



**MEDICAL UNIVERSITY
„PROF. DR PARASKEV STOYANOV“ – VARNA**

DEPARTMENT OF ONCOLOGY

ROSTISLAV RADOSLAVOV MANEV

**SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE GENES
FOR NON-CODING RNA AS DIAGNOSTIC AND
PROGNOSTIC MARKERS IN PATIENTS WITH
METASTATIC COLORECTAL CANCER**

DISSERTATION SUMMARY

**FOR THE ACQUISITION OF THE EDUCATIONAL AND
SCIENTIFIC DEGREE**

“DOCTOR (PhD)”

SCIENTIFIC SUPERVISORS:

ASSOC. PROF. NIKOLAY CONEV, M.D. PhD.

ASSOC. PROF. MARIYA RADANOVA, M.D. PhD.

VARNA, 2022

The dissertation consists of pages and is illustrated with 40 tables and 35 figures. The bibliographic references include 257 sources, of which 3 are in Cyrillic and 254 are in Latin.

The dissertation was discussed and approved for defence in a department meeting of Department of Oncology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna and with an order of the Rector of MU-Varna the following scientific jury was appointed:

External members:

Prof. Zhasmina Mihaylova Milanova, MD, PhD

Prof. Zhelyazko Iliev Arabadzhiev, MD, PhD

Prof. Petranka Troyanova, MD, PhD

Internal members:

Prof. Krasimir Dimitrov Ivanov, MD, PhD, DSc

Assoc. prof. Eleonora Georgieva Dimitrova, MD, PhD

Backup external member:

Prof. Hristo Blagoev Tsekov, MD, PhD, DSc

Backup External member:

Prof. Rosen Evgeniev Madzhov, MD, PhD, DSc

The public thesis defence will be held on 26.05.2022 at in a virtual meeting in the online Blackboard platform of Medical university of Varna.

Thesis materials are available in the Library of Medical University – Varna and online on the University’s website (mu-varna.bg).

Contents:

- 1. Abbreviations / 5**
- 2. Introduction / 7**
- 3. Aim and objectives of the dissertation / 9**
 - 3.1. Aim of the study / 9
 - 3.2. Objectives / 9
- 4. Materials and methods / 11**
 - 4.1. Center of research / 11
 - 4.2. Patient population / 11
 - 4.3. Routine clinical trials and biological markers / 14
 - 4.4. Imaging assessment of the therapeutic response / 14
 - 4.5. Medical history of the patients / 15
 - 4.6. Specific test methods / 16
 - 4.6.1. DNA extraction / 16
 - 4.6.2. SNP genotyping / 17
 - 4.6.3. Isolation of RNA from plasma for the study of micro-RNAs / 18
 - 4.6.4. Study of the expression levels of circulating miRNAs / 21
 - 4.6.4.1. cDNA synthesis / 21
 - 4.6.4.2. qPCR reaction (quantitative PCR) / 22
 - 4.6.5. Statistical design and analysis / 24
- 5. Results / 28**
 - 5.1. Clinical and pathological characteristics of the patients / 28

- 5.2. *Allelic distribution and genotypic frequency of selected SNPs in the selected cohort of patients with metastatic CRC / 40*
- 5.3. *Comparison of the allelic and genotypic frequencies of the selected five SNPs in the Bulgarian group of healthy individuals with the available data for other cohorts / 43*
- 5.4. *Association between the carrier of a certain genotype / allele of the five SNPs studied in the micro-RNA genes and the ability to predict the risk of developing CRC / 51*
- 5.5. *Association between the carrier of a specific genotype / allele of the five SNPs studied in the microRNA genes and the overall survival in patient / 58*
- 5.6. *Comparison of plasma levels of micro-RNAs whose genes contain the studied SNPs - in patients with metastatic CRC and in the healthy control group / 62*
- 5.7. *Association between plasma expression levels of micro-RNAs whose genes include the SNPs studied and overall survival in patients / 67*
- 6. Discussion / 68**
- 7. Summary / 77**
- 8. Conclusion / 79**
- 9. Contributions / 81**
- 10. Publications related to the dissertation /82**

1. Abbreviations

5-FU - 5-fluorouracil

AJCC - American Joint Committee on Cancer

CRC – colorectal cancer

ChT – chemotherapy

cDNA – circulating Deoxyribonucleic Acid

DFS – Disease free survival

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR – Epidermal growth factor receptor

EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

miRNA – micro Ribonucleic acid

MLH1 - MutL homolog 1

MLKL – mixed lineage kinase domain-like protein

MMR – miss match repair

MSI – microsatellite instability

MSI-H – high Microsatellite Instable

MSI-L – low Microsatellite Instable

NRAS - Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

OS – overall survival

PCR – polymerase chain reaction

PET/CT - Positron emission tomography–computed tomography

PFS – progression free survival, преживаемост без прогресия

PS – Performance status

SNP – single nucleotide polymorphism

qPCR – quantitative polymerase chain reaction

2. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy, leading to death in cancer patients worldwide. In recent decades, the number of registered cases of CRC has increased dramatically, but the development of diagnostic methods, surgical treatment and the application of individual algorithms for anticancer treatment have significantly improved the quality of life and overall survival in patients with CRC. However, the 5-year survival in patients with stage IV CRC is below 14%.

The main demographic factor that affects the frequency of CRC more than any other is age. This is the reason why the number of cases of this cancer has increased dramatically in people over the age of 50, with the share of women being less affected than that of men. The lack of screening in individuals in this age group increases the likelihood of developing invasive CRC between 0.5% and 2.0% on an annual basis.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are common genetic variations that can affect a variety of functional processes affecting individual susceptibility to certain cancers. This is the reason why SNPs are considered as a biomarker for predicting the risk of solid tumors with different primary sites, including CRC. Over the past three decades, numerous SNPs have been studied through extensive genome-associated studies as directly related to the risk of developing CRC.

Microribonucleic acids (miRNAs) are RNA molecules with a length of about 22 nucleotides that play an important role in various biological processes, such as embryonic development, cell differentiation, proliferation, apoptosis, insulin secretion and oncogenesis and others. Microribonucleic acids do not encode proteins, but have an important function in regulating gene expression.

An increasing number of studies show that siRNAs play an important role in cancer development by regulating the expression of proto-oncogenes or tumor suppressor genes. Recent studies have shown different levels of siRNA expression in biological products such as tissues and serum in patients and healthy individuals.

Single nucleotide polymorphisms in miRNA genes - miR-SNPs are able to modulate miRNA expression and thus affect the risk of cancer, treatment efficacy and prognosis for the patient. Currently, studies on the potential diagnostic, predictive and prognostic role of miR-SNPs are few in the literature and mainly in Asian colorectal cohorts. Studies on the presence of miR-SNPs and their role as diagnostic, prognostic and predictive factors have not been conducted for the Bulgarian population. Therefore, research on the presence of functional genetic variants in the genes of non-coding RNAs will contribute to increasing knowledge in the field.

3. Aim and objectives of the dissertation

3.1. Aim of the study

The aim of the study is to identify new diagnostic and prognostic molecular biological biomarkers in Bulgarian patients diagnosed with CRC in metastatic stage by testing for the presence of five selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding microRNAs and rs7372209 in the microRNA gene -26a-1, rs2910164 in the microRNA gene-146a, rs2682818 in the microRNA gene-618, rs353293 in the promoter region of the gene cluster for microRNA-143 and microRNA145 and rs322931 in the microRNA gene -181b.

3.2. Задачи:

1. Да се конструира и характеризира детайлно българска кохорта за изследване за наличие на пет избрани SNPs.
 - да се селектират пациенти с КРК в метастатичен стадий, провели първа линия лечение, да се стратифицират по демографски и клиникопатологични показатели, да се проследят за отговор от проведената терапия;
 - да се подбере и характеризира контролна група здрави индивиди, сходни по демографски показатели с пациентите.
2. Да се изследва алелното разпределение и генотипната честотата на петте избрани SNPs в селектираната кохорта пациенти с метастатичен колоректален карцином.
3. Да се сравнят алелните и генотипните честоти на избраните пет SNPs в българската група здрави индивиди с наличните данни за други кохорти.
4. Да се потърси асоциация между носителството на определен генотип/алел на изследваните пет SNPs в гените за микро-

РНК-и и възможността да предскажат риск от развитие на КРК.

5. Да се потърси асоциация между носителството на определен генотип/алел на петте изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и и общата преживяемост при пациентите.
6. Да се сравнят нивата в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNPs, при пациентите с мКРК и при здравата контролна група.
7. Да се потърси асоциация между нивата на експресия в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNPs, и общата преживяемост при пациентите.

4. Изследвани групи и методи

4.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по Медицинска Онкология – Университетска болница “Света Марина” – Варна
- Клиника по Медицинска Онкология – Военномедицинска академия (ВМА) – София
- Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика - Медицински Университет „проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

4.2. Подбрани пациенти и контролна група здрави доброволци

В изследването бяха включени български пациенти, диагностицирани с мКРК (n=101) на базата на анамнеза, клиничен преглед и клиничко-лабораторни изследвания и в съгласие с критериите на American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 8th ed. Пациентите са подписали информирано съгласие за набиране на техен биологичен материал и събиране на личните им данни с цел създаване на биобанка за последващи научни изследвания при спазване на всички етични изисквания и ограничения съгласно Декларацията от Хелзинки. Използването на тези проби за настоящото изследване беше одобрено от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) при МУ-Варна (протокол №74/03.05.2018 г., Приложение 1).

Всички включени в изследването пациенти бяха на възраст над 18 години. За всеки пациент беше налична информация за основни клиничко-лабораторни параметри, за терапия и комплексна клинична оценка, за прогресията на заболяването.

Всички изследвани пациенти бяха в IV метастатичен стадий на заболяването, неоперабилни, провеждали първа линия само флуоропиримидин базирана химиотерапия или в комбинация с анти-VEGF или с анти-EGFR таргетна терапия.

Включващи критерии:

1. Възраст над 18 години
2. Първа линия химиотерапия да е проведена в Клиниката по медицинска онкология към МБАЛ „Света Марина“, Варна и Клиниката по медицинска онкология към ВМА – София
3. Пациенти с хистологично доказан КРК
4. Неподходящи за провеждане на радикално хирургично лечение
5. Пациенти в метастатичен стадий дефиниран според 8^{мо} издание на AJCC (American Joint Committee on Cancer)
6. Адекватни лабораторни показатели като ПКК, бъбречна и чернодробна функция
7. ECOG PS – пърформанс статус < или = 2 (Таблица 1)

Таблица 1. Оценка на общо състояние според скалата на Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

Оценка	ECOG (PS) – пърформанс статус
0	Пациентът е напълно активен, може да извършва всички дейности от времето преди болестта си без ограничения

1	Съществуват ограничения във физическа активност, но пациентът има възможност за извършване на лека или седяща работа (примерно лека домашна дейност или работа в офис)
2	Пациентът е амбулаторен и може да се грижи изцяло за себе си, но невъзможност за никаква трудова дейност; прекарва > 50% от времето, в което е буден, в изправено състояние
3	Пациентът е способен само на ограничени грижи за себе си; прекарва > 50% от времето, през което е буден, в леглото
4	Пациентът е напълно неспособен да се грижи за себе си; напълно прикован към леглото или стола
5	Смърт

Исключващи критерии:

1. ECOG PS - пърформанс статус над 2
2. Провеждано системно лечение за метастатична болест в друго лечебно заведение различно от първоначално дефинираните за нашето изследване,
3. Тежки и неконтролирани придружаващи заболявания.

90 здрави доброволци, с възраст и пол, съответстващи на пациентите, без роднини по права линия с анамнеза за рак на дебелото черво и клинични данни за друго заболяване бяха включени като контролна група в проучването. Всички подписаха формуляр за информирано съгласие за генетичен

анализ и обработване на лични данни. Подборът на здравите доброволци стартира след първоначална положителна етична оценка от КЕНИ, МУ-Варна (протокол №74/03.05.2018г., Приложение 1). От всички отговарящи на условията здрави доброволци бяха вземани по 10 мл венозна кръв при спазване условията за безопасност, подробно описани в заявлението до КЕНИ.

4.3. Рутинни клинични изследвания

Данните за изследване и проследяване са предварително дефинирани и събирани в динамика (с първа времева точка непосредствено преди започване на първи цикъл от първа линия ХТ). Провеждани са следните процедури:

1. Анамнеза и клиничен преглед
2. Кръвни проби за хематологичен и биохимичен рутинен анализ, както и изследване на карциноембрионален антиген
3. Образна диагностика - СТ, PET/СТ като изходни изследвания и рестадиране на всеки 3 месеца в хода на провежданото лечение
4. Венозна кръв за анализ на плазма/серум с оглед последващо изследване на предварително дефинираните критерий

4.4. Стадиране на колоректален карцином

Стадият на заболяването е определен по TNM (тумор, лимфни възли, метастази) класификацията, която е разработена съвместно от AJCC (American Joint Committee on Cancer) и UICC (International Union Against Cancer). Това е международна клиничко-анатомична система за стадиране на КРК, базираща се на три основни компонента:

T - описващ анатомично локалната експанзия на първичния тумор

N - описващ наличието/липсата на метастази в регионалните лимфни възли

M - описващ наличието/ липсата на далечни метастази

TNM класификацията помага да се установи анатомичната степен на заболяването, а комбинацията от трите фактора може да служи за определяне на клиничния стадий на тумора. Този метод позволява клиничното стадиране на злокачествените заболявания в стадии от I-IV. Основната цел на стадирането е да се стратифицират пациентите в съответствие с прогнозата, да се планират точно етапите на лечението и проследяването.

4.5. Медицинска история на пациентите

За всеки пациент в изпитването е създадено отделно медицинско досие, включващо следната информация:

Демографски данни

Имена (Инициали):

ID номер/дата на раждане:

Възраст:

Пол: мъж/жена

Медицинска история

Пърформанс статус/ECOG: Общото състояние на всеки пациент според ECOG е оценено изходно като 0, 1 или 2.

