комбинация с ниската консумация на полиненаситени мастни киселини, изследвания генетичен терен (*rs174547*) може да бъде сериозна предпоставка за повишен риск от сърдечно-съдови инциденти, дислипидемия и висока смъртност.
- ✓ Вариабилността *rs174547* в *FADS1* гена би могла да допринася за податливостта на кардиоваскуларни инциденти и дислипидемии чрез промяна на нивата на HDL-C и TG.
- ✓ Не са установени категорични доказателства за ролята на носителство на изследвания полиморфизъм *rs174547* и изявата на затлъстяване и метаболитен синдром.

- ✓ Установи се, че хранителният прием на различни видове мастни киселини (SFA, MUFA, PUFA) може да модулира връзката между вариантите на гена *FADS1* и концентрацията на някои от фракциите на холестерола и триглицеридите, което е полово обусловено и при мъжете се отразява на повече компоненти на холестероловия профил.
- ✓ Установените взаимодействия между генните варианти С/Т и Т/Т и мастните киселини, приемани с храната, дават възможност за персонализиране и оптимизиране на хранителния модел с цел бъдещи здравни ползи.

8. ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ПРИЛОЖНО - МЕТОДОЛОГИЧЕН ХАРАКТЕР

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

ПРИНОСИ С НАУЧНО - ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР

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

9. ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1. Abumweis, S. S., S. K. Panchal, P. J. H. Jones. Triacylglycerol-Lowering Effect of Docosahexaenoic Acid Is Not Influenced by Single-Nucleotide Polymorphisms Involved in Lipid Metabolism in Humans. *Lipids*. 2018;53(9):897-908.
2. Aruoma, O. I., S. Hausman-Cohen, J. Pizano, M. A. Schmidt, D. M. Minich, Y. Joffe, S. Brandhorst, S. J. Evans, D. M. Brady. Personalized Nutrition: Translating the Science of NutriGenomics Into Practice: Proceedings From the 2018 American College of Nutrition Meeting. *Journal of the American College of Nutrition*. 2019;38(4):287-301.
3. Astrup, A., N. Finer. Redefining Type 2 diabetes: 'Diabesity' or 'Obesity Dependent Diabetes Mellitus'? *Obesity Reviews*. 2000;1(2):57-59.
4. Bender, N., M. Portmann, Z. Heg, K. Hofmann, M. Zwahlen, M. Egger. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2014;15(8):657-665.
5. Betteridge, D. J. Lipid control in patients with diabetes mellitus. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(5):278-90.
6. Blair, H. C., J. Sepulveda, D. J. Papachristou. Nature and nurture in atherosclerosis: The roles of acylcarnitine and cell membrane-fatty acid intermediates. *Vascular pharmacology*. 2016;78:17-23. PMID: 4696919.
7. Blau, N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Human mutation*. 2016;37(6):508-15.
8. Bloss, C. S., N. J. Schork, E. J. Topol. Effect of direct-to-consumer genomewide profiling to assess disease risk. *The New England journal of medicine*. 2011;364(6):524-34. PMID: 3786730.
9. Bokor, S., J. Dumont, A. Spinneker, M. Gonzalez-Gross, E. Nova, K. Widhalm, G. Moschonis, P. Stehle, P. Amouyel, S. De Henauw, D. Molnar, L. A. Moreno, A. Meirhaeghe, J. Dallongeville, H. S. Group. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *Journal of lipid research*. 2010;51(8):2325-33. PMID: 2903808.
10. Bouchard, C., J. M. Ordovas. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. *Progress in molecular biology and translational science*. 2012;108:1-15.
11. Bridger, T. Childhood obesity and cardiovascular disease. *Paediatrics & child health*. 2009;14(3):177-82. PMID: 2690549.
12. Brunner, E. J., A. Mosdol, D. R. Witte, P. Martikainen, M. Stafford, M. J. Shipley, M. G. Marmot. Dietary patterns and 15-y risks of major coronary events, diabetes, and mortality. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(5):1414-21.
13. Burdge, G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2004;7(2):137-44.
14. Burr, G. O., M. M. Burr. On the nature and role of fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem*. 1932;86:587-622.
15. Burr, M. L., A. M. Fehily, J. F. Gilbert, S. Rogers, R. M. Holliday, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood, N. M. Deadman. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*. 1989;2(8666):757-61.
16. Calle, E. E., R. Kaaks. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(8):579-591.

17. Caspi, A., B. Williams, J. Kim-Cohen, I. W. Craig, B. J. Milne, R. Poulton, L. C. Schalkwyk, A. Taylor, H. Werts, T. E. Moffitt. Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18860-5. PMID: 2141867.
18. Caulfield, T., A. L. Mcguire. Direct-to-consumer genetic testing: perceptions, problems, and policy responses. *Annual review of medicine*. 2012;63:23-33.
19. Chang, J. C., Y. W. Kan. beta 0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(6):2886-9. PMID: 383714.
20. Chao, S., J. S. Roberts, T. M. Marteau, R. Silliman, L. A. Cupples, R. C. Green. Health behavior changes after genetic risk assessment for Alzheimer disease: The REVEAL Study. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2008;22(1):94-7. PMID: 2483341.
21. Cherkas, L. F., J. M. Harris, E. Levinson, T. D. Spector, B. Prainsack. A survey of UK public interest in internet-based personal genome testing. *PloS one*. 2010;5(10):e13473. PMID: 2957412.
22. Cho, H. P., M. Nakamura, S. D. Clarke. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37335-9.
23. Cho, H. P., M. T. Nakamura, S. D. Clarke. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem*. 1999;274(1):471-7.
24. Christ, S. E. Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *Journal of the history of the neurosciences*. 2003;12(1):44-54.
25. Cohen, J. C., E. Boerwinkle, T. H. Mosley, H. H. Hobbs. Sequence Variations in PCSK9, Low LDL, and Protection against Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(12):1264-1272.
26. Collaboration, C. T. T. C. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2010;376(9753):1670-1681.
27. Collaboration, P. S. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. *The Lancet*. 2007;370(9602):1829-1839.
28. Collaboration, T. E. R. F. Lipid-Related Markers and Cardiovascular Disease Prediction. *Jama*. 2012;307(23).
29. Consortium, G. L. G. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature genetics*. 2013;45(11):1274-1283.
30. Cordain, L., S. B. Eaton, A. Sebastian, N. Mann, S. Lindeberg, B. A. Watkins, J. H. O'keefe, J. Brand-Miller. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(2):341-54.
31. Cormier, H., I. Rudkowska, A. M. Paradis, E. Thifault, V. Garneau, S. Lemieux, P. Couture, M. C. Vohl. Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients*. 2012;4(8):1026-41. PMID: 3448085.
32. Cormier, H., I. Rudkowska, E. Thifault, S. Lemieux, P. Couture, M. C. Vohl. Polymorphisms in Fatty Acid Desaturase (FADS) Gene Cluster: Effects on Glycemic Controls Following an Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Supplementation. *Genes*. 2013;4(3):485-98. PMID: 3924828.
33. Cornelis, M. C., A. El-Sohemy, E. K. Kabagambe, H. Campos. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *Jama*. 2006;295(10):1135-41.

