

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



СЕКЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

СВЕПЛА ТЕОРТИЕВА АНТЕЛОВА

МУТАЦИОНЕН СТАТУС И ПРОФИЛ НА ЕПИГЕНЕТИЧНО ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ В *ATM* И *CHEK2* ГЕНИТЕ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С РАК НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА. АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКОТО ЛЕЧЕБНО РАСТЕНИЕ *TRIBULUS TERRESTRIS L.*

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд
за присъждане на образователната и научна степен “доктор”
Научна специалност: 01.06.06. Генетика**

София, 2012

Дисертацията е написана на 190 страници и съдържа 19 таблици и 50 фигури. Библиографската справка обхваща 523 литературни източници, от които 3 на кирилица и 520 на латиница.

Експерименталната работа е проведена в секция по Молекулярна генетика при Институт по Физиология на Растенията и Генетика, БАН, София.

Изследванията са финансирани от национални проекти на Министерството на Образованието Младежта и Науката по програми: „Млади учени” МУ-К 1305/03, „Геномика” Г-01-04/04 и „Тематичен конкурс” ДО 02-310/08.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита от разширен научен състав към секция по Молекулярна генетика при Институт по Физиология на Растенията и Генетика, Българска Академия на Науките, на заседание, проведено на 24.09.2012 г.

Автор: **гл. ас. СВЕТЛА ГЕОРГИЕВА АНГЕЛОВА**

Заглавие: **МУТАЦИОНЕН СТАТУС И ПРОФИЛ НА ЕПИГЕНЕТИЧНО ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ В *ATM* И *SNEK2* ГЕНИТЕ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С РАК НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА. АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКОТО ЛЕЧЕБНО РАСТЕНИЕ *TRIBULUS TERRESTRIS L.***

Заседанието на Научното жури за публичната защита на дисертационния труд ще се състои на _____ от ч. в заседателната зала на Институт по Физиология на Растенията и Генетика, гр. София, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет.1

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Институт по Физиология на Растенията и Генетика, гр. София, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



СЕКЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

СВЕПЛА ТЕОРТИЕВА АНТЕЛОВА

МУТАЦИОНЕН СТАТУС И ПРОФИЛ НА ЕПИГЕНЕТИЧНО ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ В *ATM* И *CHEK2* ГЕНИТЕ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С РАК НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА. АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКОТО ЛЕЧЕБНО РАСТЕНИЕ *TRIBULUS TERRESTRIS L.*

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователната и научна степен “доктор”

Научна специалност: 01.06.06 Генетика

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:

гл. ас., д-р Мария Кръстева

РЕЦЕНЗЕНТИ:

Проф. д-р Любомир Стоилов

Проф. д-р Димитър Цингилев

София, 2012

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

РМЖ - Рак на Млечната Жлеза

ТСГ – Туморно Супресорни Гени

СрG – Цитозин Гуанин Динуклеотид

A-T - **A**taxia **T**elangiectasia (Атаксия-Телангиектазия)

ATM – **A**taxia **T**elangiectasia **M**utated gene (**ATM** ген)

BRCA1 - **B**Reast **C**Ancer susceptibility gene**1** (**BRCA1** ген)

BRCA2 - **B**Reast **C**Ancer susceptibility gene**2** (**BRCA2** ген)

CHEK2 – Cell cycle **C**HECKpoint **K**inase **2** gene (**CHEK2** ген)

HER2 – **H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor **2** (рецептор 2 за човешки епидермален растежен фактор)

PCR – **P**olimerase **C**hain **R**eaction - (Полимеразна Верижна Реакция)

P53 – tumor **P**rotein **53**

PI3K – **P**hospho**I**nositide **3**-**K**inase (Фосфатидил Инозитол 3 Киназа)

ER – **E**strogen **R**eceptor (Естрогенен рецептор)

PR – **P**rogesteron **R**eceptor (Прогестеронен рецептор)

SSCP – **S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism - (Полиморфизъм в конформацията на едноверижни нуклеинови киселини)

ТТ - *Tribulus Terrestris L.*

sТТ- сапонинова фракция на *Tribulus Terrestris L.*

I. УВОД

През последните две-три десетилетия се установява постоянна тенденция за увеличаване на заболяемостта и смъртността от онкологични заболявания в целия свят. В България най-разпространеното злокачествено заболяване сред жените е ракът на млечната жлеза (РМЖ). Въпреки успехите в областта на клиничното поведение и генетиката, заболяването е медико-социален проблем с особена значимост за нашата страна.

Предположението, че в етиологията на раковите заболявания при човека участват както конститутивни, така и придобити генетични фактори, вече е потвърдено. По тази причина в Националната стратегия за подобряване на онкологичната помощ като акцент е заложен въпросът за изясняване на молекулярните механизми на канцерогенезата.

Ракът на млечната жлеза се определя като полигенно заболяване със сложна мултифакторна природа. Канцерогенетичният процес е многостъпален, свързан с натрупване на генетични и/или епигенетични нарушения в редица гени с регулаторна роля в клетъчния цикъл – туморно супресорни гени и прото-онкогени. Съгласно етиологията на заболяването се различават три форми на РМЖ: спорадична (около 70% от случаите), фамилна (около 20%) и наследствена (приблизително 5-10%). Понастоящем, по безспорен начин е установено, че в патологията на фамилната форма участват *BRCA1/2* гените. Въпреки интензивните изследвания за най-широко застъпената форма на заболяването – спорадичната, все още няма еднозначно дефиниран молекулярно-генетичен профил, обуславящ туморната инициация и прогресия. В клинично отношение РМЖ показва силно изразена вариабилност в клинично-патологичните характеристики, което вероятно се дължи на различия в природата и молекулярните механизми на инициращите фактори.

С цел подобряване на диагностичното и терапевтично поведение, усилията на специалистите от медико-генетичните среди са насочени към анализ и оценка на клиничното значение и прогностична стойност на асоциираните със заболяването гени. Счита се, че подобни изследвания ще допринесат за идентифициране на нови, маркерни за заболяването гени и ще подпомогнат молекулярната класификация на туморите на гърдата.