Придружаващи болести:

Информация за онкологичната болест

Клинична диагноза: локализация на първичния тумор, TNM стадиране, степен на диференциация

Локализация на първичния тумор:

Локализация на далечни метастази:

Молекулярно-патологичен анализ на RAS: липсваща/ налична мутация, както и вид RAS мутация

Вид първа линия лечение:

Изходни и контролни образни изследвания: КТ, ПЕТ/КТ, оценка по RECIST 1.1

Преживяемост без прогресия:

Обща преживяемост:

4.6. Специфични методи на изследване

4.6.1. ДНК екстракция

ДНК беше екстрахирана от 300 µl плазма от пациентите и здравите контроли с помощта на DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Германия), съгласно инструкциите на производителя. Всяка ДНК проба беше концентрирана с 3M натриев ацетат, 100% ледено студен етанол и 75% етанол по

протокол, оптимизиран в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, МУ – Варна. Концентрацията (в $\mu\text{g/ml}$) и чистотата на препаратите бяха оценявани спектрофотометрично при 260nm, 280nm и 230nm.

4.6.2. SNP генотипиране

TaqMan SNP анализ (TaqMan® Assays SNP Genotyping, ThermoFisher Scientific) беше извършен за определяне на наличие на полиморфизми в гените за подобраните микро-РНК-и. Опитите бяха проведени в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, МУ – Варна. Изследваните полиморфизми са представени в Таблица 2.

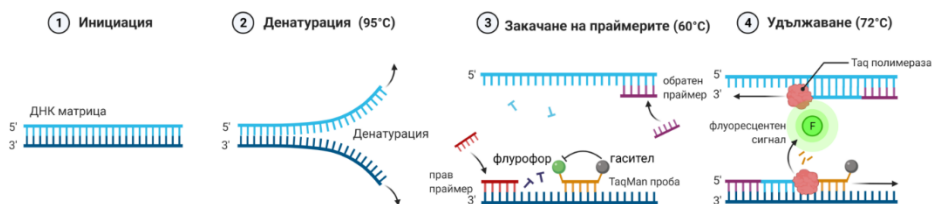
Таблица 2. Изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и

SNPs	Локализация	В гени за микро-РНК-и
rs7372209 (T>C)	chr3:37969217	микро-РНК-26a-1
rs2910164 (G>C)	chr5:160485411	микро-РНК-146a
rs2682818 (A>C)	chr12:80935757	микро-РНК-618
rs353293 (G>A)	chr5:149427663	микро-РНК-143/145
rs322931 (G>A)	chr1:199050726	микро-РНК-181b

Принципът на TaqMan анализа се основава на 5'→3' екзонуклеазната активност на ензима Taq ДНК полимеразата. Използват се т.нар. TaqMan проби. Това са олигонуклеотиди, комплементарни на участък между двата праймера. В 5' края им е конюгиран с флуорофор, а в 3' края им – т.нар. гасител

(quencher). Когато върху TaqMan пробата попадне лазерен лъч, високо енергийния флуорофор поема фотона, но ниско енергийния гасител подтиска светенето му.

Две такива проби, комплементарни на двата алела на определен SNP се смесват с двойка специфични праймери (прав и обратен) и изолираната геномната ДНК на изследвания индивид. В хода на амплификацията Таq ДНК полимеразата започва да добавя нуклеотиди към 3' края на праймерите, а когато наближи свързаната за ДНК ТаqMan проба я разгражда заради 5'→3' екзонуклеазната си активност. Това отдалечава флуорофора от гасителя и неговата специфична флуоресценция се улавя от апарата. Ако обаче ТаqMan пробата не е комплементарна на аплифицираната ДНК тя няма да се свърже с нея, няма да се разгради от Таq ДНК полимеразата и флуоресценция няма да се наблюдава, защото гасителят ще остане в непосредствена близост до флуорофора (*Фигура 1*).



Фигура 1. Принцип на ТаqМан анализа

Реакции за ТаqМан SNP анализа бяха в обем 10µl, като амплификационния протокол включваше 50°C, 2 min; 95 °C за 10 min | 40 цикъла при 95°C, 15 sec | 60°C, 1 min. Използван беше Real Time PCR System, Applied Biosystems, 7500.

4.6.3. Изолитране на РНК от плазма за изследване на микро-РНК-и

Използваният кит за изолиране на малки ncRNAs беше Macherey-Nagel, Düren, Germany. Анализът беше проведен в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутрегенномика, при МУ-Варна по протокол на производителя с добавени оптимизации. Посочената по-долу информация представя етапите в процеса на изолиране на РНК от плазма за изследване на микро-РНК-и:

1. Към 300 μ l плазма се добавят се 20 μ l протеиназа К;
2. Добавената стъпка на третране с протеиназа К цели подобряване на добива на miRNAs.
3. Пробата се инкубира на 37°C за 10 мин.;
4. Към 60 μ l Lysis solution BF се добавя 1 μ l 0.4 fMol spike-in control (U6) на проба и се вортексира;
5. Полученият от 4. разтвор се добавя към третирания с протеиназа К плазма и се вортексира за 5 сек.;
6. Пробата се инкубира на стайна температура 3 мин.;
7. Добавят се 20 μ l Protein precipitation solution BF, вортексира се за 5 сек. и се инкубира на стайна температура 1 мин.;
8. Центрофугира се на 11 000 x g за 3 мин.;
9. Супернатантата се прехвърля в нова епруветка и се добавят 270 μ l изопропанол и се вортексира за 5 сек.;

Добавянето на по-голямо количество изопропанол беше с цел увеличаване на добива на miRNAs.

10. Цялата течност се натоварва върху microRNA Mini spin column BF и се инкубира на стайна температура за 2 мин.;
 11. Центрофугира се на 11 000 x g за 30 сек.;
 12. Изхвърля се преминалата течност и към колонката се добавят 100 µl Wash solution 1 BF;
 13. Центрофугира се на 11 000 x g за 30 сек.;
 14. Изхвърля се преминалата течност и към колонката се добавят 700 µl Wash solution 2 BF;
 15. Центрофугира се на 11 000 x g за 30 сек.;
 16. Изхвърля се преминалата течност и към колонката се добавят 250 µl Wash solution 2 BF;
 17. Центрофугира се на 11 000 x g за 2 мин.;
 18. Изхвърля се преминалата течност и колонката се премества в чиста епруветка;
 19. Центрофугира се на 11 000 x g за 30 сек. до 1 мин.;
 20. Колонка се прехвърля в стерилна епруветка, добавят 20 µl RNase – free water директно върху мембраната и се инкубира на стайна температура за 5 мин.;
- Добавянето на по-малко количество вода (чиста от нуклеази) и увеличаването на времето за инкубация преди елуирането, беше приложено с цел увеличаване на концентрацията на miRNAs.
21. Центрофугира се на 11 000 x g за 1 мин.;

22. Елуираната РНК се съхранява при -80°C .

4.6.4. Изследване нивата на експресия на циркулиращи в кръвта миРНК-и

Анализите бяха проведени в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, при МУ-Варна.

4.6.4.1. cDNA синтеза

За синтез на cDNA беше използван RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Анализът беше осъществен по следния протокол.

Подготовка на РНК матрица/Праймер микс.

1. Ползват се 90 ng РНК матрица

Приготвя се SI-праймер микс

2. От 100 μM сток на праймерите се вземат 5 μl от всеки до 100 μl H_2O (5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$). От този разтвор се прави 10x разреждане (50 μM , 1 μl + 9 μl H_2O). От приготвеното разреждане се взема 1 μl за cDNA реакция от 20 μl .

3. В PCR епруветки се отпипетирват от всяка проба РНК матрица (90 ng крайна концентрация) и PCR H_2O + 1 μl SI-праймер микс. Общо 13 μl .

4. PCR епруветките с този микс се оставят на 70°C , 5 min и на 4°C , 5 min.

Приготвя се следния микс:

4 μl Буфер

1 μl dNTPs

1 μl DTT

0.5 μl Инхибитор

0.5 μl RT-полимераза

5. По време на предходната инкубация при 4°C за 5 мин. се накапват по 7 µl от така приготвения мастер микс.

6. Инкубация:

16°C, 30 min | 60 цикъла при 30°C, 30 sec; 42°C, 30 sec; 50°C, 1 sec
| 70°C, 10 min; 4°C∞

Преамплификация на cDNA

Преамплификацията беше осъществена с използването на ген специфични прави и универсален обратен праймери (10 µM) следвайки протокол на производителя на обратната 2x Red Taq транскриптаза (Genaxxon Bioscience, Ulm, Germany)

1. Преамплификационен праймер микс:

5 µl от 100 µM сток на For праймерите от всяка микро-РНК+ 5 µl U6 For

2. Реакция:

5 µl cDNA

1 µl Preamplification mix primers

0.78 µl 10 µM Universal Rev primer

0.5 µl 10 µM U6 Rev primer

1.5 µl 25mM MgCl₂

3.72 µl H₂O

12.5 µl Red-Taq 2x Master mix

Тотален обем 25 µl

3. Инкубация:

95°C, 10 min; 55°C, 2 min; 75°C, 2 min | 10 цикъла при 95°C, 15 sec; 60°C, 4 min | 4°C∞.

4.6.4.2. qPCR реакция (количествен PCR)

Реакцията на qPCR бе осъществена с AmplifyMe SG Universal Mix (AM02, BLIRT, Poland) според указанията производителя с

допустими модификации, на апарат ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

1. Реакция:

1 µl 3x разреден Пре-амплификационен микс

1 µl For/Rev 10µM primer mix

5 µl Sybr green 2x мастер микс + ROX (пасивно багрило според изскванията на апарата)

3 µl вода

2. Инкубация:

95°C, 5 min; | 40 цикъла при 95°C, 15 sec; 60°C, 1 min | 95°C, 15 sec; 60°C, 20 sec; 95°C, 15 sec; 60°C, 20 sec.

qPCR беше осъществен чрез 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem).

Използваните праймери за изследване нивата на експресия на циркулиращи в кръвта микро-РНК-и са представени в *Таблица 3*.

Таблица 3. Секвенции на праймерите за избраните миРНК-и и ендогенната контрола

миРНК	Stem loop 5'-3'
микро-РНК-26a-1	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GCGTGCAAG
микро-РНК-146a	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GAACCCATG
микро-РНК-618	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GACTCAGAA
микро-РНК-143	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GGAGCTACA

микро-РНК-145	CTCAACTGGTGTCTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GAGGGATTC	
микро-РНК-181b	CTCAACTGGTGTCTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGA GACCCACCG	
	Forward 5'- 3'	Reverse 5'- 3'
микро-РНК-26a-1	ACACTCCAGCTGGGCCTA TTCTTGGTTACT	GTC GGC AAT TCA GTT GAG
микро-РНК-146a	ACACTCCAGCTGGGTGAG AACTGAATTCCA	
микро-РНК-618	ACACTCCAGCTGGGAAAC TCTACTTGTCCCTT	
микро-РНК-143	ACACTCCAGCTGGGTGAG ATGAAGCACTG	
микро-РНК-145	ACACTCCAGCTGGGGTCC AGTTTTCCAGGA	
микро-РНК-181b	ACACTCCAGCTGGGAACA TTCATTGCTGTCG	
U6	GCTTCGGCAGCACATATA CTAAAAT	

4.6.5. Методи за медико-статистическа обработка на данните

Анализът на данните се извърши със статистически пакет SPSS for Windows, v.21. Всички стойности са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение (SD). За статистически достоверни са приемани разлики, при които $p \leq 0,05$.

Статистическата обработка на получените резултати бе извършена със следните софтуерни пакети: GraphPad Prism 6.0,

SNPStats. Предварително е заложено ниво на статистическа значимост $p < 0,05$. При обработка на данните бяха използвани следните методи за анализ:

1. Метод на статистическа групировка на данните – признаците се подреждат според вида си във вариационни, интервални, категорийни, степенни и динамични статистически редове;

2. Метод на статистическо оценяване - чрез точкови оценки, чрез интервални оценки и чрез интервали на доверителност (CI);

3. За откриване на неслучайни асоциации между две категорийни променливи - тест на Фишер (two-tailed Fisher's exact test);

4. Метод за изчисление на отношението на шансовете - (odds ratio - OR) в 95% доверителен интервал (95% CI – confidence interval) и p-value;

5. Непараметричен анализ – чрез χ^2 по Pearson, чрез Mann-Whitney тест и чрез корелационен анализ по Pearson и др.;

6. ROC (Receiver operating characteristic) анализ – представян графично чрез „Площ под кривата“ – AUC (area under the curve) за оценка на специфичност и чувствителност на изследваните ncRNAs като маркери;

7. Анализ на преживяемостта – чрез методите на Kaplan-Meier, разликите ще бъдат оценени чрез log-rank тест;

8. Cox proportional hazards models - за определяне HRs и интервал на конфиденциалност 95% CIs – тест за оценка на прогностичната и предиктивната стойност на установен биомаркер.

Бяха проследени всички възможни генетични модели на унаследяване на изследваните полиморфизми (Таблица 4).

Таблица 4. Генетични модели на унаследяване, използвани за анализ на асоциацията на изследваните SNPs със КРК

Генетичен модел	А – вариантен алел В – див тип
Алели	A/B
Рецесивен	AA/BB+AB
Доминантен	AA+AB/BB
Кодоминантен	AB/BB; AA/BB
Свръхдоминантен	AB/BB+AA
Адитивен	2.AA+AB/BB

Алелният модел измерва асоциацията на вариантния алел с наличието на болест/клинична форма. При рецесивния генетичен модел с различна степен на риск се свързва единствено хомозиготното носителство на вариантния алел. При доминантния генетичен модел хетерозиготите имат еднакъв риск с хомозиготите по вариантния алел. Кодоминантният генетичен модел показва, че всеки генотип определя различен риск, отделно от другите. Той позволява сравнение на хетерозиготните носители с хомозиготните по дивия тип, както и сравнение между хомозиготните индивиди по вариантния алел с хомозиготните по дивия тип. При свръхдоминантния генетичен модел хетерозиготните носители на полиморфизма различен риск да развият заболяването от носителите на хомозиготните генотипове. Адитивният генетичен модел показва, че всяко копие от вариантния алел модифицира само по себе си риска от

заболяването, като при наличието на две копия ефектите им се сумират.

5. Резултати

5.1. Клинична и патологична стратификация на пациентите

Следните клинични данни са бяха събрани в хода на проучването: демографски данни (имена, възраст при диагностициране, пол и др.), локализация на първичен тумор и вторични лезии, TNM класифициране, вид и продължителност на първа и последващи линии на лечение, общо състояние според ECOG (PS). Бяха изчислени преживяемостта без прогресия и общата преживяемост (с cut-off 36 месеца отговарящ на продължителността на проследяване в рамките на проучването) чрез използването на *IBM SPSS version 21*.