34. Cupples, L. A., L. A. Farrer, A. D. Sadovnick, N. Relkin, P. Whitehouse, R. C. Green. Estimating risk curves for first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease: the REVEAL study. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2004;6(4):192-6.
35. De Antueno, R. J., L. C. Knickle, H. Smith, M. L. Elliot, S. J. Allen, S. Nwaka, M. D. Winther. Activity of human Delta5 and Delta6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS letters*. 2001;509(1):77-80.
36. Del Prado, M., S. Villalpando, A. Elizondo, M. Rodriguez, H. Demmelmair, B. Koletzko. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(2):242-7.
37. Demmelmair, H., U. Von Schenck, E. Behrendt, T. Sauerwald, B. Koletzko. Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of 13C content. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1995;21(1):31-6.
38. Deshpande, A. D., M. Harris-Hayes, M. Schootman. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Physical therapy*. 2008;88(11):1254-64. PMID: 3870323.
39. Desroches, S., A. Lapointe, S. Ratte, K. Gravel, F. Legare, J. Thirsk. Interventions to enhance adherence to dietary advice for preventing and managing chronic diseases in adults: a study protocol. *BMC public health*. 2011;11:111. PMID: 3050748.
40. Dixon, A. L., L. Liang, M. F. Moffatt, W. Chen, S. Heath, K. C. Wong, J. Taylor, E. Burnett, I. Gut, M. Farrall, G. M. Lathrop, G. R. Abecasis, W. O. Cookson. A genome-wide association study of global gene expression. *Nature genetics*. 2007;39(10):1202-7.
41. Dorajoo, R., Y. Sun, Y. Han, T. Ke, A. Burger, X. Chang, H. Q. Low, W. Guan, R. N. Lemaitre, C.-C. Khor, J.-M. Yuan, W.-P. Koh, C. N. Ong, E. S. Tai, J. Liu, R. M. Van Dam, C.-K. Heng, Y. Friedlander. A genome-wide association study of n-3 and n-6 plasma fatty acids in a Singaporean Chinese population. *Genes & nutrition*. 2015;10(6).
42. Dumont, J., I. Huybrechts, A. Spinneker, F. Gottrand, E. Grammatikaki, N. Bevilacqua, K. Vyncke, K. Widhalm, A. Kafatos, D. Molnar, I. Labayen, M. Gonzalez-Gross, P. Amouyel, L. A. Moreno, A. Meirhaeghe, J. Dallongeville. FADS1 Genetic Variability Interacts with Dietary α -Linolenic Acid Intake to Affect Serum Non-HDL-Cholesterol Concentrations in European Adolescents. *The Journal of nutrition*. 2011;141(7):1247-1253.
43. Dwyer, J. H., H. Allayee, K. M. Dwyer, J. Fan, H. Wu, R. Mar, A. J. Lusic, M. Mehrabian. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2004;350(1):29-37.
44. Esposito, K., D. Giugliano. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *European heart journal*. 2006;27(1):15-20.
45. Evans, D. A., D. Harmer, D. Y. Downham, E. J. Whibley, J. R. Idle, J. Ritchie, R. L. Smith. The genetic control of sparteine and debrisoquine metabolism in man with new methods of analysing bimodal distributions. *Journal of medical genetics*. 1983;20(5):321-9. PMID: 1049142.
46. Farrer, L. A., L. A. Cupples, C. M. Van Duijn, A. Kurz, R. Zimmer, U. Muller, R. C. Green, V. Clarke, J. Shoffner, D. C. Wallace, Et Al. Apolipoprotein E genotype in patients with Alzheimer's disease: implications for the risk of dementia among relatives. *Annals of neurology*. 1995;38(5):797-808.
47. Ference, B. A., H. N. Ginsberg, I. Graham, K. K. Ray, C. J. Packard, E. Bruckert, R. A. Hegele, R. M. Krauss, F. J. Raal, H. Schunkert, G. F. Watts, J. Borén, S. Fazio, J. D. Horton, L. Masana, S. J. Nicholls, B. G. Nordestgaard, B. Van De Sluis, M.-R. Taskinen, L. Tokgözoğlu, U. Landmesser, U. Laufs, O. Wiklund, J. K. Stock, M. J. Chapman, A. L. Catapano. Low-density

- lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European heart journal*. 2017;38(32):2459-2472.
48. Ference, B. A., I. Graham, L. Tokgozoglu, A. L. Catapano. Impact of Lipids on Cardiovascular Health. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(10):1141-1156.
49. Ference, B. A., J. J. P. Kastelein, K. K. Ray, H. N. Ginsberg, M. J. Chapman, C. J. Packard, U. Laufs, C. Oliver-Williams, A. M. Wood, A. S. Butterworth, E. Di Angelantonio, J. Danesh, S. J. Nicholls, D. L. Bhatt, M. S. Sabatine, A. L. Catapano. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C–Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *Jama*. 2019;321(4):364.
50. Ference, B. A., W. Yoo, I. Alesh, N. Mahajan, K. K. Mirowska, A. Mewada, J. Kahn, L. Afonso, K. A. Williams, J. M. Flack. Effect of Long-Term Exposure to Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Beginning Early in Life on the Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(25):2631-2639.
51. Ferguson, L. R. *Nutrigenomics and nutrigenetics in functional foods and personalized nutrition*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2014.
52. Frikke-Schmidt, R. Association of Loss-of-Function Mutations in the ABCA1 Gene With High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Risk of Ischemic Heart Disease. *Jama*. 2008;299(21):2524.
53. Fung, T. T., E. B. Rimm, D. Spiegelman, N. Rifai, G. H. Tofler, W. C. Willett, F. B. Hu. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(1):61-7.
54. Goddard, K. A., D. Duquette, A. Zlot, J. Johnson, A. Annis-Emeott, P. W. Lee, M. P. Bland, K. L. Edwards, K. Oehlke, R. T. Giles, A. Rafferty, M. L. Cook, M. J. Khoury. Public awareness and use of direct-to-consumer genetic tests: results from 3 state population-based surveys, 2006. *American journal of public health*. 2009;99(3):442-5. PMID: 2661444.
55. Godino, J. G., E. M. Van Sluijs, T. M. Marteau, S. Sutton, S. J. Sharp, S. J. Griffin. Lifestyle Advice Combined with Personalized Estimates of Genetic or Phenotypic Risk of Type 2 Diabetes, and Objectively Measured Physical Activity: A Randomized Controlled Trial. *PLoS medicine*. 2016;13(11):e1002185. PMID: 5127499.
56. Goedde, H. W. Ethnic differences in reactions to drugs and other xenobiotics outlook of a geneticist. *Progress in clinical and biological research*. 1986;214:9-20.
57. Gonzalez, F. J., R. C. Skoda, S. Kimura, M. Umeno, U. M. Zanger, D. W. Nebert, H. V. Gelboin, J. P. Hardwick, U. A. Meyer. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*. 1988;331(6155):442-6.
58. Goyens, P. L. L., M. E. Spilker, P. L. Zock, M. B. Katan, R. P. Mensink. Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(1):44-53.
59. Gray, S. W., S. E. Gollust, D. A. Carere, C. A. Chen, A. Cronin, S. S. Kalia, H. Q. Rana, M. T. T. Ruffin, C. Wang, J. S. Roberts, R. C. Green. Personal Genomic Testing for Cancer Risk: Results From the Impact of Personal Genomics Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(6):636-644. PMID: 5455805.
60. Green, R. C., J. S. Roberts, L. A. Cupples, N. R. Relkin, P. J. Whitehouse, T. Brown, S. L. Eckert, M. Butson, A. D. Sadovnick, K. A. Quaid, C. Chen, R. Cook-Deegan, L. A. Farrer, R. S. Group. Disclosure of APOE genotype for risk of Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2009;361(3):245-54. PMID: 2778270.

61. Guan, W., B. T. Steffen, R. N. Lemaitre, J. H. Y. Wu, T. Tanaka, A. Manichaikul, M. Foy, S. S. Rich, L. Wang, J. A. Nettleton, W. Tang, X. Gu, S. Bandinelli, I. B. King, B. Mcknight, B. M. Psaty, D. Siscovick, L. Djousse, Y.-D. Ida Chen, L. Ferrucci, M. Fornage, D. Mozafarrian, M. Y. Tsai, L. M. Steffen. Genome-Wide Association Study of Plasma N6 Polyunsaturated Fatty Acids Within the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2014;7(3):321-331.
62. Guasch-Ferre, M., H. S. Dashti, J. Merino. Nutritional Genomics and Direct-to-Consumer Genetic Testing: An Overview. *Advances in nutrition*. 2018;9(2):128-135. PMID: 5916428.
63. Guerra, A., H. Demmelmair, A. M. Toschke, B. Koletzko. Three-year tracking of fatty acid composition of plasma phospholipids in healthy children. *Annals of nutrition & metabolism*. 2007;51(5):433-8.
64. H, H., G. N. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key role of dendritic cells. *Tissue Antigens* 2005;65:507–14.
65. Hamosh, A., T. M. King, B. J. Rosenstein, M. Corey, H. Levison, P. Durie, L. C. Tsui, I. Mcintosh, M. Keston, D. J. Brock, Et Al. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly---Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *American journal of human genetics*. 1992;51(2):245-50. PMID: 1682672.
66. Hansen-Petrik, M. B., M. F. Mcentee, B. T. Johnson, M. G. Obukowicz, J. Masferrer, B. Zweifel, C. H. Chiu, J. Whelan. Selective inhibition of Delta-6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis. *Cancer letters*. 2002;175(2):157-63.
67. Harslof, L. B., L. H. Larsen, C. Ritz, L. I. Hellgren, K. F. Michaelsen, U. Vogel, L. Lauritzen. FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *The American journal of clinical nutrition*. 2013;97(6):1403-10.
68. Hellstrand, S., E. Sonestedt, U. Ericson, B. Gullberg, E. Wirfalt, B. Hedblad, M. Orho-Melander. Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. *Journal of lipid research*. 2012;53(6):1183-9. PMID: 3351825.
69. Hinds D.A, Stuve L.L., Nilsen G.B., Halperin E., Eskin E., Ballinger D.G., Frazer K.A., C. D.R. Whole-Genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005;307(5712):1072-1079.
70. Hlavaty, P., E. Tvrzicka, B. Stankova, H. Zamrazilova, B. Sedlackova, L. Dusatkova, V. Hainer, M. Kunesova. Association of plasma lipids fatty acid composition with metabolic profile of Czech adolescents. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2015;64 Suppl 2:S167-75.
71. Hollands, G. J., D. P. French, S. J. Griffin, A. T. Prevost, S. Sutton, S. King, T. M. Marteau. The impact of communicating genetic risks of disease on risk-reducing health behaviour: systematic review with meta-analysis. *Bmj*. 2016;i1102.
72. Holmes, M. V., F. W. Asselbergs, T. M. Palmer, F. Drenos, M. B. Lanktree, C. P. Nelson, C. E. Dale, S. Padmanabhan, C. Finan, D. I. Swerdlow, V. Tragante, E. P. A. Van Iperen, S. Sivapalaratnam, S. Shah, C. C. Elbers, T. Shah, J. Engmann, C. Giambartolomei, J. White, D. Zabaneh, R. Sofat, S. Mclachlan, P. A. Doevendans, A. J. Balmforth, A. S. Hall, K. E. North, B. Almoquera, R. C. Hoogeveen, M. Cushman, M. Fornage, S. R. Patel, S. Redline, D. S. Siscovick, M. Y. Tsai, K. J. Karczewski, M. H. Hofker, W. M. Verschuren, M. L. Bots, Y. T. Van Der Schouw, O. Melander, A. F. Dominiczak, R. Morris, Y. Ben-Shlomo, J. Price, M. Kumari, J. Baumert, A. Peters, B. Thorand, W. Koenig, T. R. Gaunt, S. E. Humphries, R. Clarke, H. Watkins, M. Farrall, J. G. Wilson, S. S. Rich, P. I. W. De Bakker, L. A. Lange, G. Davey Smith, A. P. Reiner, P. J. Talmud, M. Kivimäki, D. A. Lawlor, F. Dudbridge, N. J. Samani, B. J.