В дисертационния труд са анализирани мутационният статус и профилът на епигенетично промоторно метилиране на два туморно супресорни гени с регулаторна роля в клетъчната сигнална трансдукция - *ATM* и *CHEK2*. Потърсена

е връзка между аберантния им статус, клиничната изява и прогнозата на РМЖ. Получените резултати показват, че в супресията на изследваните гени преимуществено участват генетични изменения (мутации), като техният спектър е специфичен при българските пациенти. Данните за молекулярно-генетичния статус на *ATM* и *CHEK2* гените са първите до момента във връзка с РМЖ при българските болни. Те допринасят за оценката на клиничното и прогностично значение на тези гени за патогенезата на рака на гърдата.

Наред с конвенционалните подходи и съвременната таргетна терапия в онкологичната практика, като съпътстващо лечение все по-широко приложение намират медикаменти, чиито активни компоненти са или наподобяват природни продукти или лечебни растения. В тази връзка, в дисертационния труд е анализирана антитуморната активност на българското лечебно растение *Tribulus terrestris L (TT)* по отношение на туморни клетки от рак на млечната жлеза. Изследванията са в своя начален етап и дават основание за по-задълбочен анализ на антитуморната активност и фармакологичен потенциал на билката.

Получените в дисертационния труд данни имат научен принос и допълват генетичната характеристика на българската популация. Молекулярно-генетичното характеризирание на отделните пациенти се приема като обещаващ подход за поставяне на индивидуална генетична диагноза и провеждане на персонализирана терапия на рака в бъдеще.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Изследванията, реализирани в настоящия дисертационен труд, се базират на следните работни хипотези:

1. Туморно супресорните гени *ATM* и *CHEK2* са ангажирани в етиологията на рака на млечната жлеза и в тяхното инактивиране участват генетични и епигенетични механизми. Мутационните спектри на *ATM* и *CHEK2* са специфични за болните от българската популация.

Хипотезата се основава на представата ни за РМЖ като генетично обусловено, полигенно заболяване. В тази връзка може да се допусне участие в канцерогенетичния процес (с различен принос и значение) на редица неизучени все още или неизвестни туморно супресорни гени и/или прото-онкогени. Понастоящем единствените специфично асоциирани с РМЖ гени са *BRCA1* и *BRCA2*. Има данни, че други гени със сходна функционална принадлежност като *p53*, *PIK3CA*, *CHEK2*, *ATM*, *HER2*, са ангажирани в патогенезата на различни злокачествени заболявания, в това число и РМЖ. Мутационният статус на *p53* и *PIK3CA* и степента на експресия на *HER2* при рака на гърдата са подробно изучени. Изследванията върху честотата и типа на спорадичните изменения в *ATM* и *CHEK2* туморно супресорните гени при болни с различни злокачествени заболявания, включително РМЖ, обаче са ограничени. Мутационните спектри на *ATM* и *CHEK2* гените варират в популационен аспект. Тяхната специфика се обуславя от характера и силата на взаимодействието на факторите на средата. До този момент няма данни за спектъра на генетичните изменения и статуса на епигенетично метилиране в промоторната област на *ATM* и *CHEK2* гените при български пациенти с РМЖ.

2. Клинико-патологичните и молекулярно-генетични характеристики на болните корелират в различна степен със статуса на *ATM* и *CHEK2* гените. Мутантният статус има прогностична стойност по отношение на общата преживяемост и изхода от заболяването.

Съществува връзка между генетичните/епигенетичните изменения в *ATM* и/или *CHEK2* гените с клинико-патологични и молекулярно-генетични характеристики на болните. Данните за прогностичната стойност на тези два гена са неясни и спорни. По наше знание, до този момент прогностичното значение на аберантния *ATM* и *CHEK2* статус при български пациенти с РМЖ не е изучено.

3. Българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L. има селективна антитуморна активност към клетъчни линии от рак на млечната жлеза.

Основна цел в антитуморната терапия е да се намерят активни съставки, които селективно да потискат растежа на туморните клетки. В тази връзка активно се проучва антитуморната активност на природни продукти и лечебни растения с доказани фитохимични свойства и фармакологично значение. Обещаващ кандидат е растящата в България билка *Tribulus terrestris* L., която е част от състава на търговския продукт „Трибестан” (Sopharma, Joint Stock Co., Bulgaria) и присъства във съвременния формат на българската Фармакопея. Активните компоненти на *Tribulus terrestris* L. са фуростанолови и спиростанолови сапонини, които принадлежат към класовете растителни сапонини с най-висока цитотоксична и антипролиферативна активност. До този момент няма данни за антитуморна активност на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris* L. от българската растителна популация. Не е изучен и апоптотичният потенциал на това растение.

Поставени бяха следните цели:

1. Да се установи честотата и спектърът на генетичните изменения и статусът на метилиране в промотора на туморно супресорните гени *ATM* и *CHEK2* при български пациенти с РМЖ.
2. Да се изследва прогностичното значение на *ATM* и *CHEK2* гените за РМЖ.
3. Да се анализира антитуморната активност и апоптотичният потенциал на тотален екстракт и сапонинова фракция от българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L. върху клетъчна линия от РМЖ.

За реализирането на поставените цели бяха формулирани следните по-важни задачи:

1. Да се сформира представителна група от български пациенти с РМЖ и да се направи регистър с клинично-патологичните им показатели съгласно болничното им досие. Пациентките да бъдат проследени за минимален период от 5 години. Да се създаде банка от ДНК, изолирана от туморни проби на болните.
2. Да се направи скрининг за генетични изменения в *ATM* и *CHEK2* гените и да се установи тяхната честота и спектър при болните от РМЖ. Да се анализира статусът на метилиране в промотора на тези гени.
3. Да се направи сравнителен анализ между аберантния статус на *ATM* и *CHEK2* и клинично-патологичните и молекулярно-генетични показатели на

болните. Да се оцени общата преживяемост и относителният риск за летален изход.