Следните патологични данни бяха събрани: характеристика на тумора – хистология, степен на диференциация, мутационен статус на *RAS* и вид мутация (липсва информация за всички пациенти) (*Таблица 5, Таблица 6*).

Таблица 5. Изходни клинични и патологични характеристики на пациентите

Пол (N, %)	
Мъже	66 (65,3%)
Жени	35 (34,7%)
Средна възраст (years) +/- SD	59,6 +/- 11,7
Локализация на тумора (N, %)	
Десен колон	25 (24,8%)
Ляв колон	76 (75,2%)

Степен на диференциация (N, %)	
Grade 1	9 (8,9%)
Grade 2	68 (67,3%)
Grade 3	24 (23,8%)
RAS мутационен статус (N, %)	
Див тип (wild type)	45 (44,56%)
Мутирал	50 (49,5%)
Неизвестен статус	6 (5,94%)
Локализация на вторични лезии (N, %)	
Черен дроб	74 (73,27%)
Бял дроб	21 (20,79%)
Други	6 (5,94%)

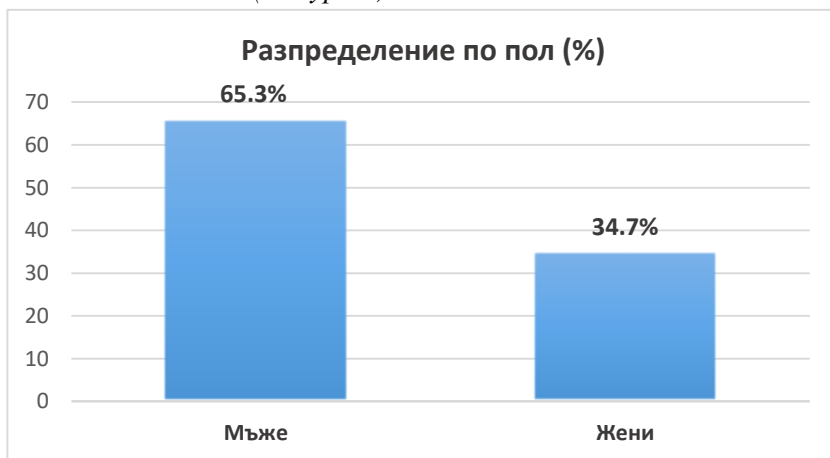
Таблица 6. Обобщение на свързаните с лечението показатели – вид и отговор от проведената първа линия терапия, PFS, OS.

Вид първа линия лечение			
Режим	(N, %)	PFS (месеци) mean +/- SD	OS (месеци) mean +/- SD
FOLFOX	6 (5,9%)	6,0 +/- 5,65	27,1 +/- 22,8

FOLFIRI	1 (1,0%)	9,0	20,0
FOLFOX + Bevacizumab	6 (5,9%)	7,0 +/- 2,19	15,5 +/- 5,50
FOLFOX + Panitumumab	19 (18,8%)	7,42 +/- 7,0	21,63 +/- 16,22
FOLFOX + Cetuximab	4 (4,0%)	4,25 +/- 1,25	12,0 +/- 5,41
FOLFIRI + Beverizumab	10 (9,9%)	9,90 +/- 7,23	25,1 +/- 11,15
CAPEOX	19 (18,8%)	7,61 +/- 6,58	24,26 +/- 15,28
CAPEOX + Beverizumab	36 (35,7%)	10,24 +/- 6,79	27,6 +/- 15,08
Оценка по RECIST 1,1 след приключване на първа линия лечение			
Complete response (CR)	6 (5,9%)		
Partial response (PR)	24 (23,8%)		
Stable disease (SD)	29 (28,7%)		
Progressive disease (PD)	42 (41,6%)		
OS (N, mean +/- SD)			
Над 36 месеца	81 (80,2%)		
Под 36 месеца	20 (19,8%)		
mean OS (месеци)	24,17 +/- 15,01		

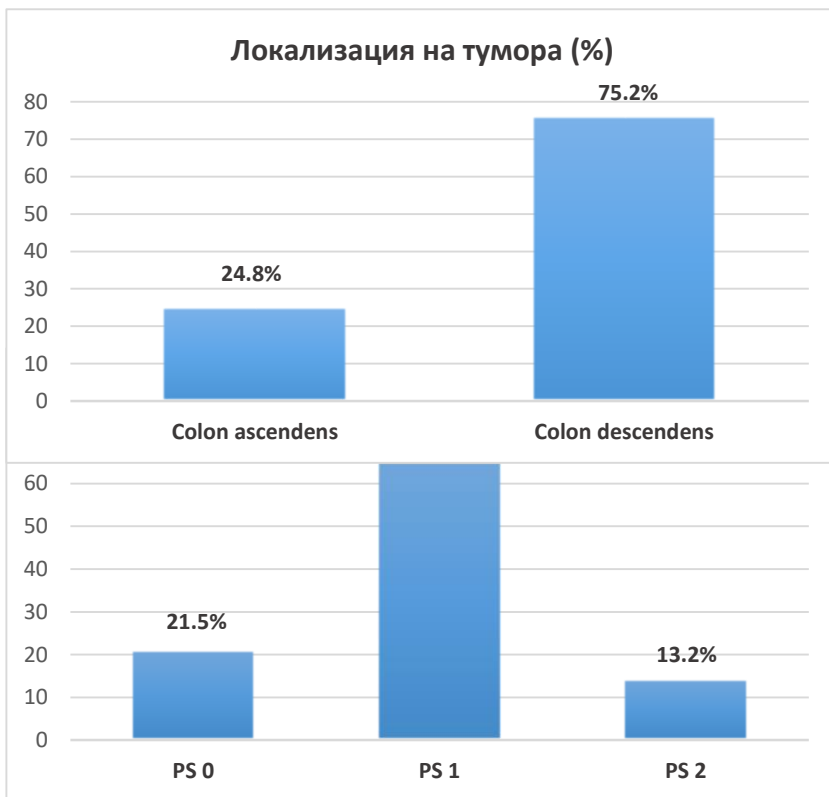
Разпределение по групи

Разпределението по пол е в полза на мъжете $n=66$ (65,3%) спрямо жените $n=35$ (34,7%) в общата група пациенти ($n=101$). Средната възраст на всички участници ($n=101$) при поставяне на диагнозата е 59,6 години с минималната възраст 47г. и максимална - 72 г. (Фигура 2).



Фигура 2. Разпределение на пациентите по пол (%)

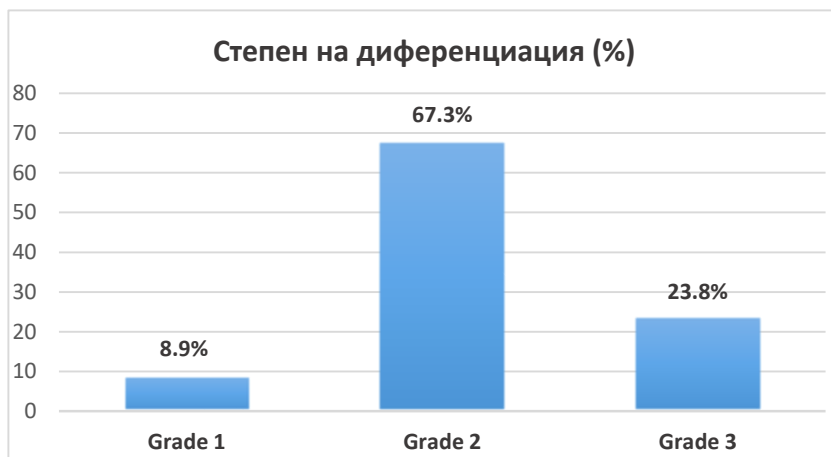
Фигура 3. Разпределение на пациентите според пърформанс статуса (%)



Фигура 4. Разпределение на пациентите според първичната локализация на тумора (%)

В изпитването са включени пациенти с общо състояние < или = 2, оценено по скалата на ECOG (PS). Основната част от всички пациентите при започване на първи цикъл химиотерапия са с ECOG 1 (65,3%), следвани от тези с ECOG 0 (21,5%). Най-малък е броят на пациентите с ECOG 2 (13,2%) (Фигура 3).

Първичната локализация на карцинома на колона е с най-чест произход от низходящата част на дебелото черво – 75,2% (n=76) следвани от пациентите с първичен карцином във възходящата част на дебелото черво – съответно 24,8% (n=35) (Фигура 4).



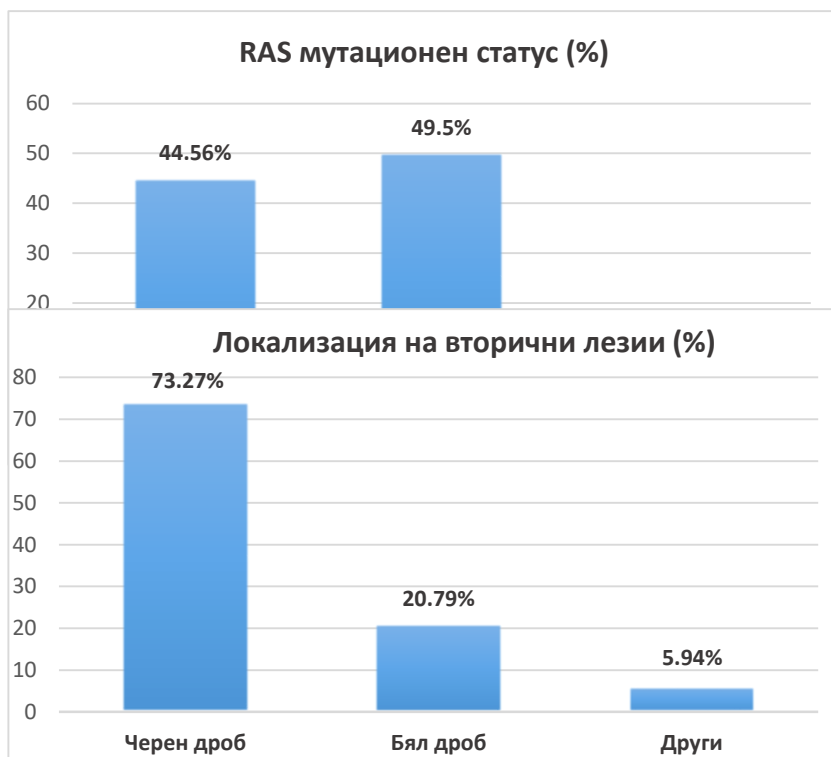
Фигура 5. Разпределение на пациентите в проучването според степен на диференциация на тумора (%)

При разпределението по степен на диференциация на тумора водещ е броя на пациентите с Grade 2 тумори – 67,3% (n=68) следвани от групата на пациентите с Grade 3 диференциация n=24 (23,8%) и Grade 1 тумори 8,9% (n=9) съответно (Фигура 5).

Друг показател проследен в хода на проучването е RAS мутационния статус. При разпределението водещ е броя на пациентите с RAS мутирала тип (M+) тумори – 49,5% (n=50) следвани от групата на пациентите с RAS див тип (wild type) n=45

(44,56%). В проследяването има и 6 пациента (5,94%), чийто мутационен статус е неизвестен (Фигура 6).

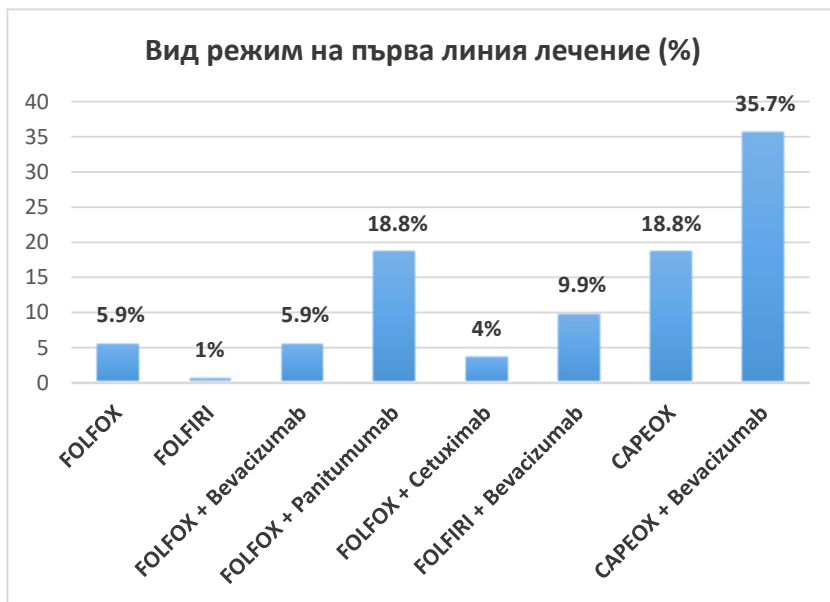
Локализацията на вторичните лезии с най-чест произход на засягане е черният дроб – 73,27% (n=74) следвани от групата на пациентите с метастази в бял дроб 20,79% (n=21) и такива със засягане на други органи – съответно 5,94% (n=6) (Фигура 7).



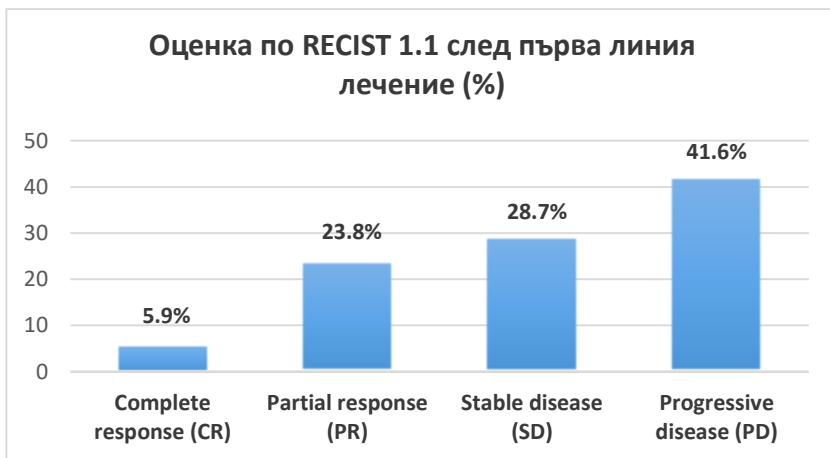
Фигура 6. Разпределение на пациентите в проучването според RAS мутационен статус (%)

Фигура 7. Разпределение на пациентите в проучването според локализацията на вторичните лезии (%)

Според режима приложен на първа линия лечение подгруповото разпределение на пациентите беше следното: FOLFOX n=6 (5,9%), FOLFIRI n=1 (1,0%), FOLFOX + Bevacizumab n=6 (5,9%), FOLFOX + Panitumumab n=19 (18,8%), FOLFOX + Cetuximab n=4 (4,0%), FOLFIRI + Bevacizumab n=10 (9,9%), CAPEOX n=19 (18,8%) и CAPEOX + Bevacizumab n=36 (35,7%) (Фигура 8).