- Keating, A. D. Hingorani, J. P. Casas. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. *European heart journal*. 2015;36(9):539-550.
73. Hong, S. H., J. H. Kwak, J. K. Paik, J. S. Chae, J. H. Lee. Association of polymorphisms in FADS gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men. *Clinical interventions in aging*. 2013;8:585-96. PMID: 3693593.
74. Illig, T., C. Gieger, G. Zhai, W. Romisch-Margl, R. Wang-Sattler, C. Prehn, E. Altmaier, G. Kastenmuller, B. S. Kato, H. W. Mewes, T. Meitinger, M. H. De Angelis, F. Kronenberg, N. Soranzo, H. E. Wichmann, T. D. Spector, J. Adamski, K. Suhre. A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. *Nature genetics*. 2010;42(2):137-41. PMID: 3773904.
75. Ingram, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956;178(4537):792-4.
76. Innis, S. M. Essential fatty acids in growth and development. *Progress in lipid research*. 1991;30(1):39-103.
77. Inoue, M., J. S. Group. Impact of lifestyle on overall cancer risk among Japanese: the Japan Public Health Center-based Prospective Study (JPHC Study). *Journal of epidemiology*. 2010;20(2):90-6. PMID: 3900806.
78. Jacobson, T. A., S. B. Glickstein, J. D. Rowe, P. N. Soni. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: A review. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012;6(1):5-18.
79. Kaput, J. Nutrigenomics research for personalized nutrition and medicine. *Current opinion in biotechnology*. 2008;19(2):110-20.
80. Kaufman, D. J., J. M. Bollinger, R. L. Dvoskin, J. A. Scott. Risky business: risk perception and the use of medical services among customers of DTC personal genetic testing. *Journal of genetic counseling*. 2012;21(3):413-22.
81. Khanapure, S. P., D. S. Garvey, D. R. Janero, L. G. Letts. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Current topics in medicinal chemistry*. 2007;7(3):311-40.
82. Kleemann, R., L. Verschuren, M. J. Van Erk, Y. Nikolsky, N. H. Cnubben, E. R. Verheij, A. K. Smilde, H. F. Hendriks, S. Zadelaar, G. J. Smith, V. Kaznacheev, T. Nikolskaya, A. Melnikov, E. Hurt-Camejo, J. Van Der Greef, B. Van Ommen, T. Kooistra. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome biology*. 2007;8(9):R200. PMID: 2375038.
83. Klop, B., J. Elte, M. Cabezas. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218-1240.
84. Kohlmeier, M. *Nutrigenetics : applying the science of personal nutrition*. 1st ed. Oxford ; Waltham, MA: Academic Press; 2013.
85. Koletzko, B., H. Demmelmair, L. Schaeffer, T. Illig, J. Heinrich. Genetically determined variation in polyunsaturated fatty acid metabolism may result in different dietary requirements. *Nestle Nutrition workshop series Paediatric programme*. 2008;62:35-44; discussion 44-9.
86. Koletzko, B., M. Mroczek, H. J. Bremer. Fatty acid composition of mature human milk in Germany. *The American journal of clinical nutrition*. 1988;47(6):954-9.
87. Kroger, J., M. B. Schulze. Recent insights into the relation of Delta5 desaturase and Delta6 desaturase activity to the development of type 2 diabetes. *Current opinion in lipidology*. 2012;23(1):4-10.
88. Kuang, H., F. Yang, Y. Zhang, T. Wang, G. Chen. The Impact of Egg Nutrient Composition and Its Consumption on Cholesterol Homeostasis. *Cholesterol*. 2018;2018:1-22.