4. Да се направи сравнителен анализ на преживяемостта и да се оцени апоптотичният потенциал на нормална и туморна клетъчни линии след третиране с тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris L.*

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Пациенти и Материали

3.1.1. Пациенти с РМЖ

В изследването са включени 145 пациентки (всички от българска популация, на възраст от 29 до 88 години) с първичен инвазивен РМЖ, провели хирургично лечение в Специализирана Болница за Активно Лечение по Онкология (СБАЛО), гр. София, за периода между 2000 и 2003 година. Болните не са родствено свързани. Клиничните характеристики са определени съгласно приетата от UICC (Union International Contre le Cancer) класификация по TNM (Таблица 1).

Таблица 1. Клинични показатели и терапия на пациентите с РМЖ

Размер на тумора (T)	T1	65 (45%)
	T2	62 (43%)
	T3	7 (5%)
	T4	11 (7%)
Степен на малигненост (G)	G1	6 (4%)
	G2	103 (71%)
	G3	36 (25%)
Лимфен статус (N)	N+	53 (37%)
	N-	92 (63%)
Хистологичен тип	Дуктален	130 (90%)
	Лобуларен	15 (10%)
Естроген рецепторен статус (ER)	ER+	81 (56%)
	ER-	64 (44%)
Прогестерон рецепторен статус (PR)	PR+	81 (56%)
	PR-	64 (44%)
HER2 статус	HER2+	21 (14%)
	HER2-	78 (54%)
	неизвестен	46 (32%)
Средна възраст (мин.-макс.) год.		54,4 (29-88)
Лъчетерапия	+	115 (79%)
	-	30 (21%)
Химиотерапия	+	87 (60%)
	-	58 (40%)
Хормонална терапия	+	114 (79%)
	-	31 (21%)

Всички пациентки бяха регистрирани с идентификационен номер и инициал (форма, гарантираща запазване на анонимността им) в създадена за целите на анализа информационна база (регистър) и проследени за вторични заболявания.

Туморни проби от болните ни бяха предоставени от доц. д-р Иван Гаврилов, началник на Мамологично отделение при СБАЛО, гр.София. Информация за клиничния статус на болните и проведената им терапия ни беше предоставена от д-р Мария Начева - СБАЛО, гр. София, а информация за смъртните случаи - от Националния осигурителен институт.

От всички пациенти беше получено информирано съгласие за включването им в анализа.

3.1.2. Клинично здрави лица - контроли

Като контролна група в изследването бяха включени 50 клинично здрави лица, жени от контингент кръводарители, на възраст от 25 до 62 години. Кръвни проби от тези лица бяха използвани като отрицателни контроли при PCR-SSCP анализа, както и при анализа на статуса на промоторно метилиране (MSP и Methylation-sensitive SSCP).

3.1.3. Клетъчни линии

В експерименталната работа бяха използвани две клетъчни линии – нормална (MCF10A) и ракова от РМЖ (MCF7). MCF7 линията е от плеврален ексудат на пациентка с метастатичен РМЖ. MCF10A е безсмъртна клетъчна линия от нормална гръдна епител. MCF10A клетките притежават характеристиките на нормалната гръдна епител и не са туморогенни в имунопотиснати мишки.

3.1.4. *Tribulus terrestris L.*

Едногодишно тревисто растение от семейство *Zygophyllaceae*. Използва се широко в народната медицина. Вирее върху пясъчливи и сухи почви. Разпространено е в сухи климатични райони на света. В България билката се среща в южните региони, като в югоизточните е с най-богат състав.

3.2. Методи

3.2.1. Изолиране на ДНК

По стандартна Proteinase K/Phenol методика беше изолирана високомолекулна геномна ДНК от замразени туморни проби на пациентките с РМЖ и от венозна кръв на клинично здравите лица ^(Ahmad NN et al., 1995). За изолиране на ДНК от клетки (линии MCF7 и MCF10A) беше използван DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) като са следвани предписанията на производителите.

3.2.2. Култивиране на клетъчни линии.

За линията MCF7 беше използвана клетъчна среда, съдържаща: ЕМЕМ, 10% фетален телешки серум (FBS) и 1% натриев пируват, а за линията MCF10A –

DMEM, 5% фетален телешки серум (FBS), 1% натриев пируват, 20ng/ml човешки епидермален растежен фактор (hEGF), 10µg/ml инсулин и 0.05mM хидрокортизон.

3.2.3. Получаване и пречистване на екстракти и фракции от *Tribulus terrestris L.*

Използвани бяха тотален екстракт и сапонинова фракция на ТТ. Подборът на растителния материал, екстракцията и фракционирането бяха извършени от Валентин Лозанов, катедра „Биохимия“, Медицински Университет, София.

3.2.4. Методи за анализ на неизвестни мутации - PCR – SSCP – секвенционен анализ

3.2.4.1. Полимеразна верижна реакция – PCR

ATM туморно супресорният ген е един от най-големите човешки гени – състои се от 66 екзони, 64 от които кодиращи. Чрез PCR бяха анализирани общо 17 от кодиращите екзони на *ATM* гена (15, 30, 36, 54, 62, 65, 51, 5, 10, 19, 24, 31, 33, 39, 49, 52, 59) и всички 14 кодиращи екзони на *CHEK2* гена. Оптималните условия за провеждане на PCR реакцията на *ATM*, както и последователността на олигонуклеотидните праймери ни бяха предоставени от проф. Patrick Concannon (University of Washington School of Medicine). Нуклеотидната последователност на праймерите и някои от специфичните условия за провеждане на амплификацията на *CHEK2* гена бяха взимствани от Liu Wei-dong ^(Liu WD et al., 2007).

3.2.4.2. Агарозна ДНК електрофореза

PCR продуктите бяха анализирани на 2% агарозна гел-електрофореза в 1x TAE буфер (50x: 0.04M Tris-ацетат, 0.002M EDTA) и детектирани под UV.

3.2.4.3. Анализ на конформациите на едноверижните нуклеинови киселини (SSCP)

За провеждане на SSCP анализа бяха използвани две разделящи системи: Appalex и Phast Gel Single Sided Vertical Electroforesis (Owl Scientific, Inc). Пробите, съдържащи 7µl от анализираниите PCR продукти бяха денатурирани, охладени и разделени в предварително приготвен полиакриламиден гел. Оптималната концентрация на акриламида в гела (6-14%) беше установена експериментално. Визуализирането се осъществяваше чрез оцветяване със сребърен нитрат.