Фигура 8. Разпределение на пациентите в проучването според вида режим приложен на първа линия лечение (%)

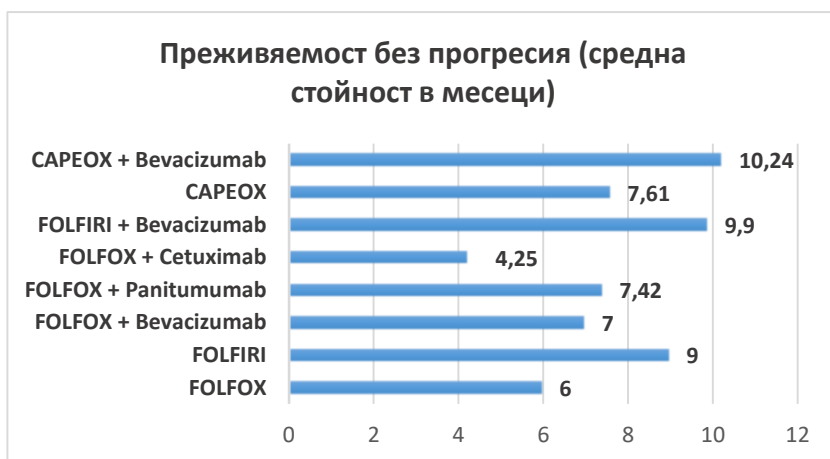


Фигура 9. Разпределение на пациентите в проучването според оценка по RECIST 1.1 след проведена първа линия лечение (%)

След провеждането на първа линия лечение всички пациенти преминаха образна оценка според класификацията по RECIST 1.1 с оглед стадиране и проследяване на отговор от проведената противотуморна терапия. Групата пациенти с пълен отговор (CR) към лечението бяха $n=6$ (5,9%), а тези с отчетен частичен отговор (PR) и стабилна болест (SD) бяха съответно $n=24$ (23,8%) и $n=29$ (28,7%). Водеща беше групата на пациентите с данни за прогресия на заболяването (PD), чийто процент беше 41,6% ($n=42$) (Фигура 9).

Бяха изчислени средните стойности на преживяемостта без прогресия (PFS) и общата преживяемост (OS) +/- стандартно отклонение (SD) в месеци чрез използването на *IBM SPSS version 21*. За общата преживяемост беше приложен cut-off от 36 месеца отговарящ на продължителността на проследяване в рамките на проучването.

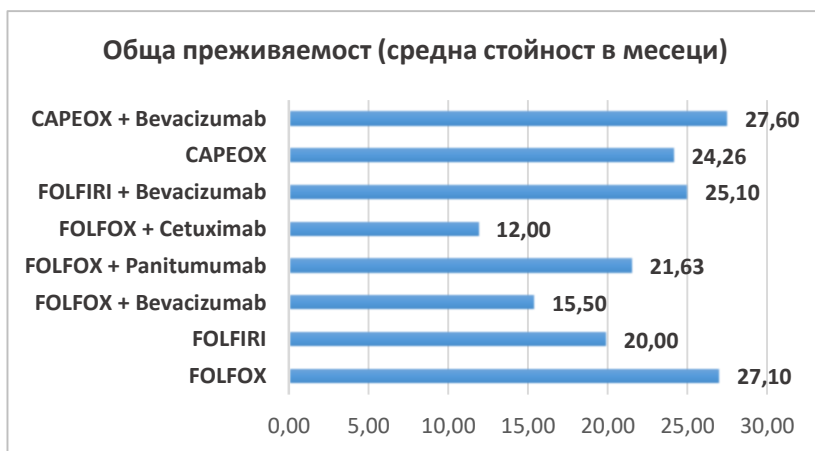
Анализът на данните свързан с преживяемостта без прогресия (PFS) показва, че водеща е групата на пациентите лекувани с CAPEOX + Bevacizumab 10,24 +/- 6,79 месеца следвана от групата с FOLFIRI + Bevacizumab 9,90 +/- 7,23 месеца. На последно място беше групата с FOLFOX + Cetuximab 4,25 +/- 1,25 месеца. Останалите групи бяха разпределени по следния начин: FOLFOX 6,0 +/- 5,65 месеца, FOLFIRI 9.0 месеца, FOLFOX + Bevacizumab 7,0 +/- 2,19 месеца, FOLFOX + Panitumumab 7,42 +/- 7,0 месеца и CAPEOX 7,61 +/- 6,58 месеца съответно (Фигура 10).



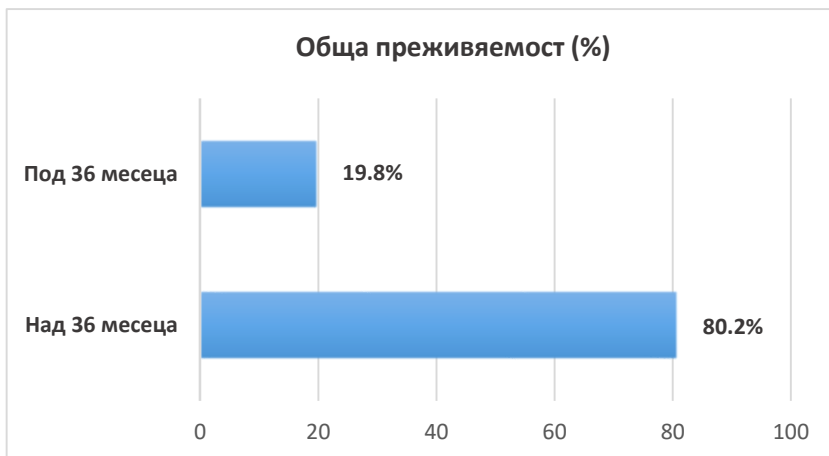
Фигура 10. Разпределение на пациентите в проучването според преживяемостта без прогресия (PFS) при различните режими приложени на първа линия лечение (средна стойност в месеци)

По отношение на общата преживяемост (OS) подгруповият анализ показва, че пациентите лекувани с режима CAPEOX + Bevacizumab имат най-дълга средна OS 27,6 +/- 15,08 месеца, а групата на пациентите с най-къса OS бяха провели лечение по протокол FOLFOX + Cetuximab 12,0 +/- 5,41 месеца. Разпределението на останалите групи беше следното: FOLFOX

27,1 +/- 22,8 месеца, FOLFIRI + Bevacizumab 25,1 +/- 11,15 месеца, CAPEOX 24,26 +/- 15,28 месеца, FOLFOX + Panitumumab 21,63 +/- 16,22 месеца, FOLFIRI 20,0 месеца и FOLFOX + Bevacizumab 15,5 +/- 5,50 месеца (Фигура 11). В проведения анализ спрямо cut-off от 36 месеца разпределението беше следното – групата на пациентите с OS над 36 месеца беше със значително по-голям дял спрямо тази с OS под 36 месеца 80,2% (n=81) и 19,8% (n=20) съответно. Средната стойност на общата преживяемост беше 24,17 +/- 15,01 месеца (Фигура 12).



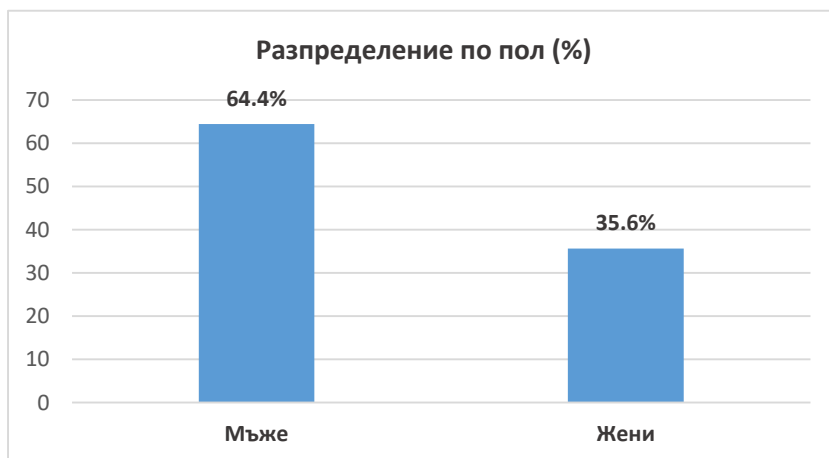
Фигура 11. Разпределение на пациентите в проучването според общата преживяемост (OS) при различните режими приложени на първа линия лечение (средна стойност в месеци)



Фигура 12. Разпределение на пациентите в проучването според общата преживяемост (OS) с cut-off от 36 месеца (%)

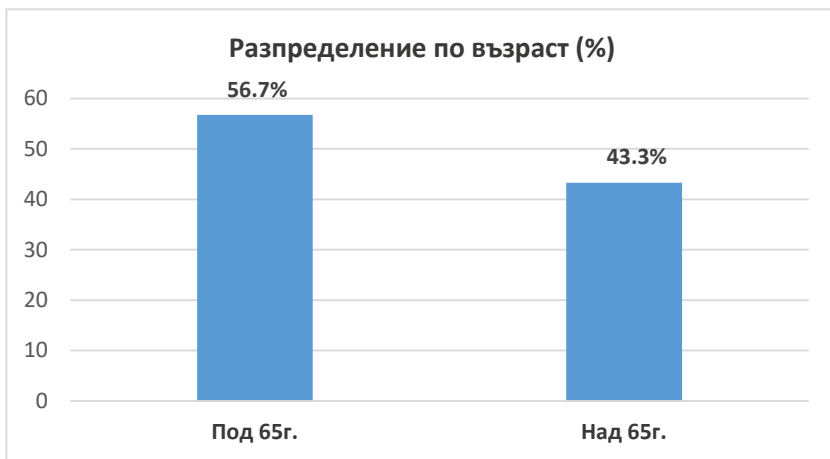
Разпределение на здравите контроли по пол и възраст

В рамките на проучването участие взеха 90 здрави контроли. Според разпределение по пол делът на мъжете беше по-голям спрямо този на жените – 64,4% (n=58) спрямо 35,6% (n=32) (Фигура 13). При разпределението спрямо възраст групата



Фигура 13. Разпределение на здравите контроли по пол (%)

на здравите контроли под 65г. беше водеща спрямо тази на хората над 65г. – 56,7% (n=51) спрямо 43,3% (n=39) (Фигура 14).



Фигура 14. Разпределение на здравите контроли по възраст (%)

5.2. Алелно разпределение и генотипна честота на подобрните SNP в селектираната кохорта пациенти с метастатичен КРК

Селектираните пациенти с КРК бяха скринирани за наличие на пет подобрани SNPs в гените за микро-РНК-и. Получените резултатите от анализа са представени в последващите таблици (Таблица 7 до таблица 11).

Таблица 7. Алелно разпределение и генотипна честота на rs7372209 в гена за miRNA-26a-1 при пациенти с мКРК

Алели	Пациенти с КРК, брой (честота)
С	150 (0,74)
Т	52 (0,26)
Генотипове	Пациенти с КРК, брой (честота)
СС	60 (0,55)
ТС	30 (0,38)
ТТ	11 (0,07)

Таблица 8. Алелно разпределение и генотипна честота на rs2910164 в гена за miRNA-146a при пациенти с мКРК

Алели	Пациенти с КРК, брой (честота)
G	158 (0,78)
C	44 (0,22)
Генотипове	Пациенти с КРК, брой (честота)
GG	67 (0,61)
CG	24 (0,34)
CC	10 (0,05)

Таблица 9. Алелно разпределение и генотипна честота на rs2682818 в гена за miRNA-618 при пациенти с мКРК

Алели	Пациенти с КРК, брой (честота)
С	192 (0,92)
А	16 (0,08)
Генотипове	Пациенти с КРК, брой (честота)
СС	91 (0,84)
АС	10 (0,15)
АА	3 (0,01)

Таблица 10. Алелно разпределение и генотипна честота на rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145 при пациенти с мКРК

Алели	Пациенти с КРК, брой (честота)
А	103 (0,52)
Г	95 (0,48)
Генотипове	Пациенти с КРК, брой (честота)
АА	32 (0,27)
АГ	39 (0,50)
ГГ	28 (0,23)

Таблица 11. Алелно разпределение и генотипна честота на rs322931 в гена за miRNA-181b при пациенти с мКРК

Алели	Пациенти с КРК, брой (честота)
G	150 (0,77)
A	46 (0,23)
Генотипове	Пациенти с КРК, брой (честота)
GG	59 (0,60)
AG	32 (0,35)
AA	7 (0,05)

5.3. Сравнение на алелните и генотипните честоти на подобраните пет SNPs в българската група здрави индивиди с наличните данни за други кохорти.

Всички изследвани SNPs удовлетворяват закона за равновесието на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium - HWE) с $p > 0,05$ при изследваните здрави контроли, което е видно в следващата таблица (Таблица 12).

Таблица 12. Стойности на p -value от проведен exact test за съответствие със закона за независимото унаследяване на Hardy-Weinberg

Група/SNP	rs7372209	rs2910164	rs2682818	rs353293	rs322931
Контролна група	0,78	1	0,87	0,88	0,42

За да установим доколко получените от нас резултати биха били сравними с такива от други кохорти проследихме алелното разпределение и генотипната честота на изследваните полиморфизми в подбраните здравите индивиди с тези, докладвани за други раси и нации, в базата данни на 1000 Genome Project (<https://www.internationalgenome.org>). Беше установено сходното честотно разпределение на изследваните полиморфизми в българските индивиди и европейските кохорти.

Таблица 13. Честотно разпределение на изследваните полиморфизми в българските индивиди и европейските кохорти.