89. Lairon, D., C. Defoort, J. C. Martin, M. J. Amiot-Carlin, M. Gastaldi, R. Planells. Nutrigenetics: links between genetic background and response to Mediterranean-type diets. *Public health nutrition*. 2009;12(9A):1601-6.
90. Lavie, C. J., R. V. Milani. Obesity and cardiovascular disease: the hippocrates paradox? **Editorials published in the Journal of the American College of Cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(4):677-679.
91. Leaf, A. Cardiovascular effects of fish oils. Beyond the platelet. *Circulation*. 1990;82(2):624-8.
92. Leaf, A., P. C. Weber. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *The New England journal of medicine*. 1988;318(9):549-57.
93. Lecerf, J. M. Fatty acids and cardiovascular disease. *Nutrition reviews*. 2009;67(5):273-83.
94. Leighton, J. W., K. Valverde, B. A. Bernhardt. The general public's understanding and perception of direct-to-consumer genetic test results. *Public health genomics*. 2012;15(1):11-21.
95. Li, S. W., J. Wang, Y. Yang, Z. J. Liu, L. Cheng, H. Y. Liu, P. Ma, W. Luo, S. M. Liu. Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter plasma fatty acids and desaturase levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Journal of translational medicine*. 2016;14:79. PMID: 4802592.
96. Lingwood, D., K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46-50.
97. Liou, Y. A., D. J. King, D. Zibrik, S. M. Innis. Decreasing Linoleic Acid with Constant α -Linolenic Acid in Dietary Fats Increases (n-3) Eicosapentaenoic Acid in Plasma Phospholipids in Healthy Men. *The Journal of nutrition*. 2007;137(4):945-952.
98. Liu, F., Z. Li, X. Lv, J. Ma. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid intakes modify the effect of genetic variation in fatty acid desaturase 1 on coronary artery disease. *PloS one*. 2015;10(4):e0121255. PMID: 4388373.
99. Liu, S. J., H. Zhi, P. Z. Chen, W. Chen, F. Lu, G. S. Ma, J. C. Dai, C. Shen, N. F. Liu, Z. B. Hu, H. Wang, H. B. Shen. Fatty acid desaturase 1 polymorphisms are associated with coronary heart disease in a Chinese population. *Chinese medical journal*. 2012;125(5):801-6.
100. Lu, Y., E. J. M. Feskens, M. E. T. Dollé, S. Imholz, W. M. M. Verschuren, M. Müller, J. M. A. Boer. Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(1):258-265.
101. Ma, D. W. Lipid mediators in membrane rafts are important determinants of human health and disease. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(3):341-50.
102. Mach, F., C. Baigent, A. L. Catapano, K. C. Koskinas, M. Casula, L. Badimon, M. J. Chapman, G. G. De Backer, V. Delgado, B. A. Ference, I. M. Graham, A. Halliday, U. Landmesser, B. Mihaylova, T. R. Pedersen, G. Riccardi, D. J. Richter, M. S. Sabatine, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglou, O. Wiklund, C. Mueller, H. Drexel, V. Aboyans, A. Corsini, W. Doehner, M. Farnier, B. Gigante, M. Kayikcioglu, G. Krstacic, E. Lambrinou, B. S. Lewis, J. Masip, P. Moulin, S. Petersen, A. S. Petronio, M. F. Piepoli, X. Pintó, L. Räber, K. K. Ray, Ž. Reiner, W. F. Riesen, M. Roffi, J.-P. Schmid, E. Shlyakhto, I. A. Simpson, E. Stroes, I. Sudano, A. D. Tselepis, M. Viigimaa, C. Vindis, A. Vonbank, M. Vrablik, M. Vrsalovic, J. L. Zamorano, J.-P. Collet, K. C. Koskinas, M. Casula, L. Badimon, M. John Chapman, G. G. De Backer, V. Delgado, B. A. Ference, I. M. Graham, A. Halliday, U. Landmesser, B. Mihaylova, T. R. Pedersen, G. Riccardi, D. J. Richter, M. S. Sabatine, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglou, O.