3.2.4.4. Пречистване на амплификационни продукти

За пречистване на PCR продуктите с аберантен SSCP профил бяха използвани GFX PCR DNA, Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), като бяха следвани предписанията на производителите.

3.2.4.5. Секвенционен анализ

Намножените и пречистени PCR продукти с аномален SSCP профил бяха секвенирани в СБАЛАГ "Майчин Дом" - център по "Молекулна медицина" и в Сеул от Macrogen Inc (ABIPrism™ 310/ ABI Prism 3130xl/ ABI3730XL). Секвенционните реакции бяха проведени и с правия, и с обратния праймер. За обработка на получените данни беше използвана софтуерна програма *Chromas*.

3.2.4.6. Клониране на PCR продукти в pMOSBlue вектор

Клонирането на амплифицираните фрагменти с мутации в *ATM* гена беше извършено с помощта на pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit (Amersham Biosciences) въз основа на протокола, препоръчан от производителите.

3.2.5. Методи за анализ на промоторно метилиране

3.2.5.1. Модифициране на ДНК с натриев бисулфит. За конверсия на ДНК беше използван EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research).

3.2.5.2. Метилационно специфичен PCR (MSP)

MSP анализа на *ATM* гена беше извършен чрез специфични двойки праймери от два типа, амплифициращи промоторния участък от гена, съдържащ CpG райони: U (unmethylated, хибрилизират с ДНК с нормален профил на метилиране) и M (methylated, хибрилизират с хиперметирана ДНК). Праймерите бяха взимани от Ai L ^(Ai L et al., 2004). За MSP анализа на *CHEK2* бяха подбрани 4 двойки праймери (MIP2, MIP3, MIP4 и MIP5), покриващи CpG местата на далечния (Д) CpG остров и една двойка (MIP1), покриващи близкия (Б) CpG остров (Фиг. 1). Нуклеотидната последователност на праймерите беше взимана от Louise H. Williams ^(Williams LH et al., 2006)



Фигура 1. Локализация на *CHEK2* CpG островите. Далечният (Д) е локализиран на -6000 до -8000 б.дв.от инициращия транслацията ATG сайт. Близкият (Б) е разположен в областта -300- 600 б.дв от ATG.

3.2.5.3. Анализ на амплификационните продукти на агарозна гел електрофореза

PCR продуктите от MSP анализа на *ATM* гена бяха анализирани на 2% агарозна гел-електрофореза и 0.5µg/ml етидиев бромид за визуализация под УВ.

3.2.5.4. Метилационно-чувствително SSCP

Методът беше приложен за анализ на *CHEK2* гена. Продуктите, получени след метилационно-специфичната амплификация, бяха денатурирани и разделени в полиакриламидна гел електрофореза (12-14%) и визуализирани чрез оцветяване със сребърен нитрат.

3.2.6. Статистически анализ

За оценка на прогностичното значение на *ATM* и *CHEK2* гените бяха приложени Fisher's exact тест и Chi-squared тест. Общата преживяемост (ОП/OS) беше определена по метода Kaplan-Meier. За изчисление на относителния риск (Hazard Ratio, HR) беше приложен еднофакторен и мултифакторен регресионен анализ (Cox proportional hazards regression model). Рискът за летален изход беше оценен при 95% интервал на достоверност (95% CI). Статистическата обработка беше извършена с помощта на SPSS софтуерен пакет (SPSS Inc., Chicago, USA).

3.2.7. Методи за оценка на антитуморния ефект и апоптотичната активност на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris L.*

3.2.7.1. МТТ анализ.

Относителната клетъчна преживяемост на третираните с тотален екстракт или сапонинова фракция на ТТ клетки беше анализирана с помощта на МТТ метод. За антитуморната активност се съди по IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) - концентрацията на активното вещество, необходима за редуциране на преживяемостта до 50%.

За достоверност на получените резултати от МТТ анализа всеки експеримент беше проведен трикратно, а всяка от анализираните концентрации присъстваше в три повторения.

3.2.7.2. Анализ на фрагментацията на ДНК. Фрагментацията на ДНК, получена от третираните с тотален екстракт или сапонинова фракция на ТТ туморни и контролни клетки, беше анализирана в 1,5% агарозен гел (50V за 45 мин.).

3.2.7.3. Флуоресцентно - микроскопски анализ. Оценката на морфологичните изменения в третираните туморни клетки с тотален извлек и сапонинова фракция от ТТ беше направена чрез въздействие с пропидиев йодид и анексин (50µg/ml) и наблюдение под флуоресцентен микроскоп.

IV. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Създаване на регистър от пациенти с РМЖ. ДНК банки от туморни проби на болни и венозна кръв на клинично здрави лица

Като първи етап от изследванията, от туморните проби на болните с РМЖ и от венозна кръв на клинично здравите контроли беше изолирана високомолекулна ДНК. Създадени бяха ДНК банки с качество и количество, удовлетворяващи изискванията на PCR-SSCP-секвенционния анализ.

4.2. PCR-SSCP-секвенционен метод

За детекция на генетични изменения в *ATM* и *CHEK2* туморно супресорните гени беше подбран PCR-SSCP анализа. Методът намира широко приложение за откриване на мутации чрез изследване на конформационния полиформизъм на къси едноверижни ДНК молекули с различна нуклеотидна последователност. Чрез PCR-SSCP могат да бъдат детектирани различен тип аберации (точкови мутации, инсерции, делеции) при широк набор от туморно супресорни и протоонкогени. Секвенционният анализ осигурява типизиране на измененията в пробите с установен при PCR-SSCP анализа аберантен миграционен профил.