SNPs/КОХОРТИ	АЛЕЛИ, ГЕНОТИПОВЕ	ALL	AFR	AMR	EAS	EUR	ЗД
rs7372209	C	0,80	0,98	0,62	0,73	0,70	0,78
	T	0,20	0,02	0,38	0,27	0,30	0,22
	CC	0,66	0,96	0,40	0,54	0,48	0,61
	TC	0,28	0,34	0,44	0,38	0,43	0,34
	TT	0,06	0,00	0,16	0,09	0,09	0,05
rs2910164	G	0,71	0,60	0,69	0,37	0,77	0,75
	C	0,29	0,40	0,31	0,63	0,23	0,25
	GG	0,50	0,36	0,47	0,13	0,59	0,56
	CG	0,41	0,48	0,43	0,47	0,36	0,38
	CC	0,08	0,16	0,10	0,40	0,05	0,06
rs2682818	C	0,76	0,66	0,88	0,75	0,86	0,89
	A	0,24	0,34	0,12	0,25	0,14	0,11
	CC	0,58	0,44	0,76	0,57	0,73	0,79
	AC	0,35	0,44	0,21	0,36	0,25	0,20
	AA	0,07	0,12	0,01	0,07	0,02	0,01

rs353293	A	0,26	0,03	0,50	0,16	0,44	0,43
	G	0,74	0,97	0,50	0,84	0,56	0,57
	AA	0,10	0,00	0,26	0,02	0,19	0,18
	AG	0,33	0,06	0,48	0,28	0,49	0,49
	GG	0,57	0,94	0,26	0,70	0,32	0,33
rs322931	G	0,81	0,85	0,77	0,83	0,82	0,81
	A	0,19	0,15	0,23	0,17	0,18	0,19
	GG	0,65	0,71	0,60	0,68	0,65	0,65
	AG	0,32	0,27	0,34	0,30	0,33	0,31
	AA	0,03	0,02	0,06	0,02	0,02	0,04

Легенда: ALL – в общата популация; AFR – комбинирани данни от 7 африкански кохорти (African Caribbean in Barbados, African Ancestry in Southwest US, Esan in Nigeria, Gambian in Western Division, the Gambia, Luhya in Webuye, Kenya); AM – комбинирани данни от 4 американски кохорти (Colombian in Medellin, Colombia; Mexican Ancestry in Los Angeles, California; Peruvian in Lima; Puerto Rican in Puerto Rico); AS – комбинирани данни от общо 10 азиатски кохорти (Chinese Dai in Xishuangbann, China; Han Chinese in Beijing, China; Southern Han Chinese, China; Japanese in Tokyo, Japan; Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam, Bengali in Bangladesh; Gujarati Indian in Houston, TX; Indian Telugu in the UK; Punjabi in Lahore, Pakistan; Sri Lankan Tamil in the UK); EUR – комбинирани данни от общо 5 европейски кохорти (Utah residents with Northern and Western European Ancestry; Finnish in Finland; British in England and Scotland; Iberian population in Spain; Toscani in Italy); ЗД – изследваната контролна група от 90 здрави доброволци

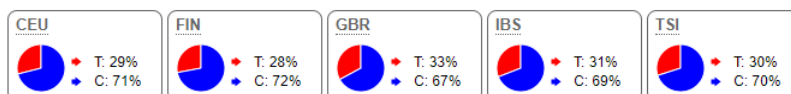
По отношение на rs2910164 честотното разпределение по алели и генотипове при азиатската смесена кохорта показва различие в

сравнение с останалите кохорти. G алела при азиатци е със значително по-ниска честота. За rs353293 също бяха отчетени съществени различия в алелното и генотипното разпределение в африкански и азиатски популации, където G алелът е доминантен, докато в другите кохорти е се наблюдава по-скоро равно разпределението на двата алела.

Направихме сравнение между алелните честоти на изследваните полиморфизми в 5 европейски кохорти и нашите данни за контролната група. Беше установено сходното честотно разпределение на изследваните полиморфизми в българските индивиди и европейските кохорти.

1) Сравнение на алелните честоти на полиморфизма rs7372209 между 5 европейски кохорти и изследваната група здрави контроли в България

EUR sub-populations



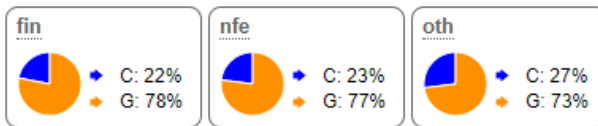
Фигура 15. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs7372209 в 5 европейски кохорти.

Легенда: *CEU* - Utah residents with Northern and Western European Ancestry; *FIN* - Finnish in Finland; *GBR* - British in England and Scotland; *IBS* - Iberian population in Spain; *TSI* - Toscani in Italy



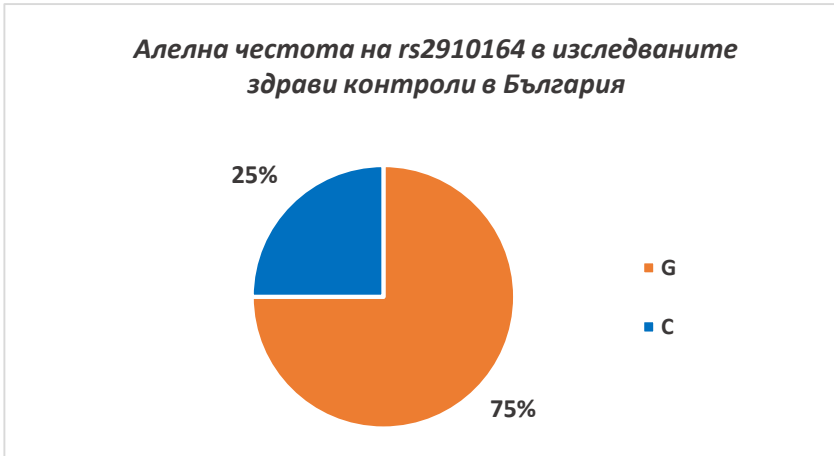
Фигура 16. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs7372209 в изследваните здрави контроли в България.

- 2) Сравнение на алелните честоти на полиморфизма rs2910164 между европейски кохорти и изследваната група здрави контроли в България



Легенда: *fin* - Finnish in Finland; *nfe* – non- Finnish Europeans; *oth* – други Europeans

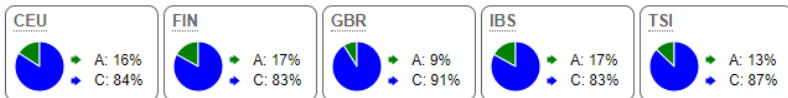
Фигура 17. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs2910164 в европейски кохорти.



Фигура 18. *Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs2910164 в изследваните здрави контроли в България.*

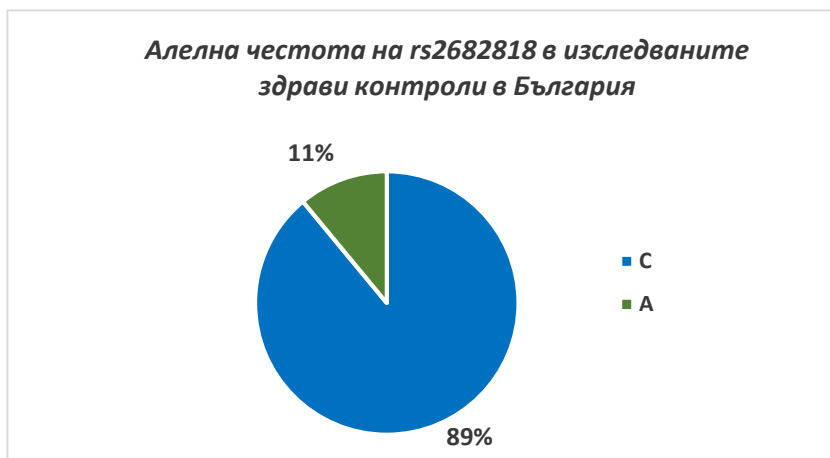
3) Сравнение на алелните честоти на полиморфизма rs2682818 между европейски кохорти и изследваната група здрави контроли в България

EUR sub-populations



Легенда: *CEU - Utah residents with Northern and Western European Ancestry; FIN - Finnish in Finland; GBR - British in England and Scotland; IBS - Iberian population in Spain; TSI - Toscani in Italy*

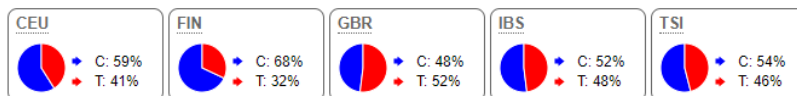
Фигура 19. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs2682818 в европейски кохорти.



Фигура 20. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs2682818 в изследваните здрави контроли в България.

4) Сравнение на алелните честоти на полиморфизма rs353293 между европейски кохорти и изследваната група здрави контроли в България

EUR sub-populations



Легенда: *CEU* - Utah residents with Northern and Western European Ancestry; *FIN* - Finnish in Finland; *GBR* - British in England and Scotland; *IBS* - Iberian population in Spain; *TSI* - Toscani in Italy

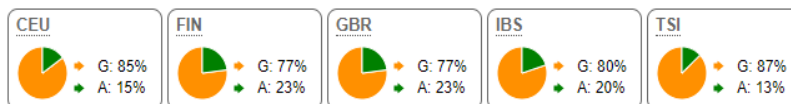
Фигура 21. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs353293 в европейски кохорти.



Фигура 22. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs353293 в изследваните здрави контроли в България.

5) Сравнение на алелните честоти на полиморфизма rs322931 между европейски кохорти и изследваната група здрави контроли в България

EUR sub-populations



Легенда: *CEU* - Utah residents with Northern and Western European Ancestry; *FIN* - Finnish in Finland; *GBR* - British in England and Scotland; *IBS* - Iberian population in Spain; *TSI* - Toscani in Italy

Фигура 23. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs322931 в европейски кохорти



Фигура 24. Разпределение на алелните честоти на полиморфизма rs322931 в изследваните здрави контроли в България.

При всички изследвани полиморфизми рецесивният алел е еднакъв с рецесивния алел при другите европейски кохорти.

5.4 Асоциация между носителството на определен генотип/алел на изследваните пет SNPs в гените за микро-РНК-и и възможността да предскажат риск от развитие на КРК.

Бяха сравнение честотите на срещане на отделни SNPs в гените за микро-РНК-и при пациентите и здравите контроли с цел да се докаже обвързаност с предразположение към заболяването.

Бяха оценени алелното и генотипното разпределение на отделните полиморфизми сред изследваните пациенти и здрави доброволци във всички генетични модели. Резултатите са представени в *Таблица 14 до Таблица 18*, от които е видно, че три от изследваните полиморфизми се асоциираха с риск от развитие на КРК.

При rs2910164 - miRNA-146a хетерозиготните индивиди се характеризираха с нисък риск от развитие на заболяването в свръхдоминантния генетичен модел (GG+CC vs. CG, OR=0,53, 95% CI: 0,28-0,99, p=0,047), като само тенденция за това се отчете и в кодоминантния модел (CG vs. GG) (*Таблица 37*).

При rs2682818 - miR-618 също се прояви като протективен по отношение на КРК и в двата хетерозиготни генетични модела - кодоминантен (AC vs. CC, OR=0,39, 95% CI: 0,17-0,88, p=0,024) и свръхдоминантен (AC vs. CC+AA, OR=0,37, 95% CI: 0,16-0,85, p=0,018) генетични модели (*Таблица 38*).

При rs353293 носителите на рецесивния G алел в хомозиготно и хетерозиготно състояние се характеризират с нисък риск от развитие на КРК (*Таблица 39*).

За rs7372209 - miRNA-26a-1 и за rs322931 - miRNA-181b не беше доказана асоциация със заболяването (*Таблица 14 и Таблица 18*).

Таблица 14. Алелно и генотипно разпределение на rs7372209 в гена за miRNA-26a-1, представени във всички генетични модели

Алели	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
-------	-----------------------	-----------	-------------	--------------------------------

С	150	133	1,18 (0,73- 1,90)	0,491
Т	52	39		
Генотипове	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
<i>Кодоминантен модел</i>				
СС	60	55	1,00 (reference)	
ТС	30	31	0,89 (0,48- 1,65)	0,705
ТТ	11	4	2,52 (0,76- 8,38)	0,132
<i>Доминантен модел</i>				
СС	60	55	1,07 (0,60- 1,92)	0,810
ТС+ТТ	41	35		
<i>Рецесивен модел</i>				
ТС+СС	90	86	2,63 (0,81- 8,57)	0,109
ТТ	11	4		
<i>Свръхдоминантен модел</i>				
СС+ТТ	71	59	0,80 (0,44- 1,48)	0,483
ТС	30	31		
<i>Аддитивен модел</i>				
СС	60	55	1,22 (0,70- 2,12)	0,477
2ТТ+ТС	52	39		

Таблица 15. Алелно и генотипно разпределение на rs2910164 в гена за miRNA-146a, представени във всички генетични модели

Алели	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
G	158	133	0,82 (0,51-1,32)	0,422
C	44	45		
Генотипове	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
<i>Кодоминантен модел</i>				
GG	67	50	1,00 (reference)	
CG	24	33	0,54 (0,28-1,03)	0,062
CC	10	6	1,24 (0,42-3,65)	0,691
<i>Доминантен модел</i>				
GG	67	50	0,65 (0,36-1,17)	0,152
CG+CC	34	39		
<i>Рецесивен модел</i>				
CG+GG	91	83	1,52 (0,53-4,36)	0,436
CC	10	6		
<i>Свърхдоминантен модел</i>				
GG+CC	77	56	0,53 (0,28-0,99)	0,047
CG	24	33		

<i>Адитивен модел</i>				
GG	67	50	0,73 (0,42- 1,26)	0,265
2CC+CG	44	45		

Таблица 16. Аеллно и генотипно разпределение на rs2682818 в гена за miRNA-618, представени във всички генетични модели

Алели	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
С	192	160	0,67 (0,33- 1,33)	0,249
А	16	20		
Генотипове	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
<i>Кодоминантен модел</i>				
СС	91	70	1,00 (reference)	
АС	10	20	0,39 (0,17-0,88)	0,024
АА	3	0	-	-
<i>Доминантен модел</i>				
СС	91	70	0,50 (0,23- 1,07)	0,076
АС+АА	13	20		
<i>Рецесивен модел</i>				
АС+СС	101	90	-	-
АА	3	0		
<i>Свърхдоминантен модел</i>				