- Wiklund, S. Windecker, V. Aboyans, C. Baigent, J.-P. Collet, V. Dean, V. Delgado, D. Fitzsimons, C. P. Gale, D. Grobbee, S. Halvorsen, G. Hindricks, B. Iung, P. Jüni, H. A. Katus, U. Landmesser, C. Leclercq, M. Lettino, B. S. Lewis, B. Merkely, C. Mueller, S. Petersen, A. S. Petronio, D. J. Richter, M. Roffi, E. Shlyakhto, I. A. Simpson, M. Sousa-Uva, R. M. Touyz, D. Nibouche, P. H. Zelveian, P. Siostrzonek, R. Najafov, P. Van De Borne, B. Pojskic, A. Postadzhiyan, L. Kypris, J. Špinar, M. L. Larsen, H. S. Eldin, M. Viigimaa, T. E. Strandberg, J. Ferrières, R. Agladze, U. Laufs, L. Rallidis, L. Bajnok, T. Gudjónsson, V. Maher, Y. Henkin, M. M. Gulizia, A. Mussagaliyeva, G. Bajraktari, A. Kerimkulova, G. Latkovskis, O. Hamoui, R. Slapikas, L. Visser, P. Dingli, V. Ivanov, A. Boskovic, M. Nazzi, F. Visseren, I. Mitevska, K. Retterstøl, P. Jankowski, R. Fontes-Carvalho, D. Gaita, M. Ezhov, M. Foscoli, V. Giga, D. Pella, Z. Fras, L. P. De Isla, E. Hagström, R. Lehmann, L. Abid, O. Ozdogan, O. Mitchenko, R. S. Patel. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European heart journal*. 2020;41(1):111-188.
103. Makrides, M., M. A. Neumann, R. W. Byard, K. Simmer, R. A. Gibson. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *The American journal of clinical nutrition*. 1994;60(2):189-94.
104. Malerba, G., L. Schaeffer, L. Xumerle, N. Klopp, E. Trabetti, M. Biscuola, U. Cavallari, R. Galavotti, N. Martinelli, P. Guarini, D. Girelli, O. Olivieri, R. Corrocher, J. Heinrich, P. F. Pignatti, T. Illig. SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids*. 2008;43(4):289-99.
105. Mann, J., A. S. Truswell. *Essentials of human nutrition*. 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2012.
106. Marquardt, A., H. Stohr, K. White, B. H. Weber. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*. 2000;66(2):175-83.
107. Martinelli, N., D. Girelli, G. Malerba, P. Guarini, T. Illig, E. Trabetti, M. Sandri, S. Friso, F. Pizzolo, L. Schaeffer, J. Heinrich, P. F. Pignatti, R. Corrocher, O. Olivieri. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(4):941-9.
108. McBride, C. M., L. M. Koehly, S. C. Sanderson, K. A. Kaphingst. The behavioral response to personalized genetic information: will genetic risk profiles motivate individuals and families to choose more healthful behaviors? *Annual review of public health*. 2010;31:89-103.
109. Mccann, J. C., B. N. Ames. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(2):281-95.
110. Mccarthy, M. I., R. N. Lemaitre, T. Tanaka, W. Tang, A. Manichaikul, M. Foy, E. K. Kabagambe, J. A. Nettleton, I. B. King, L.-C. Weng, S. Bhattacharya, S. Bandinelli, J. C. Bis, S. S. Rich, D. R. Jacobs, A. Cherubini, B. Mcknight, S. Liang, X. Gu, K. Rice, C. C. Laurie, T. Lumley, B. L. Browning, B. M. Psaty, Y.-D. I. Chen, Y. Friedlander, L. Djousse, J. H. Y. Wu, D. S. Siscovick, A. G. Uitterlinden, D. K. Arnett, L. Ferrucci, M. Fornage, M. Y. Tsai, D. Mozaffarian, L. M. Steffen. Genetic Loci Associated with Plasma Phospholipid n-3 Fatty Acids: A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies from the CHARGE Consortium. *PLoS genetics*. 2011;7(7):e1002193.

111. Merino, D. M., H. Johnston, S. Clarke, K. Roke, D. Nielsen, A. Badawi, A. El-Sohemy, D. W. Ma, D. M. Mutch. Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter desaturase activity in young Caucasian and Asian adults. *Molecular genetics and metabolism*. 2011;103(2):171-8.
112. Merino, D. M., D. W. Ma, D. M. Mutch. Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease. *Lipids Health Dis*. 2010;9:63. PMID: PMC2914715.
113. Messner, B., D. Bernhard. Smoking and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(3):509-515.
114. Nakamura, M. T., T. Y. Nara. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:345-76.
115. Nielsen, D. E., A. El-Sohemy. Applying Genomics to Nutrition and Lifestyle Modification. *Personalized Medicine*. 2012;9(7):739-749.
116. Nielsen, D. E., A. El-Sohemy. Disclosure of genetic information and change in dietary intake: a randomized controlled trial. *PloS one*. 2014;9(11):e112665. PMID: 4232422.
117. Nielsen, D. E., A. El-Sohemy. A randomized trial of genetic information for personalized nutrition. *Genes & nutrition*. 2012;7(4):559-66. PMID: 3448037.
118. Norris, J. M., M. Kroehl, T. E. Fingerlin, B. N. Frederiksen, J. Seifert, R. Wong, M. Clare-Salzler, M. Rewers. Erythrocyte membrane docosapentaenoic acid levels are associated with islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Diabetologia*. 2013;57(2):295-304.
119. Oikawa, S., M. Yokoyama, H. Origasa, M. Matsuzaki, Y. Matsuzawa, Y. Saito, Y. Ishikawa, J. Sasaki, H. Hishida, H. Itakura, T. Kita, A. Kitabatake, N. Nakaya, T. Sakata, K. Shimada, K. Shirato, J. Jelis Investigators. Suppressing effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*. 2009;206(2):535-9.
120. Ooi, E., G. Watts, T. Ng, P. Barrett. Effect of Dietary Fatty Acids on Human Lipoprotein Metabolism: A Comprehensive Update. *Nutrients*. 2015;7(6):4416-4425.
121. Parrott, M., J. M. McDonald, N. K. Maclaren, D. E. Goldstein, D. E. Bruns, D. B. Sacks. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*. 2002;48(3):436-472.
122. Pe, W., F. S., V. S. C., L. R., S. T. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods* Orlando: Academic Press. (1986):49-60.
123. Peskar, B. M., N. Sawka, K. Ehrlich, B. A. Peskar. Role of cyclooxygenase-1 and -2, phospholipase C, and protein kinase C in prostaglandin-mediated gastroprotection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003;305(3):1233-8.
124. Petrova, S., P. Dimitrov, W. C. Willett, H. Campos. The global availability of n-3 fatty acids. *Public health nutrition*. 2011;14(7):1157-64. PMID: 4505546.
125. Ra, L., L. Th, A. Kf. Effects of omega-3 fatty acids on the generation of products of the 5-lipoxygenase pathway. In: Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE, eds. *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods.*: Orlando: Academic Press.
126. Riediger, N. D., R. A. Othman, M. Suh, M. H. Moghadasian. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 2009;109(4):668-679.
127. Roberts, J. S., L. A. Cupples, N. R. Relkin, P. J. Whitehouse, R. C. Green, R. S. Group. Genetic risk assessment for adult children of people with Alzheimer's disease: the Risk

Evaluation and Education for Alzheimer's Disease (REVEAL) study. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*. 2005;18(4):250-5.

128. Roberts, J. S., S. M. Tersego. Estimating and disclosing the risk of developing Alzheimer's disease: challenges, controversies and future directions. *Future neurology*. 2010;5(4):501-517. PMID: 2941213.