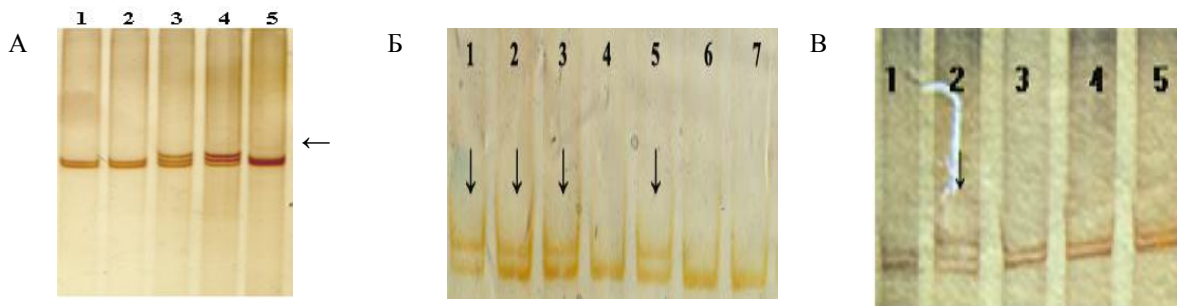
4.3. Детекция на генетични изменения в *ATM* туморно супресорния ген

4.3.1. PCR – SSCP анализ на *ATM* гена

За установяване на мутации в *ATM* гена на анализ бяха подложени всички 145 ДНК-и на болни от групата с РМЖ. За да се отдиференцира нормалният от мутантния профил, на всяка SSCP гел-електрофореза бяха нанасяни амплификационни продукти от клинично здрави контроли. Разделителната способност на SSCP анализа беше повишена чрез оптимизиране на условията на електрофорезата: концентрацията на акриламида в гела, напрежението и силата на тока и продължителността на разделянето.

PCR-SSCP анализът на *ATM* гена разкри аберантни бендове при 11 от изследваните пациентите с РМЖ (7.6%). Всички аберантни електрофоретични профили бяха отнесени до екзони 15 и 39 на *ATM* гена. В екзон 15 бяха намерени две проби с отклонения в миграционното поведение (Фиг. 2А), а в екзон 39 - девет (Фиг. 2Б, В).

В 39-ти екзон бяха установени два типа аберантни електрофоретични профила. При пет от анализиранияте болни с РМЖ беше наблюдаван мутантен електрофоретичен профил, представен на Фигура 2Б, а при други четири беше установен аберантен електрофоретичен профил от друг тип – Фигура 2В.



Фигура 2. PCR-SSCP анализ на *ATM* гена. А - 15-ти екзон (12% SSCP-полиакриламиден гел). Стартове от 2 до 5 - пациенти с РМЖ, старт 1 – отрицателна контрола. Б - 39-ти екзон (8% SSCP-полиакриламиден гел). Стартове от 1 до 6 - пациенти с РМЖ; старт 7 – клинично здрава контрола. В - 39-ти екзон (8% SSCP-полиакриламиден гел). Стартове от 2 до 5 - пациенти с РМЖ; старт 1 – отрицателна контрола. Със стрелки са маркирани пробите с аберантен електрофоретичен профил.

4.3.2. Секвениране и клониране на PCR продуктите с *ATM* мутация

Преди секвениране амплификационни продукти на *ATM* гена с установено при PCR-SSCP анализа аберантно миграционно поведение бяха пречистени и подадени за секвениране.

Пробите с аберантно миграционно поведение, които след секвениране не показаха промяна в нуклеотидната последователност, са клонирани в *pMOSBlue* вектор в мястото на скъсване с рестриктазата *EcoRI*. При секвениране, крайните и началните участъци на анализирания фрагмент обикновено не могат да бъдат „прочетени” правилно. В случаите, когато мутацията е локализирана в тези участъци, тя не може да бъде регистрирана. При амплификация с праймери за вектора обаче (Т7 и U-19) полученият продукт е с около 140 б.дв. по-голям от продукта, получен със специфичните за екзона праймери. Това позволява при секвениране да бъде „прочетена” цялата секвенция на екзона.

С рекомбинантните плазмиди бяха трансформирани *E. Coli* клетки. Получените трансформанти бяха отбрани чрез синьо-бял тест и PCR амплификация, проведена директно върху единични колонии с праймери, фланкиращи *EcoRI* мястото на вектора, както и чрез амплификация със специфичните праймери за екзони 15 и 39 на *ATM* гена, съответно.

4.3.3. Честота и спектър на *ATM* мутациите

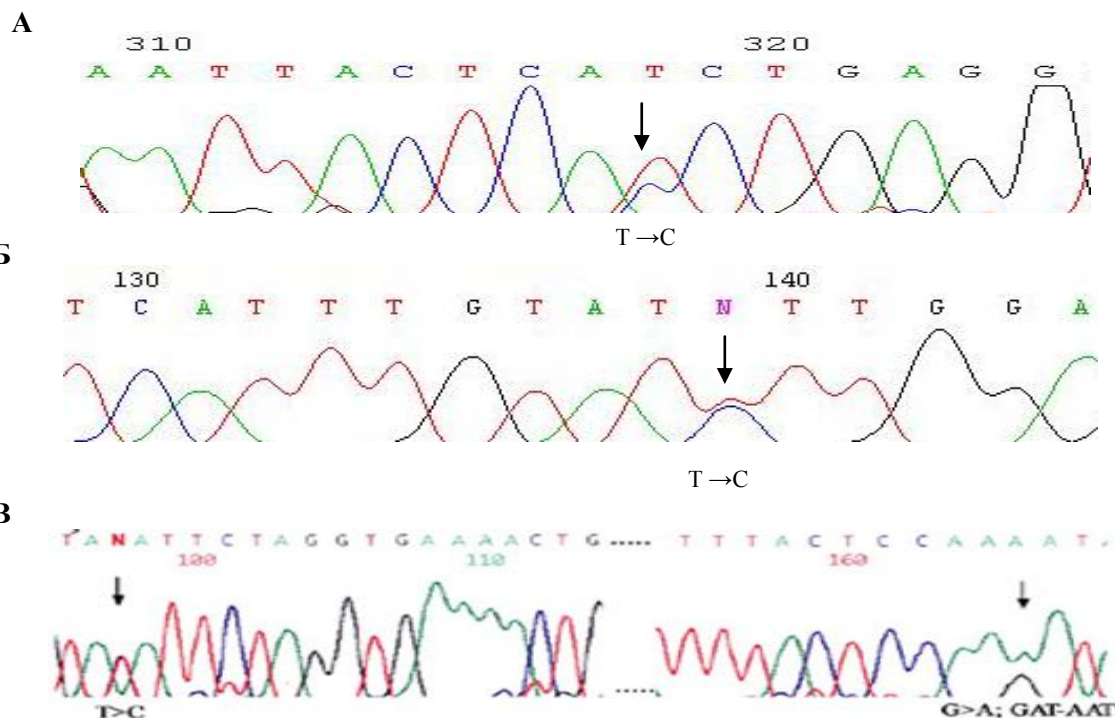
При всички проби с аберантен SSCP профил след секвениране беше потвърден мутантен статус. Всички намерени мутации бяха определени като

базови замени, водещи до аминокиселинна промяна в АТМ протеина (мис-сенс мутации) (Таблица 2).