CC+AA	94	70	0,37 (0,16-0,85)	0,018
AC	10	20		
<i>Аддитивен модел</i>				
CC	91	70	0,61 (0,30-1,27)	0,191
2AA+AC	16	20		

Таблица 17. Алелно и генотипно разпределение на rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145, представени във всички генетични модели

Алели	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
A	103	76	0,69 (0,46-1,03)	0,071
G	95	102		
Генотипове	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
<i>Кодоминантен модел</i>				
AA	32	17	1,00 (reference)	
AG	39	42	0,49 (0,24-1,03)	0,058
GG	28	30	0,50 (0,23-1,08)	0,077
<i>Доминантен модел</i>				
AA	32	17	0,49 (0,25-0,97)	0,041
AG+GG	67	72		
<i>Рецесивен модел</i>				

AG+AA	71	59	0,77 (0,42- 1,44)	0,422
GG	28	30		
<i>Свърхдоминантен модел</i>				
AA+GG	60	47	0,73 (0,41- 1,30)	0,282
AG	39	42		
<i>Адитивен модел</i>				
AA	32	17	0,49 (0,26- 0,95)	0,034
2GG+AG	95	102		

Таблица 18. Алелно и генотипно разпределение на rs322931 в гена за miRNA-181b, представено в представени във всички генетични модели

Алели	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
G	150	143	1,33 (0,80- 2,20)	0,267
A	46	33		
Генотипове	Пациент и с КРК, брой	ЗД*, брой	OR (95% CI)	Пациенти с КРК vs. ЗД* p-value
<i>Кодоминантен модел</i>				
GG	59	58	1,00 (reference)	
AG	32	27	1,16 (0,62- 2,18)	0,633
AA	7	3	2,29 (0,56- 9,30)	0,245
<i>Доминантен модел</i>				

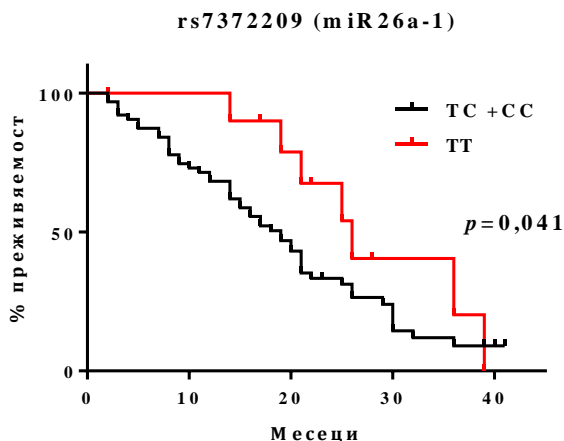
AA	7	3	0,46 (0,12- 1,83)	0,270
AG+GG	91	85		
<i>Рецесивен модел</i>				
AG+AA	39	30	0,78 (0,43- 1,42)	0,422
GG	59	58		
<i>Свърхдоминантен модел</i>				
AA+GG	66	61	1,09 (0,59- 2,03)	0,773
AG	32	27		
<i>Адитивен модел</i>				
GG	59	58	1,37 (0,77- 2,44)	0,283
2AA+AG	46	33		

5.5 Асоциация между носителството на определен генотип/алел на петте изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и и общата преживяемост при пациентите.

Средната обща преживяемост (OS) на изследваните пациенти беше 24,17 месеца (SD=±15,01), като 81 (80,2%) пациенти имаха OS под 36 месеца, а само 20 (19,8%) пациенти имаха OS над 36 месеца.

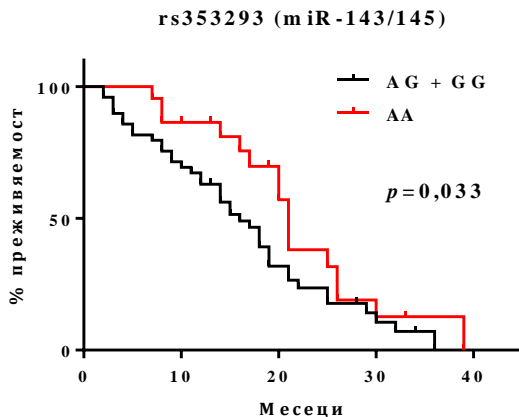
За два от изследваните полиморфизми беше установена статистически значима асоциация с общата преживяемост на пациентите. Тези от тях с ТТ rs7372209 генотип имаха значително по-дълга средна OS от 26 месеца (95% CI: 21,8-34,2) в сравнение с пациентите, носители на ТС и СС генотипове, за които месеците обща преживяемост бяха 19 (95% CI: 16,4-22,2) (log-rank тест, $p=0,041$, *Фигура 25*). Мултивариантният регресионен Cox анализ показва само тенденция за асоциация на ТТ генотипа с по-добра

прогноза на метастатичния КПК (HR=0,57, 95% CI: 0,31–1,15, p=0,082).



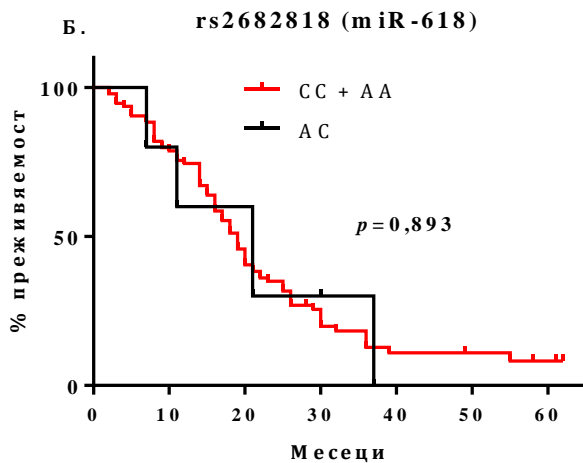
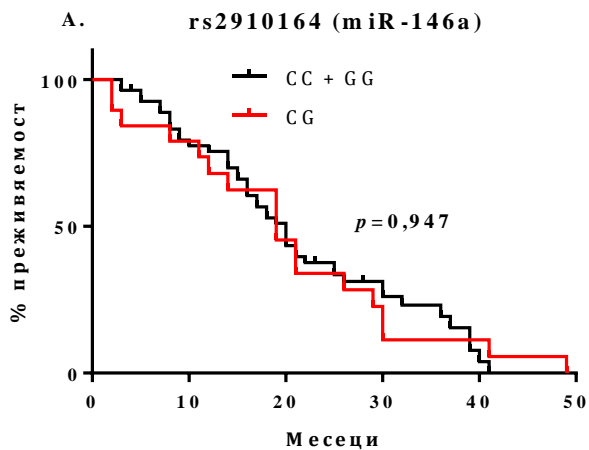
Фигура 25. *Kaplan–Meier* анализ на общата преживяемост (OS) при пациентите с различни генотипове на rs7372209 в гена за miR-26a-1.

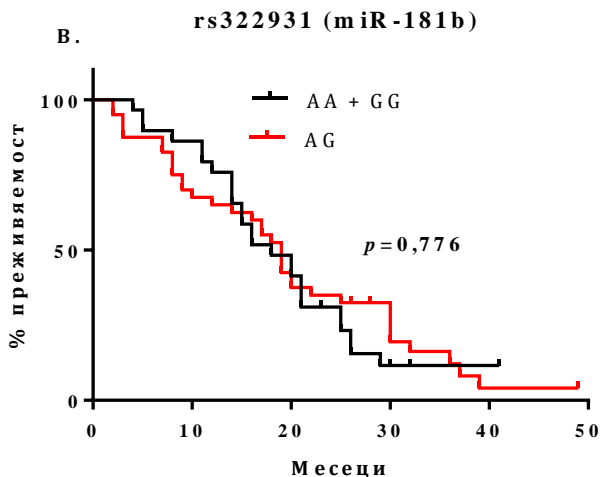
Хомозиготните по А алела (AA) на rs353293 пациенти имаха също по-дълга средна OS - 21,9 месеца (95% CI: 17,72–26,12) в сравнение с 16,6 месеца обща преживяемост при пациентите, носители на G алела (AG + GG) (95% CI: 13,72–19,51) (log-rank тест, p=0,033, *Фигура 26*). Мултивариантният регресионен Cox анализ също показва, че носителството на rs363293 AA генотипа може да се свърже с по-добра прогноза на заболяването, но данните да не достигнаха статистическа значимост (HR=0,59, 95% CI: 0,33–1,08, p=0,086).



Фигура 26. *Kaplan–Meier* анализ на общата преживяемост (OS) при пациентите с различни генотипове на rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145.

За останалите три полиморфизма rs2910164, rs2682818 и rs322931 от изследваните пет не беше намерена връзка между присъствието на определен генотип и общата преживяемост при пациентите (Фигура 27 А., Б., В.).





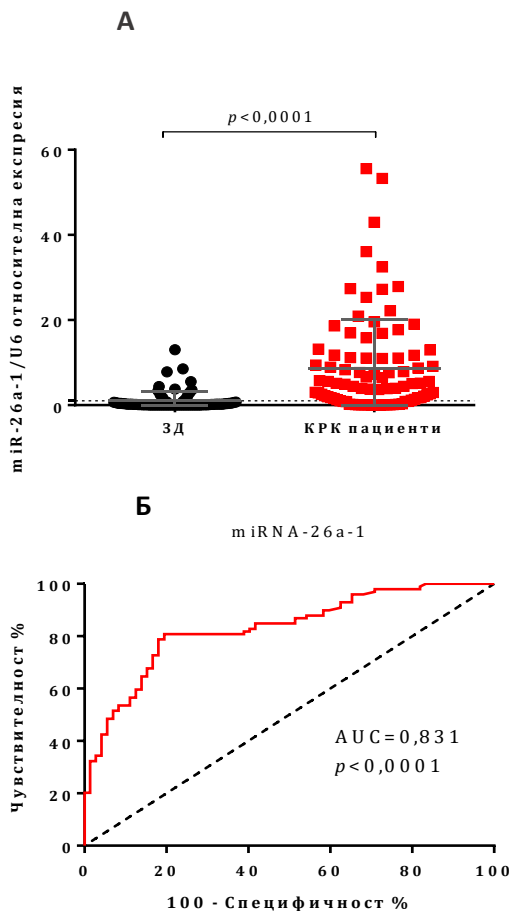
Фигура 27. *Kaplan–Meier* анализ на общата преживяемост (OS) при пациентите с различни генотипове на rs2910164-miR146a (А.), rs268281-miR-618 (Б.) и rs322931-miR-181b (В) полиморфизмите.

5.6. Сравнение на нивата в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNP - при пациентите с метастатичен КРК и при здравата контролна група.

Беше оценено нивото в плазмата при пациенти и здрави контроли на miRNA-ите в чийто гени са локализирани изследваните в проекта полиморфизми. Четири от тях показаха различна експресия при здрави и болни - miRNA-26a-1, miR-146a, miRNA-618 и miRNA-181b.

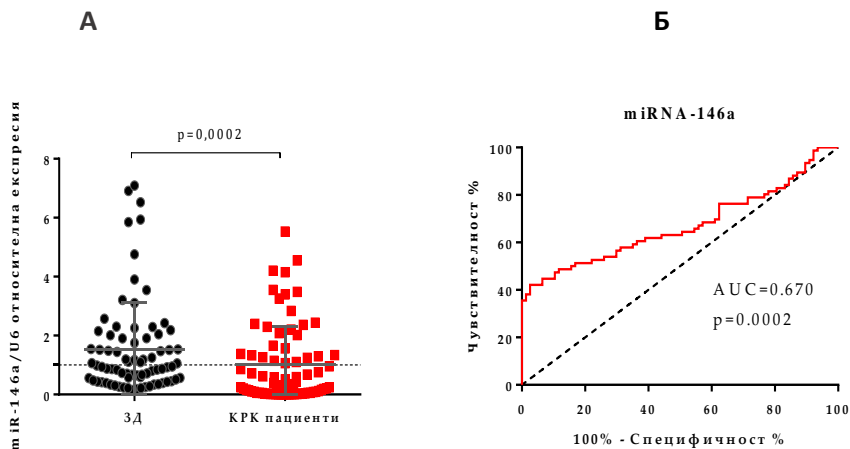
При cut off >0,823 беше установено, че miRNA-26a-1 може да разграничи пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли –

AUC=0,831 (95% CI: 0,77-0,89, $p<0,001$) с 80,81% чувствителност и 80,56% специфичност (Фигура 28).



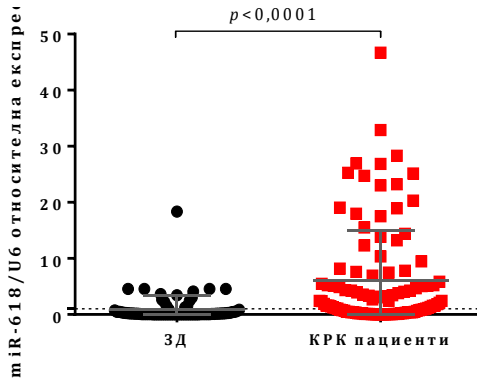
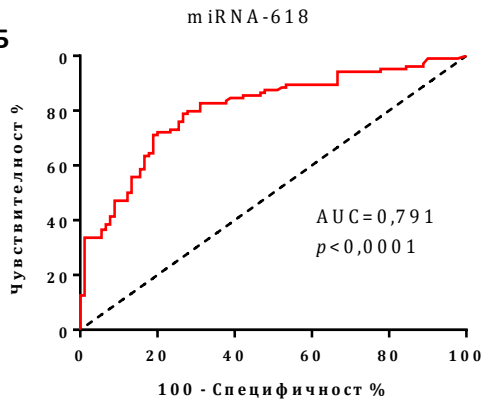
Фигура 28. (А) Сравнителен анализ на нивата на miRNA-26a-1 в плазмата на здрави контроли и пациенти с КРК (Mann-Whitney U test, на графиката е означена средната стойност на експресия \pm SD). (Б) ROC анализ за оценка на потенциалната диагностична стойност на miRNA-26a-1.

При cut off >1.186 беше установено, че miRNA-146a може да разграничи пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли – AUC=0,670 (95% CI: 0,58-0,76, p<0,0002) с 68,42% чувствителност и 40,26% специфичност (Фигура 29).



Фигура 29. (А) Сравнителен анализ на нивата на miRNA-146a в плазмата на здрави контроли и пациенти с КРК (Mann-Whitney U test, на графиката е означена средната стойност на експресия ± SD). (Б) ROC анализ за оценка на потенциалната диагностична стойност на miRNA-146a.