129. Rocha, J. C., F. J. Van Spronsen, M. F. Almeida, E. Ramos, J. T. Guimaraes, N. Borges. Early dietary treated patients with phenylketonuria can achieve normal growth and body composition. *Molecular genetics and metabolism*. 2013;110 Suppl:S40-3.

130. Roke, K., D. M. Mutch. The role of FADS1/2 polymorphisms on cardiometabolic markers and fatty acid profiles in young adults consuming fish oil supplements. *Nutrients*. 2014;6(6):2290-304. PMID: 4073151.

131. Russo, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology*. 2009;77(6):937-946.

132. Rzehak, P., J. Heinrich, N. Klopp, L. Schaeffer, S. Hoff, G. Wolfram, T. Illig, J. Linseisen. Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (FADS1 FADS2) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *The British journal of nutrition*. 2009;101(1):20-6.

133. Sanders, T., P. Emery. *Molecular basis of human nutrition*. London ; New York: Taylor & Francis; 2003.

134. Schaeffer, L., H. Gohlke, M. Muller, I. M. Heid, L. J. Palmer, I. Kompauer, H. Demmelair, T. Illig, B. Koletzko, J. Heinrich. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Human molecular genetics*. 2006;15(11):1745-56.

135. Schroder, H. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007;18(3):149-60.

136. Serhan, C. N., N. Chiang, T. E. Van Dyke. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(5):349-61. PMID: 2744593.

137. Shen, F., J. Qi, F. Xu, L. Ning, R. Pang, X. Zhou, S. Liu. Age-related distributions of nine fasting plasma free fatty acids in a population of Chinese adults. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;415:81-7.

138. Shields, D. C., P. N. Kirke, J. L. Mills, D. Ramsbottom, A. M. Molloy, H. Burke, D. G. Weir, J. M. Scott, A. S. Whitehead. The "Thermolabile" Variant of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Neural Tube Defects: An Evaluation of Genetic Risk and the Relative Importance of the Genotypes of the Embryo and the Mother. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(4):1045-1055.

139. Silverman, M. G., B. A. Ference, K. Im, S. D. Wiviott, R. P. Giugliano, S. M. Grundy, E. Braunwald, M. S. Sabatine. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions. *Jama*. 2016;316(12):1289.

140. Simopoulos, A. P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental biology and medicine*. 2010;235(7):785-95.

141. Simopoulos, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*. 2008;233(6):674-88.

142. Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2002;56(8):365-79.
143. Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;54(3):438-63.
144. Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids, the brain and retina. Preface. *World review of nutrition and dietetics*. 2009;99:VII-XII.
145. Simopoulos, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World review of nutrition and dietetics*. 2009;99:1-16.
146. Simopoulos, A. P., H. A. Norman, J. E. Gillaspay, J. A. Duke. Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 1992;11(4):374-82.
147. Simopoulos, A. P., J. M. Ordovas. *Nutrigenetics and nutrigenomics*. Basel ; New York: S. Karger; 2004.
148. Stewart-Knox, B. J., B. P. Bunting, S. Gilpin, H. J. Parr, S. Pinhao, J. J. Strain, M. D. De Almeida, M. Gibney. Attitudes toward genetic testing and personalised nutrition in a representative sample of European consumers. *The British journal of nutrition*. 2009;101(7):982-9.
149. Szoor, A., J. Szollosi, G. Vereb. Rafts and the battleships of defense: the multifaceted microdomains for positive and negative signals in immune cells. *Immunol Lett*. 2010;130(1-2):2-12.
150. Tabas, I., K. J. Williams, J. BoréN. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis. *Circulation*. 2007;116(16):1832-1844.
151. Tanaka, T., J. Shen, G. R. Abecasis, A. Kisialiou, J. M. Ordovas, J. M. Guralnik, A. Singleton, S. Bandinelli, A. Cherubini, D. Arnett, M. Y. Tsai, L. Ferrucci. Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study. *PLoS genetics*. 2009;5(1):e1000338. PMID: 2613033.
152. Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, C. T. Johansen, S. W. Fouchier, A. Isaacs, G. M. Peloso, M. Barbalic, S. L. Ricketts, J. C. Bis, Y. S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M. F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J. Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Twee-Hee Ong, D. C. Croteau-Chonka, L. A. Lange, J. D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R. Y. Zee, A. F. Wright, J. C. Witteman, J. F. Wilson, G. Willemsen, H. E. Wichmann, J. B. Whitfield, D. M. Waterworth, N. J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B. F. Voight, V. Vitart, A. G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J. R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H. M. Stringham, T. D. Spector, N. Soranzo, J. H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E. J. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L. M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B. M. Psaty, P. P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B. W. Penninx, N. L. Pedersen, C. Pattaro, A. N. Parker, G. Pare, B. A. Oostra, C. J. O'donnell, M. S. Nieminen, D. A. Nickerson, G. W. Montgomery, T. Meitinger, R. Mcpherson, M. I. Mccarthy, W. Mcardle, D. Masson, N. G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P. K. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R. J. Loos, M. L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L. J. Launer, E. G. Lakatta, R. Laaksonen, K. O. Kyvik, F. Kronenberg, I. R. Konig, K. T. Khaw, J. Kaprio, L. M. Kaplan, A. Johansson, M. R. Jarvelin, A. C. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J. J. Hottenga, A. Hofman, A. A. Hicks, C. Hengstenberg, I. M. Heid, C. Hayward, A. S. Havulinna, N. D. Hastie, T. B. Harris, T. Haritunians, A. S. Hall, U. Gyllensten, C. Guiducci, L. C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N. B. Freimer, L. Ferrucci, J.