Таблица 2. Резултати от секвенцианния анализ на регистрираните *ATM* мутации при проучваните болни с РМЖ

Пациент	Екзон/ интрон	Позиция/базова замяна	Кодон	Промяна в кодона	Аминокиселина замяна	Тип на мутацията
39, 89	Екзон 15	2119 Т→С	707	ТСТ-ССТ	Ser-Pro	мис-сенс
43, 44, 54, 57, 76	Екзон 39	5557 G→A	1853	GAT-AAT	Asp-Asn	мис-сенс
17, 50, 61, 78	Екзон 39	5557 G→A	1853	GAT-AAT	Asp-Asn	мис-сенс
	Интрон 38	5320-8Т→С	-	Т>С	-	интронен вариант

Намерена беше идентична мис-сенс мутация при двама от болните с РМЖ в екзон 15 на *ATM* гена. Тази несинонимна базова субституция беше характеризирана като замяна на тимин (Т) в позиция 2119 с цитозин (С), водеща до промяна (Ser→Pro) в аминокиселинния състав на кодон 707 (Фиг. 3А).



Фигура 3. Секвенционен анализ на *ATM* гена. А- секвенционен анализ с правия (F) праймер на PCR продукти за екзон 15-ти от пациент № 39. Б- секвенционен анализ с обратния (R) праймер на PCR продукти за екзон 39-ти от

пациент №54. В- секвенционен анализ с F праймера на PCR продукт за екзон 39–ти от пациент № 78.

Мутацията съответства на специфичния аберантен електрофоретичен профил, представен по-горе на фигура 2А. Секвенционният анализ потвърди общо девет мис-сенс мутации в екзон 39 на *ATM* гена. Пет от тях бяха определени като идентични базови замени (G→A) в позиция 5557, водещи до замяна на аспаргинова киселина (Asp) с аспартат (Asn) в кодон 1853 (Фиг. 3Б). Тези пет идентични мутации бяха асоциирани със специфичния аберантен електрофоретичен профил, показан на фигура 2Б. Данните от секвенционния анализ показаха, че останалите четири мис-сенс мутации в екзон 39 са идентични и се характеризират със съвместно присъствие на несинонимната базова замяна (G→A) в позиция 5557, с интронен вариант (IVS38 -8T>C) в интрон 38 (Фиг. 3В). И четирите мутантни проби при SSCP анализа показаха еднотипно аберантно миграционно поведение (Фиг. 2В).

Направената справка в базите от данни *UniProtKB*, *Ensembl* и *NGMD* определи намерената тук несинонимна замяна (Ser707Pro) в екзон 15 на *ATM* гена като полиморфен вариант (Q13315; rs4986761). Регистрирана е при проучвания, свързани с болни от атаксия-телеангиектазия (А-Т), спорадичен РМЖ, рак на яйчниците, както и с ниска честота при други неоплазии при човека. Мутацията променя аминокиселинния състав в кодон 707, който не е част от функционалните домени на АТМ полипептида, но има данни за ефект върху конформацията и стабилността на матричната РНК.

Базите данни определят регистрираната в настоящото изследване базова замяна в екзон 39 (5557G→A) на *ATM* гена, като често срещан полиморфен вариант (rs1801516). За нея се съобщава при болни с А-Т, спорадичен РМЖ, както и при хронична миелогенна левкемия. Макар че не засяга функционален домен, има данни, че *ATM* Asp1853Asn (G→A) замяната оказва ефект върху сплайсинга, а Asp1853Asn (G→A) - IVS38-8T>C комбинираният вариант се асоциира с коригираща сплайсинга роля.

4.3.4. Оценка на прогностичното значение на мутантния *ATM* статус за РМЖ

4.3.4.1. Връзка на мутантния *ATM* статус с клинично-патологични и молекулярно-генетични характеристики на болните с РМЖ

За оценка на значението на *ATM* мутантния статус като клиничен и прогностичен показател за РМЖ бяха съпоставени класически клинични, патологични и някои молекулярно-генетични характеристики на болните с

установена мутация в *ATM* (група *ATM*⁺) с тези на болните без мутация (група *ATM*⁻). Сравнението беше извършено по отношение на: възраст на диагностициране на заболяването, размер на тумора (Т), наличие на ангажирани лимфни възли (N- статус), степен на диференциация (малигненост) на туморната формация (G), хистологичен вариант на тумора (лобуларен/дуктален), статус на хормоналните рецептори (ER+/- и PR+/-), статус на p53 (нормален/мутантен), PIK3CA (нормален/мутантен) и експресия на HER2 (нормална експресия/свръхекспресия), установени в паралелни изследвания (Bozhanov SS et al., 2010) (Таблица 3).