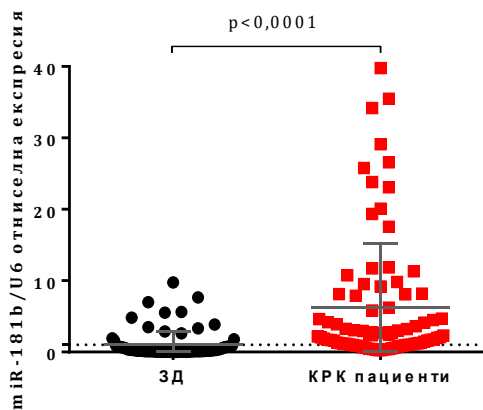
За miRNA-618 при оптимална cut off стойност беше установено, че може да разграничи също пациентите с метастатичен КРК от здрави контроли AUC=0,791 (95% CI: 0,72-0,86, p<0,001) с 79,81% чувствителност и 72,22% специфичност (Фигура 30).

А**Б**

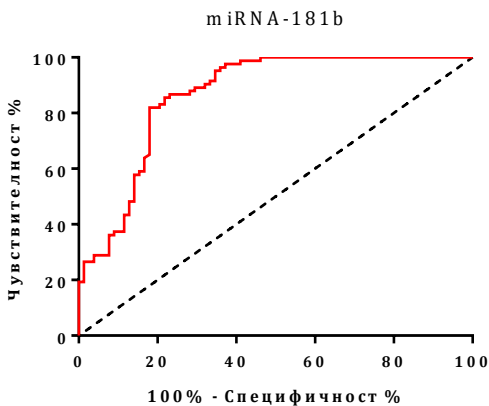
Фигура 30. (А) Сравнителен анализ на нивата на miRNA-618 в серума на здрави контроли и пациенти с КРК (Mann-Whitney U test, на графиката е означена средната стойност на експресија \pm SD). (Б) ROC анализ за оценка на потенциалната дијагностична стойност на miR-618.

При miRNA-181b също беше експресирана в различна степен в здрави и в пациенти, като cut off, при който може да ги разграничи с 81,93% чувствителност и 82,05% специфичност беше >0,944 (AUC=0,865, 95% CI: 0,81-0,92, $p < 0,001$) (Фигура 31).

А

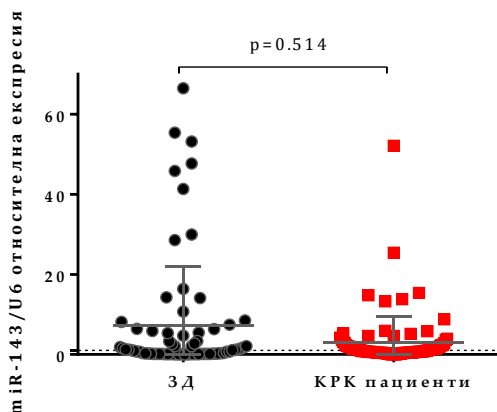


Б



Фигура 31. (А) Сравнителен анализ на нивата на miRNA-181b в серума на здрави контроли и пациенти с КРК (Mann-Whitney U test, на графиката е означена средната стойност на експресия \pm SD). (Б) ROC анализ за оценка на потенциалната диагностична стойност на miR-181b.

Медианата на експресията на miR-143 и miR-145 при пациенти беше 0,889 (0,67-1,34), а при здравите контроли беше 1,097 (0,31-2,06) (Фигура 32). При пациентите нивата на miR-143 и miR-145 са по-ниски, но между двете групи не беше отчетена статистически значима разлика.



Фигура 32. Сравнителен анализ на нивата на miRNA-143/145 в серума на здрави контроли и пациенти с КРК (Mann-Whitney U test, на графиката е означена средната стойност на експресия \pm SD).

5.7. Асоциация между нивата на експресия в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNP и общата преживяемост при пациентите.

В хода на анализите беше проучено и за възможна връзка между носителството на определен генотип при отделните полиморфизми и нивата на миРНК-ите. Целта ни беше намиране на възможен ефект на SNPs върху експресията на генния продукт в опит да се докаже функционална значимост на изследваните полиморфизми. Не беше доказана асоциация между нивата на miRNA и носителството на определен генотип при нито един от включените в изследването полиморфизми.

За пациентите хомозиготни по Т алела на rs7372209 беше наблюдавана още една интересна асоциация, а именно, че за тях локализицията на тумор в десен колон беше 6 пъти по-често срещана в сравнение с пациентите, носители на ТС и СС генотипове (64% vs. 22%, OR=6,13, 95% CI: 1,56-23,97, p=0,009).

6. Дискусия

Проведохме проучване, при което бяха проследени пациенти с метастатичен КРК в рамките на 36 месеца, приключили в пълен обем първа линия лечение. Основен фокус на нашето изследване бе изследването за наличие на единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи миРНК-ки като диагностични и прогностични биомаркери при подбраните пациенти. Получените в хода на изследването ни данни се оказаха със потенциално значение по отношение на диагностицирането и прогнозата на заболяването.

В хода на проследяването пациентите бяха рестадирани на всеки 3 месеца (12 седмици) чрез използването на КТ и ПЕТ/КТ образни методи, което като честота покрива изискванията на световните стандарти за лечение и проследяване на пациенти със злокачествени заболявания (European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines, National Comprehensive

Cancer Network Guidelines). Подгруповият ни анализ показва, че локализацията на вторичните лезии с най-чест произход на засягане е черният дроб – 73,27% (n=74) следвана от групата на пациентите с метастази в бял дроб 20,79% (n=21) и такива със засягане на други органи – съответно 5,94% (n=6). Тези резултати са сходни със световните и потвърждават, че черния дроб и съответно белия дроб са основни места за метастазиране, типични за биологията на този вид карцином.

Анализът на данните свързани с преживяемостта без прогресия (PFS) показва, че групата на пациентите лекувани по протокол CAPEOX + Bevacizumab са на водещо място в нашето изследване с PFS 10,24 +/- 6,79 месеца. Получените от нас резултати са сходни и дори минимално превъзхождат част от данните в проучвания проведени и публикувани от други автори. По отношение на останалите режими прилагани като първа линия лечение получените от нас резултати в подгруповия анализ показват по-лоши показатели на PFS при сравнение с други проучвания. Пример за това са режимите FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOX + Bevacizumab, FOLFOX + Panitumumab и FOLFIRI + Bevacizumab.

По отношение на общата преживяемост (OS) подгруповият анализ показва, че пациентите лекувани с режима CAPEOX + Bevacizumab имат най-дълга средна обща преживяемост (OS) 27,6 +/- 15,08 месеца. Както и при анализа на PFS нашите резултати отново показват сходство с тези публикувани в литературата. За разлика от този вид терапия останалите режими отново показват по-лоши резултати спрямо други публикувани проучвания.

Всички тези резултати коментирани до момента могат да бъдат обяснени с по-късното диагностициране на пациентите в

българската кохорта поради липсата на ранен скрининг и съответно влошеното общо състояние на пациентите преди започване на активно противотуморно лечение. Въпреки това резултатите от нашето изследване не може да се интерпретират напълно адекватно поради факта, че изследването ни не обхваща всички пациенти, които са провели първа линия химиотерапия в клиниката, а само тези, които са се съгласили да бъдат част от проучването.

Във връзка с основната цел на десертационния труд проведохме сравнителен анализ алелното и генотипното разпределение на пет подбрани SNPs (rs7372209, rs2910164, rs2682818, rs353293 и rs322931) в гените на некодиращи РНК-и сред българска група здрави индивиди и характеризиранията по-горе пациентска кохорта. Данните за българските здрави контроли беше сравнен с данни за здрави индивиди от други расови кохорти, като сходство в алелната честота и генотипното разпределение на изследваните SNPs беше намерено само с други европейски кохорти.

Една от целите на нашето изследване беше да се установи асоциация между носителството на определен генотип/алел на изследваните пет SNPs в гените за микро-РНК-и и възможността да предскажат риск от развитие на КРК. За три от изследваните полиморфизми (rs2910164-miR-146a, rs2682818-miR-618 и rs353293-miR-143/miR-145) се доказва ролята им като потенциални диагностични биомаркери за КРК.

При rs2910164 - miRNA-146a хетерозиготните индивиди се характеризираха с нисък риск от развитие на заболяването в свърхдоминантния генетичен модел (GG+CC vs. CG) като тенденция за това се отчете и в кодоминантния модел (GG vs. CG). Потвърдихме значението на rs2910164-miRNA-146a, като

полиморфизъм, свързан с риск от развитие КРК. Публикуваните данни от проучванията на miR-146a rs2910164, miR-608 rs4919510 и miR-27a rs895819 при пациенти с КРК от различни раси и етноси показват, че GC и CC генотипите на rs2690164 са свързани с прогресия на заболяването при пациенти с КРК. При болни от кавказка и азиатска раса, които са носители на CG или GG rs4919510 генотипове след провеждане на химиотерапия имат висок PFS. За разлика от тях G алел на rs895819 се свързва с висок риск от развитие на КРК, повишен риск от метастазирание и по-висок TNM стадий поне за азиатците. Проучвания при пациенти от кавказка раса липсват при справка с литературните източници.

Ние не открихме този полиморфизъм да повлиява експресията на miR-146a за разлика от Santos и сътр. (2020), които доказват, функционална значимост на rs2910164 при пациенти с КРК. Изследователският екип установява, че експресията на miR-146a в туморните тъкани е значително по-висока при пациенти с GG генотип в сравнение с пациенти с GC или CC генотип.[188] С причинява ниски нива на експресия на miRNA-146a като това от своя страна води до намалена ефективност на инхибиране на неговите таргетни гени, които участват в туморогенезата. Въпреки това, в друго проучване клетъчни линии с генотип pre-miR-146a/C имат значително по-висока експресия на miR-146a от тези с pre-miR-146a/G. Авторите обясняват този различен резултат с подгрупови характеристики като етническа принадлежност и стадий на заболяването.

В последните години все повече проучвания изследват въздействието на SNPs в miRNAs гените на относително чувствителността към КРК, отколкото тези, които са ги изследвали като предиктори на клиничните резултати при пациенти с КРК. Въпреки малкия брой такива проучвания,

няколко SNPs могат да бъдат свързани с прогресията на КПК. Това са miRNA-146a rs2010164, miR-196a-2 rs11614913, miRNA-27a rs895819 и miRNA-423 rs6505162. За тези полиморфизми част от публикуваните данни показват потенциалната им връзка с по-лоши клинични резултати и/или повишен риск от метастази при пациенти с КПК.

При rs2682818 - miR-618 също се прояви като протективен по отношение на КПК и в двата хетерозиготни генетични модела - кодоминантен (CC vs. AC) и свръхдоминантен (CC+AA vs. AC) генетични модели при изследваните пациенти. В съответствие с нашите резултати през 2018г. Chen и сътр. демонстрират, че носители на AC генотип има по-нисък риск от развитие на КПК в доминантния модел (CC vs. AC+AA). Авторите обаче намират, че не само AC, но и хомозиготните носители на A алела са с изразен нисък риск от развитие на КПК, което при нашето проучване не беше доказано.

В резултат от анализите по настоящия дисертационен труд ние за първи път получим данни за асоциация на rs2682818 - miR-618 с риска от КПК при извадка от Кавказка раса и изследвахме за първи нивата на експресия miR-618 във връзка с наличието на определен генотип на rs2682818. Не беше установена промяна в нивата на miR-618 в циркулацията при наличие на определен rs2682818 алел или генотип при изследваните пациенти.

В настоящото изследване AA rs353293 генотипа беше установен като определящ висок риск от развитие на КПК в доминантния генетичен модел (AG+GG vs. AA). Нашите данни са отново първите за изследвана кавказка популация от КПК пациенти. Установихме, че намалените серумни нива miRNA-143 и miR-145 не са свързани с наличието на AA генотип.

През 2013г. Li и сътр. установяват значителна връзка на генотипа AA или алела A на полиморфизма rs353293 с повишения риск от развитие на КРК, но в азиатска кохорта. В това цитирано проучване липсват данни за изследване на нива на експресия на miR-143 или miR-145 във връзка с полиморфизма.

Друга задача в изследването беше да потърсим асоциация между носителството на определен генотип/алел на петте изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и и общата преживяемост при пациентите. Средната обща преживяемост (OS) на изследваните пациенти беше 24,17 месеца ($SD=\pm 15,01$), като 81 (80,2%) пациенти имаха OS под 36 месеца, а само 20 (19,8%) пациенти имаха OS над 36 месеца. За два от изследваните полиморфизми беше установена статистически значима асоциация с общата преживяемост на пациентите и съответно потенциалната им роля като биомаркери с прогностично значение за пациенти с КРК.

За първи път се докладва асоциация на TT rs7372209 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК от 26 месеца спрямо 19 месеца в сравнение с пациентите, носители на TC и CC генотипове. TT rs7372209 генотипът беше установен като по-често срещащ се при пациенти с десностранно локализиран карцином на дебелото черво, отколкото при пациенти с левостраненна локализация и карциноми на ректума. Защо генотип асоцииран в нашата кохорта с по-дълга OS е преобладаващ в по-агресивната форма на КРК е факт, на който предстои да бъде търсено обяснение.

Въпреки, че rs7372209 не е доказано асоцииран с риск от КРК, включително и в нашето изследване има публикации, които демонстрират предиктивно значение на полиморфизма за заболяването. През 2011г. Won и сътр. откриват значителна корелация между rs7372209 и туморния отговор, времето до

прогресия (TTP) при пациенти с метастатичен колоректален рак, които са преминали лечение с 5-флуороурацил и иринотекан. Авторите показват, че генотиповете CC и CT са свързани с по-дълги TTP и ORR (общ процент на отговор) в сравнение с TT генотипа.

Хомозиготните по А алела (AA) на rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145 пациенти имаха също по-дълга средна обща преживяемост (OS) - 21,9 месеца в сравнение с 16,6 месеца обща преживяемост при пациентите, носители на G алела (AG + GG). Получените от нас резултати за прогностичното значение на rs353293, както и на rs7372209 не могат да се сравнят с други научни изследвания.

За първи път при пациенти с КРК беше изследван и rs322931-miR-181b. За него не установихме асоциация с риск от заболяването нито отношение към прогнозата. Не можем да твърдим, че повлиява и експресията на miR-181b. Явно изследваният полиморфизъм няма отношение към заболяването.