- Erdmann, P. Elliott, K. G. Ejebe, A. Doring, A. F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E. J. De Geus, U. De Faire, G. Crawford, F. S. Collins, Y. D. Chen, M. J. Caulfield, H. Campbell, N. P. Burtt, L. L. Bonnycastle, D. I. Boomsma, S. M. Boekholdt, R. N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C. M. Ballantyne, T. L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T. Y. Wong, E. S. Tai, A. B. Feranil, C. W. Kuzawa, L. S. Adair, H. A. Taylor, Jr., I. B. Borecki, S. B. Gabriel, J. G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R. M. Krauss, K. L. Mohlke, J. M. Ordovas, P. B. Munroe, J. S. Kooner, A. R. Tall, R. A. Hegele, J. J. Kastelein, E. E. Schadt, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, D. P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M. P. Reilly, N. J. Samani, H. Schunkert, L. A. Cupples, M. S. Sandhu, P. M. Ridker, D. J. Rader, C. M. Van Duijn, L. Peltonen, G. R. Abecasis, M. Boehnke, S. Kathiresan. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466(7307):707-13. PMID: PMC3039276.
153. Tosi, F., F. Sartori, P. Guarini, O. Olivieri, N. Martinelli. Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;824:61-81.
154. Van Der Put, N. M., R. P. Steegers-Theunissen, P. Frosst, F. J. Trijbels, T. K. Eskes, L. P. Van Den Heuvel, E. C. Mariman, M. Den Heyer, R. Rozen, H. J. Blom. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995;346(8982):1070-1.
155. Vernarelli, J. A. Impact of genetic risk assessment on nutrition-related lifestyle behaviours. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2013;72(1):153-9. PMID: 3756543.
156. Vernarelli, J. A., J. S. Roberts, S. Hiraki, C. A. Chen, L. A. Cupples, R. C. Green. Effect of Alzheimer disease genetic risk disclosure on dietary supplement use. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;91(5):1402-7. PMID: 2854909.
157. Von Schacky, C. Prophylaxis of atherosclerosis with marine omega-3 fatty acids. A comprehensive strategy. *Annals of internal medicine*. 1987;107(6):890-9.
158. Wang, L., A. R. Folsom, Z. J. Zheng, J. S. Pankow, J. H. Eckfeldt, A. S. Investigators. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(1):91-8.
159. Warensjo, E., M. Rosell, M. L. Hellenius, B. Vessby, U. De Faire, U. Risérus. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis*. 2009;8:37. PMID: 2746208.
160. Wei, M. Y., T. A. Jacobson. Effects of Eicosapentaenoic Acid Versus Docosahexaenoic Acid on Serum Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2011;13(6):474-483.
161. Wesselius, A., M. P. Zeegers. Direct-to-consumer genetic testing. *OA Epidemiology*. 2013;1(1):4.
162. Wijendran, V., K. C. Hayes. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:597-615.
163. Wolf, A. B., R. J. Caselli, E. M. Reiman, J. Valla. APOE and neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2013;34(4):1007-17. PMID: 3545040.
164. Wolf, C. R., J. E. Moss, J. S. Miles, A. C. Gough, N. K. Spurr. Detection of debrisoquine hydroxylation phenotypes. *Lancet*. 1990;336(8728):1452-3.
165. Xie, L., S. M. Innis. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in

women during pregnancy and in breast milk during lactation. *The Journal of nutrition*. 2008;138(11):2222-8.

166. Yanai, H., H. Katsuyama, H. Hamasaki, S. Abe, N. Tada, A. Sako. Effects of Dietary Fat Intake on HDL Metabolism. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2015;7(3):145-149.

167. Zak, A., M. Burda, M. Vecka, M. Zeman, E. Tvrzicka, B. Stankova. Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2014;63 Suppl 3:S375-85.

168. Zamaria, N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reproduction, nutrition, development*. 2004;44(3):273-82.

169. Zeisel, S. H. Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies o dietary requirements for choline. . *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;83(3):542-548.

170. Zhang, P., X. Zhang, J. Brown, D. Vistisen, R. Sicree, J. Shaw, G. Nichols. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;87(3):293-301.

171. Ангелова, К. Нутригеномика. Българско списание за обществено здраве. 2010;2(1):9-19.

172. Еникова, Р., М. Стойновска, В. Бирданова, Ц. Димитров. Хигиена на храненето. първо издание ed. Плевен: Издателски център МУ - Плевен; 2014.

173. Наредба № 31 от 12 август 2007 г. за определяне на правилата за добра клинична практика. Държавен вестник; 2012.

174. Национална програма за превенция на хроничните незаразни болести, 2014-2020. София, България: Министерство на Здравеопазването; 2013.

175. Стоименмова, А., М. Манова, Г. Драганов, Г. Петрова. Законодателно регламентиране на клиничните изпитвания в България. Стара Загора: Съюз на учените; 2009.

176. Feingold, K. R. Obesity and Dyslipidemia. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.

177. Internal Clinical Guidelines Team. Coeliac Disease. *Coeliac Disease: Recognition, Assessment and Management*. London: National Institute for Health and Care Excellence; 2015.

178. Декларация от Хелзинки на Световната Медицинска Асоциация - Етични правила за медицински изследвания върху хора, (2000).

10. ПРИЛОЖЕНИЯ

10.1 Приложение №1 Декларация за информирано съгласие и доброволно участие, одобрено от етичната комисия на Националния център по обществено здраве и анализи и Медицински университет - Плевен.

10.2 Приложение № 2 Анкетни карти

10.3 Приложение № 3 SCORE таблици за Европейските държави с нисък и висок риск

10.4 Приложение № 4 Информационна брошура „Нутригенетични тестове за научна и комерсиална употреба“, предназначен за лични лекари, диетолози и нутриционисти, и всички, които се интересуват от науката за храните и храненето. Информационният материал може да бъде намерен на следния линк: <https://ncpha.government.bg/bg/publications-for-profesionals/nutrigenetichni-testove-za-nauchna-i-komersialna-upotreba>.