Таблица 3. Сравнителна характеристика между двете групи болни (*ATM*⁺ и *ATM*⁻) по отношение на изследваните клиничко-патологични и молекулярно-генетични характеристики

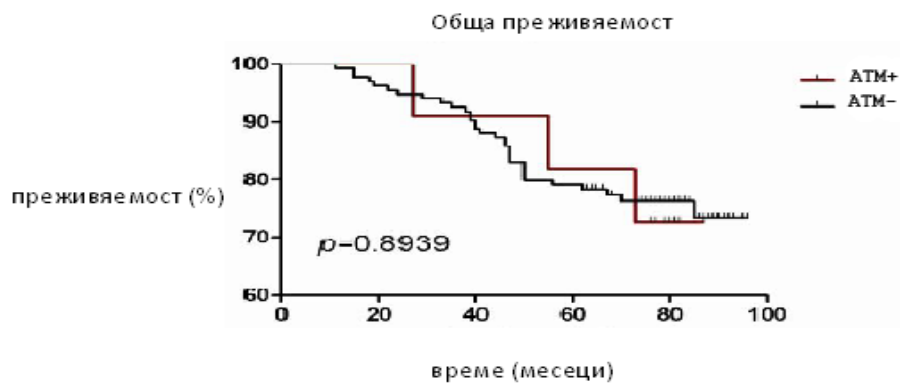
Показател		Общ брой (n = 145)	<i>ATM</i> ⁺ (n = 11)	<i>ATM</i> ⁻ (n = 134)	p
Възраст	Средна възраст	54.4	55,5	54,3	0.33
	Диапазон	29-88	42-74	29-88	
	<50	52	2	50	
	≥50	93	9	84	
Размер на тумора	T1	65	5	60	0.59
	T2	62	6	56	
	T3	7	0	7	
	T4	11	0	11	
N статус	N0	92	8	84	0.746
	N+	53	3	50	
Степен на малигненост	G1	6	2	4	0.032
	G2	103	8	95	
	G3	36	1	35	
Хистологичен тип	Лобуларен	15	3	12	0.09
	Дуктален	130	8	122	
ER	Позитивен	81	6	75	1
	Негативен	64	5	59	
PR	Позитивен	81	7	74	0.76
	Негативен	64	4	60	
p53 статус	Позитивен	16	2	14	0.35
	Негативен	129	9	120	
PIK3CA статус	Позитивен	45	6	39	0.098
	Негативен	99	5	94	
HER2 статус	Позитивен	21	2	19	0.64
	Негативен	78	5	73	
	Неизвестен	46	-	-	

При статистическата обработка бяха използвани тестът на Fisher и методът Chi-квадрат; за статистически значими бяха приемани стойности на p по-малки от 0.05.

Резултатите показаха, че мутантният статус на *ATM* корелира статистически значимо единствено със степента на малигненост на туморната формация ($p = 0.032$) (Таблица 3). *ATM*-позитивните туморите са предимно (72.7%) умерено диференцирани (G2). Наблюдавана беше тенденция за по-висока честота (27.3%) на лобуларния тип карцином при ATM^+ носителите ($p = 0.09$). Данните показват, че 54.5% от болните с позитивен *ATM* статус имат и мутация в *PIK3CA* протоонкогена ($p = 0.098$).

4.3.4.2. Връзка на *ATM* мутантният статус с общата преживяемост и риск за летален изход при болните с РМЖ

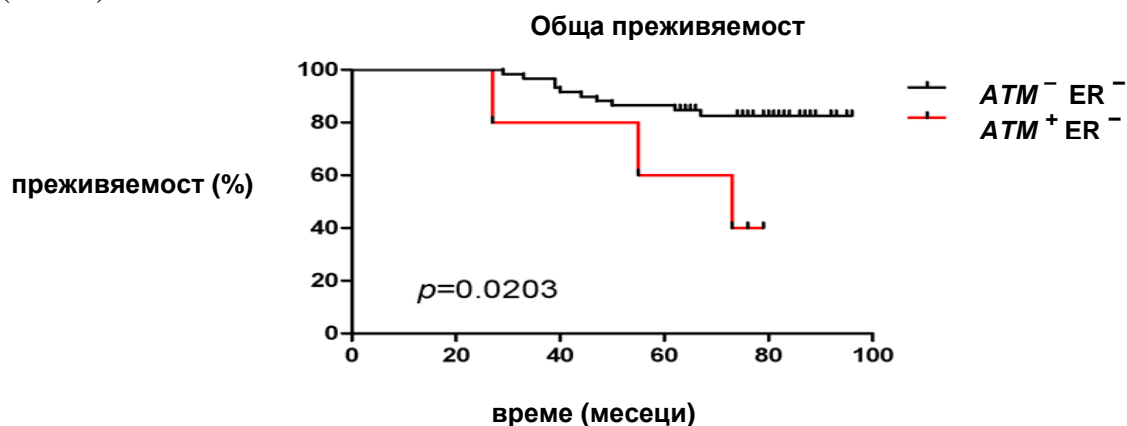
Като прогностичен индикатор за агресивността и изхода на злокачественото заболяване е въведен показателят обща преживяемост на болните. Оценката на ОП при двете групи (ATM^+ и ATM^-) беше направена по метода на Kaplan-Meier (Фиг. 4) след изтичане на 5-годишен период от оперативното лечение. За статистически достоверни бяха приемани само тези величини на показателя p , чиито абсолютни стойности бяха по-малки от 0.05.



Фигура 4. Анализ на общата преживяемост на болните от групи ATM^+ и ATM^- по метода на Kaplan-Meier. На абсцисата е нанесено времето (в месеци) на проследяване на болните с РМЖ, а на ординатата - преживяемостта им (%).

Резултатите от анализа на общата преживяемост определят 75.86% (110/145) средна стойност на показателя при болните от изследваната група с РМЖ. От тук представените криви (Фиг. 4) се наблюдава известно понижаване на процента на преживелите болни с *ATM* мутация (ATM^+) в сравнение с тези без установено *ATM* изменение (ATM^-). Стойността на показателя p ($p=0.8939$) обаче не е статистически значима и не показва достоверна корелация.

Значимо понижение на общата преживяемост ($p = 0.0203$) беше отчетено единствено при болните с *ATM* мутация и негативен статус на ER рецептора (Фиг.5).



Фигура 5. Анализ на общата преживяемост на болните от групи *ATM*⁺ и *ATM*⁻ с негативен статус на ER рецептора по метода на Kaplan-Meier. На абсцисата е нанесено времето (в месеци) на проследяване на болните с РМЖ, а на ординатата - преживяемостта им (в проценти)

Оценката на относителния риск (HR, hazard ratios) за летален изход беше направена с помощта на еднофакторен и мултифакторен анализ на Cox. В анализа са включени класически клиничко-патологични (степен на малигненост G, размер на тумора, N статус, ER статус, PR статус) и някои молекулярно-генетични величини (статус на *ATM*, *p53*, *PIK3CA*, *HER2*) (Таблица 4).