В хода на изследването беше оценено нивото в плазмата при пациенти и здрави контроли на миРНК-ите в чийто гени са локализирани изследваните в проекта полиморфизми. Три от тях показаха различна експресия между здравите контроли и селектираните болни - miRNA-26a-1, miRNA-618 и miRNA-181b.

При cut off >0,823 беше установено, че miRNA-26a-1 може да разграничи пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли – AUC=0,831 с 80,81% чувствителност и 80,56% специфичност. Новопубликувано проучване проведено от Hishida et al. през 2021г. показва, че miR-26a демонстрира добра предиктивна стойност по отношение на честотата на авансирани случаи на КРК с AUC=0,840 (чувствителност 100,0% и специфичност

60,0%). През 2020г. друго проучване проведено от Bader El Din et al. изследва диагностичната стойност на 84 миРНК-и сред пациенти с КРК в Египет. Получените резултати показват, че нивото на експресия на miR-26a е значително по-високо при пациенти с КРК в сравнение със здрави индивиди - AUC= 0,918 (чувствителност 77,6% и специфичност 96,2%) и така тази миРНК може да бъде разглеждана като биомаркер в изследваната кохорта.

По отношение на miRNA-618 нашето проучване установи, че може да разграничи също пациентите с метастатичен КРК от здрави контроли AUC=0,791 с 79,81% чувствителност и 72,22% специфичност. Свърхекспресията на miR-618 намалява сигналния път на PI3K/Akt, инхибира TGF- β или отрицателно регулира нивото на транскрипция на TGF- β 2. Пътят на PI3K/Akt е отговорен за клетъчните дейности като клетъчен растеж, пролиферация, диференциация и миграция и е основен път на оцеляване, който се активира при редица злокачествени заболявания - включително КРК. В проучване проведено от Zhu et al. се установява, че метастатичните колоректални тумори имат по-висока честота на експресия на PI3K в сравнение с първичните лезии. TGF- β инхибира пролиферацията на чревните епителни клетки и действа като туморен супресор в ранните етапи на прогресия на рака. По време на прогресията на тумора, TGF- β може да превключи функцията си от тумор-супресираща към тумор-промотираща. Повишените нива на TGF- β в първичния тумор и в плазмата на пациенти с КРК са свързани с по-висока честота на развитие на метастази и намалена преживяемост. В допълнение, ако miR-618 проявява подобни инхибиращи ефекти върху пътя на PI3K/Akt или/и върху TGF- β при пациенти с мКРК, това може да обясни, че miR-618 действа като тумор-супресорна miRNA и ниските му нива предполагат прогресия на заболяването.

Изследваната експресия на miRNA-181b в нашето изследване също беше в различна степен при здрави индивиди и пациенти. При cut off >0,944 разграничението на двете кохорти беше оценено с 81,93% чувствителност и 82,05% специфичност. Семейството на miR-181 има четири члена: miR-181a, miR-181b, miR-181c и miR-181d. Съществуват данни, че miR-181b има прогностична стойност както при пациенти с първични мозъчни тумори така и при пациенти с рак на гърдата. Няколко проучвания посочват, че miR-181b има връзка и с прогнозата при болни с КРК - по-високата експресия на тази миРНК е свързана с по-лоша прогноза. Обратно на тези публикации съществува друго проучване, чийто анализи показват, че експресията на miR-181b не е свързана с прогнозата на пациенти с КРК.[257] При cut off >1.186 miRNA-146a може да разграничи пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли относително ниски чувствителност и специфичност, 68,42% и 40,26% респективно.

В научната литература съществуват повече проучвания за влиянието на SNP в гените на миРНК и риска за развитие на КРК за разлика от тези, които ги изследват по отношение на предиктивната им стойност. Въпреки малкия брой такива проучвания, няколко различни от нашето проучване функционални полиморфизми могат да бъдат свързани с прогресията на КРК. Това са - miR-196a-2 rs11614913, miRNA27a rs895819 и miRNA-423 rs6505162. За всички тях има данни, които показват асоциирането им с по-лоши резултати и/или повишен риск от метастазиране при тази кохорта болни.

Голяма част от публикуваните проучвания, които търсят връзка между SNP в гените за некодиращи РНК-и и КРК са само описателни и не представят функционални експерименти. Някои от тях дори не оценяват нивата на съответната миРНК, което затруднява оценката на функционалния ефект на SNP. Възможно

е полиморфизмът да има неизвестни таргети на иРНК, които могат да активират или инхибират различни пътища на туморогенеза в клетката и са различни от известните ни до момента.

Друг факт, който трябва да бъде отбелязан по отношение на SNPs в гените на миРНК-ите е че различната честота може да варира между различните раси и етноси. Повечето от публикуваните проучвания по този въпрос включват основно азиатски кохорти. По тази причина необходимостта от повече изследвания сред бялата раса, които да изследват връзката SNP - миРНК-и биха били от съществено значение, за да се определи дали някои генетични варианти са специфични само за конкретната раса/етническа група или те като цяло са общи за всички.

7. Заключение

В хода на нашето проучване сравнихме алелните и честоти и генотипното разпределение на пет подбрани SNPs (rs7372209, rs2910164, rs2682818, rs353293 и rs322931) в гените за миРНК-ите сред българска група здрави индивиди с други здрави кохорти. Анализът на нашите резултати показва сходно честотно разпределение на изследваните полиморфизми в българските индивиди с това при европейските кохорти. Установихме асоциация с риска от развитие на КРК за три от изследваните полиморфизми в българската кохорта пациенти с метастатичен КРК (rs2910164 в гена за miRNA-146a, rs2682818 в гена за miR-618 и rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145). За два от изследваните полиморфизми беше установена статистически значима асоциация с общата преживяемост на пациентите (генотип ТТ за полиморфизма rs7372209-miR-26a-1 и генотип АА за rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145).

В хода на изследването беше оценено и нивото в плазмата при пациенти и здрави контроли на миРНК-ите в чийто гени са локализирани изследваните в проучването полиморфизми. Четири от тях показаха различна експресия между здравите контроли и селектираните болни с висока специфичност и чувствителност - miRNA-26a-1, miR-146a, miRNA-618 и miRNA-181b.

Нашето изследване е първото в България, което проучва и доказва асоциация на единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-и като потенциални биомаркери, които биха могли предскажат риск от развитие на болестта и имат потенциална връзка с прогнозата на КРК.

Трудно е да се каже дали анализът на SNP в гените за некодиращи РНК-и може да бъде включен в рутинната практика и как потенциално да се комбинира с други скринингови тестове за КРК поради ниската си инвазивност и относително лесното си изпълнение като методика. Поради тази причина нуждата от проучвания, обхващащи по-голям брой пациенти от различни раси и етноси биха били по-представилни относно потенциалната роля на SNP в гените за некодиращи РНК-и като биомаркери при пациенти с КРК в метастатичен стадий.

8. Изводи

1. Установено е сходно честотно разпределение на изследваните полиморфизми в здрави индивиди от българската и други европейски кохорти.
2. Хетерозиготните индивиди с rs2910164 - miRNA-146a се характеризират с нисък риск от развитие на заболяването в свърхдоминантния генетичен модел.
3. Полиморфизмът rs2682818 - miR-618 също се проявява като протективен по отношение на КРК и в двата хетерозиготни генетични модела - кодоминантен и свърхдоминантен.
4. Носителите на доминантния А алел в хомозиготно състояние с rs353293 - miRNA-143/145 се характеризират с висок риск от развитие на КРК.
5. Носителите на генотип ТТ с rs7372209 имат значително по-дълга средна обща преживяемост (OS) в сравнение с пациентите, носители на ТС и СС генотипове.
6. Хомозиготните по А алела (AA) на rs353293 - miRNA-143/145 пациенти имат също по-дълга средна обща преживяемост (OS) в сравнение с пациентите носители на G алела.
7. ТТ rs7372209 генотипът е оценен като рисков фактор за развитие на тумор в десен колон.
8. Изследванията на нивата на miRNA-26a-1, miRNA-146a, miRNA-618 и miRNA-181b в плазмата имат диагностично значение, защото разграничават пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли.

9. Изследваният за първи път при пациенти с КРК rs322931–miR-181b полиморфизъм не се асоциира с риска и прогнозата на заболяването.

10. Нивата в плазмата на изследваните шест миРНК-и при пациенти с метастатичен КРК не се повлияват от носителството на определен генотип при нито един от включените в изследването полиморфизми.

9. Приноси на дисертационния труд

1. За първи път в България са получени данни за алелната честота и генотипното разпределение на полиморфизми в гените за некодиращи miRNAs сред здрави индивиди.
2. За първи път в България са получени данни за ролята на rs2910164–miR-146a, rs2682818–miR-618 и rs353293–miR-143/miR-145 като потенциални диагностични биомаркери за КРК пациенти.
3. За първи път в България са получени данни за ролята на rs7372209–miR-26a-1 и rs353293–miR-143/miR-145 като потенциални биомаркери с прогностично значение за КРК пациенти.
4. За първи път при пациенти с КРК е изследван rs322931–miR-181b.
5. За първи път са получени данни, потвърждаващи, че А rs353293 алела в хомозиготно състояние е рисков фактор за КРК и в кавказка кохорта.
6. За първи път са получени данни, потвърждаващи, че АС rs2682818 генотипа е свързан с нисък риск от развитие на КРК и в кавказка кохорта.
7. За първи път се докладва асоциация на ТТ rs7372209 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.
8. За първи път се докладва асоциация на АА rs353293 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.

9. Потвърдено е значението на rs2910164-miRNA-146a, като полиморфизъм, свързан с риск от развитие КРК.

10. За първи път са изследвани нивата на експресия miR-26a-1, miR-618, miR-181b във връзка с наличие на определен полиморфизъм (rs7372209, rs2682818 и rs322931, съответно).

10. Научни публикации и съобщения свързани с дисертационния труд

1. „Serum level of miRNA-143 as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer and synchronous metastatic disease“

Автори: Z Mihaylova, D Ivanova, G Mihaylova, O Tasinov, N Nazifova-Tasinova, D Petkova, A Garev, **R Manev**, N Conev, I Donev, M Radanova

Дата на публикуване: 2019/7/1

Издание: реферирано издание с импакт фактор - *Annals of Oncology*

2. „Association of rs363293 single nucleotide polymorphism in promoter region of miRNA-143/145 with susceptibility to colorectal cancer and with patients' outcome“

Автори: GM Mihaylova, D Ivanova, **R Manev**, O Tasinov, N Nazifova-Tasinova, V Petrova, D Petkova-Nelova, Z Mihaylova, N Conev, I Donev, M Radanova

Дата на публикуване: 2019/11/1

Издание: реферирано издание с импакт фактор - *Annals of Oncology*

3. „Association of rs7372209 single nucleotide polymorphism in gene for miRNA-26a-1 with tumor localization and disease outcome in patients with colorectal cancer from Bulgaria.“

Автори: Galya Mihaylova, Desislava Ivanova, Oscan Tasinov, Neshe Nazifova-Tasinova, Veneta Petrova, Pavel Pavlov, **Rostislav Manev**, Milko Mirchev, Nikolay Vladimirov Conev, Zhasmina Mihaylova, Ivan Donev, Maria Radanova

Дата на публикуване: 2020/5/20

Издание: реферирано издание с импакт фактор - Journal of Clinical Oncology

4. “High expression levels of circulating miRNA-618 and miRNA-203a-3p are associated with prolonged survival in patients with metastatic colon cancer”

Автори: M Radanova, D Ivanova, G Mihaylova, O Tasinov, N Nazifova-Tasinova, **R Manev**, P Pavlov, V Petrova, D Petkova, M Mirchev, K Bratoeva, N Conev, Z Mihaylova, I Donev

Дата на публикуване: 2020/7/1

Издание: реферирано издание с импакт фактор - Annals of Oncology

5. “Evaluation of genetic variants in miR-146-a, miR-618, and miR-181b as risk factors of colorectal cancer in Bulgarian patients”

Автори: M Radanova, GM Mihaylova, D Ivanova, O Tasinov, N Nazifova-Tasinova, **R Manev**, N Conev, Z Mihaylova, I Donev

Дата на публикуване: 2020/10/1

Издание: реферирано издание с импакт фактор - Annals of Oncology

6. “Plasma levels of hsa_circ_0001445 and hsa_circ_0007915 may indicate the presence of metastatic disease in patients with colorectal cancer”

Автори: M Radanova, G Mihaylova, O Tasinov, D Ivanova, N Nazifova-Tasinova, **R Manev**, A Salim, M Nikolova, N Conev, Z Mihaylova, I Donev

Дата на публикуване: 2021/10/1

Издание: реферирано издание с импакт фактор - *Annals of Oncology*

7. “ Key Apoptosis Signaling Pathways In Malignant Diseases”

Автори: Teodorika Panayotova, Dragomir Stoyanov, **Rostislav Manev**, Margarita Maneva, Boryana Stefanova, Eleonora Dimitrova, Nikolay Tsonev

Дата на публикуване: 2021/12/30

Издание: *Varna Medical Forum*

8. “Single Nucleotide Polymorphisms in microRNA Genes and Colorectal Cancer Risk and Prognosis”

Автори: M Radanova, M Levkova, G Mihaylova, **R Manev**, M Maneva, R Hadgiev, N Conev, I Donev

Дата на публикуване: 2022/01

Издание: реферирано издание с импакт фактор - *Biomedicines*

9. “3-year clinical experience in patients with unresectable metastatic colon cancer received first-line of chemotherapy”

Автори: **Rostislav Manev**, Margarita Maneva, Zhasmina Mihaylova, Nikolay Conev

Дата на публикуване: submitted 02/03/2022 (предстоящо публикуване)

Издание: *Scripta Scientifica Medica*

Благодарности:

Специални благодарности на научните ми ръководители:

Доц. д-р Николай Цонев, д.м.

Доц. Мария Раданова, д.б.

Специални благодарности на:

Проф. д-р Иван Донев, д.м.

Проф. д-р Жасмина Михайлова, д.м.

Доц. д-р Елеонора Димитрова, д.м.

м.с. Марияна Георгиева

На екипа на Клиниката по медицинска онкология при УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, на пациентите, които дадоха съгласие за участие в изследването и най-вече на семейството ми за подкрепата и търпението!!!