Таблица 4. Еднофакторен и мултифакторен анализи

Фактор	Еднофакторен			Мултифакторен		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
<i>ATM</i>	1.08	0.33-3.54	0.894	1.85	0.39-8.83	0.439
<i>p53</i>	2.31	1.01-5.29	0.048	1.08	0.38-3.09	0.889
<i>PIK3CA</i>	0.50	0.22-1.15	0.103	0.51	0.19-1.34	0.169
<i>HER2</i>	1.27	0.51-3.17	0.616	0.83	0.29-2.39	0.735
Възраст	0.99	0.97-1.02	0.692	0.98	0.94-1.01	0.220
G статус	0.66	0.33-1.35	0.259	1.49	0.63-3.59	0.364
Размер на тумора	1.96	0.96-3.99	0.065	4.43	1.47-13.38	0.008
N статус	0.98	0.49-1.96	0.963	0.87	0.35-2.19	0.771
ER статус	1.44	0.73-2.86	0.297	1.03	0.42-2.55	0.943
PR статус	0.53	0.27-1.03	0.060	0.53	0.22-1.27	0.153

Съкращения: HR, относителен риск; CI, интервал на достоверност; Статистически значимите стойности за *p* са подчертани

Независимият ефект на прогностичените фактори за риска от летален изход беше определен с помощта на мултифакторния анализ. За статистически значими бяха приемани стойностите за $p < 0.05$.

Еднофакторният анализ показва, че болните с мутация в *ATM* имат 1.08 пъти по-висок риск да починат от РМЖ (95% CI 0.33-3.54, $p = 0.894$), макар че мултифакторният анализ не регистрира независим ефект на мутантния *ATM* (HR = 1.85, 95% CI 0.39-8.83, $p = 0.439$). При проведения мултифакторен анализ единственият независим прогностичен фактор се оказа размерът на тумора, който увеличава 4,43 пъти риска от смърт при РМЖ (HR = 4.43, 95% CI 1.47-13.38, $p = 0.008$). Беше установено също, че макар и да няма независим ефект, статусът на прогестерон рецепторите (**PR+**) понижава риска от неблагоприятен изход от болестта (HR = 0.53, 95% CI 0.27-1.03, $p = 0.060$).

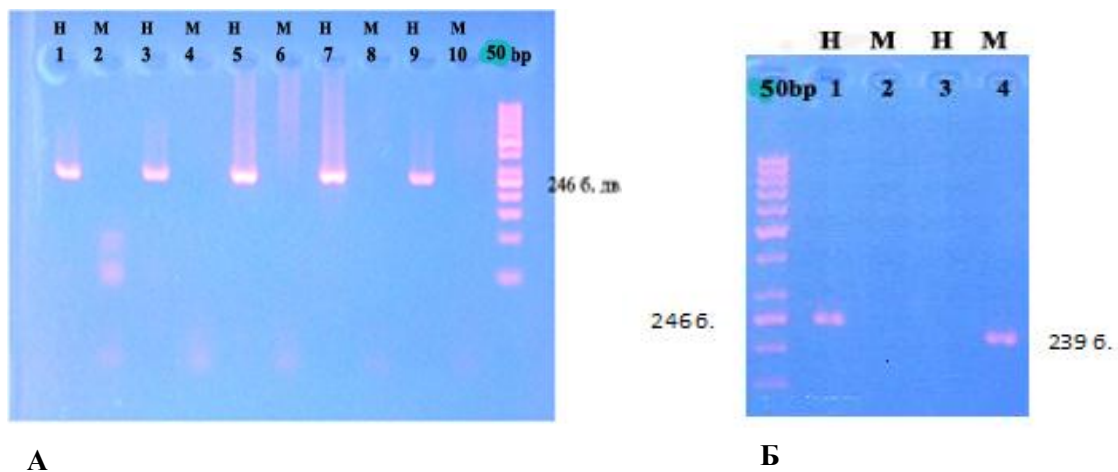
4.4. Анализ на профила на метилиране в промоторната област на *ATM* гена

Понастоящем, епигенетичните изменения се разглеждат като алтернатива на мутациите за инактивирането на туморно супресорните гени. Основен епигенетичен фактор, свързан с иницирането и развитието на канцерогенетичния процес е промяната в профила на метилиране на ДНК. В тази връзка в дисертационния труд е анализиран и статусът на метилиране в промоторната област на *ATM* като вероятен механизъм за загуба на функцията му при пациенти с РМЖ.

✓ Метилационно-специфичен PCR анализ на *ATM* гена (MSP)

Дизайнът на MSP методът включва модифициране на прицелната ДНК с натриев бисулфит като първи етап от процеса, амплификация чрез PCR и оценка чрез агарозна гел електрофореза. Под действие на бисулфита се осъществява химична конверсия на неметириания цитозин до урацил. В неметирираните ДНК проби, след третиране с натриев бисулфит всички цитозинови остатъци се дезаминират и конвертират в урацил. В пробите с частично метилирана ДНК 5-метилцитозинът в CpG местата не се конвертира, а остава непроменен. Така се създават секвенционни различия между метилираната и неметирираната ДНК, което позволява конструиране на специфични праймери от два типа: Н (хибридизират с ДНК с нормален профил на метилиране) и М (хибридизират с хиперметирирана ДНК). Чрез PCR анализ с тези праймери, специфично може да бъде разграничена метилираната от неметирираната ДНК след електрофоретично разделяне.

MSP анализът беше приложен за оценка на статуса на метилиране в промоторната област на *ATM* гена в 55 туморни проби на болни от групата с РМЖ. Като положителна контрола беше използвана *in vitro* тотално метилирана ДНК. Като негативна контрола беше използвана модифицираната с натриев бисулфит ДНК, изолирана от кръвни проби на клинично здрави лица. Резултатите от MSP анализа показаха липса на аномално хиперметиране в промотора на *ATM* гена при анализираниите проби от болни с РМЖ (Фиг. 6А). Бяха установени единствено амплификационни продукти, които съответстват на неметиран статус на *ATM* гена. Големината на тези продукти съответстваше на 246 базови двойки, а тази на амплификационните продукти на позитивната контрола - 239 базови двойки (Фиг. 6Б).



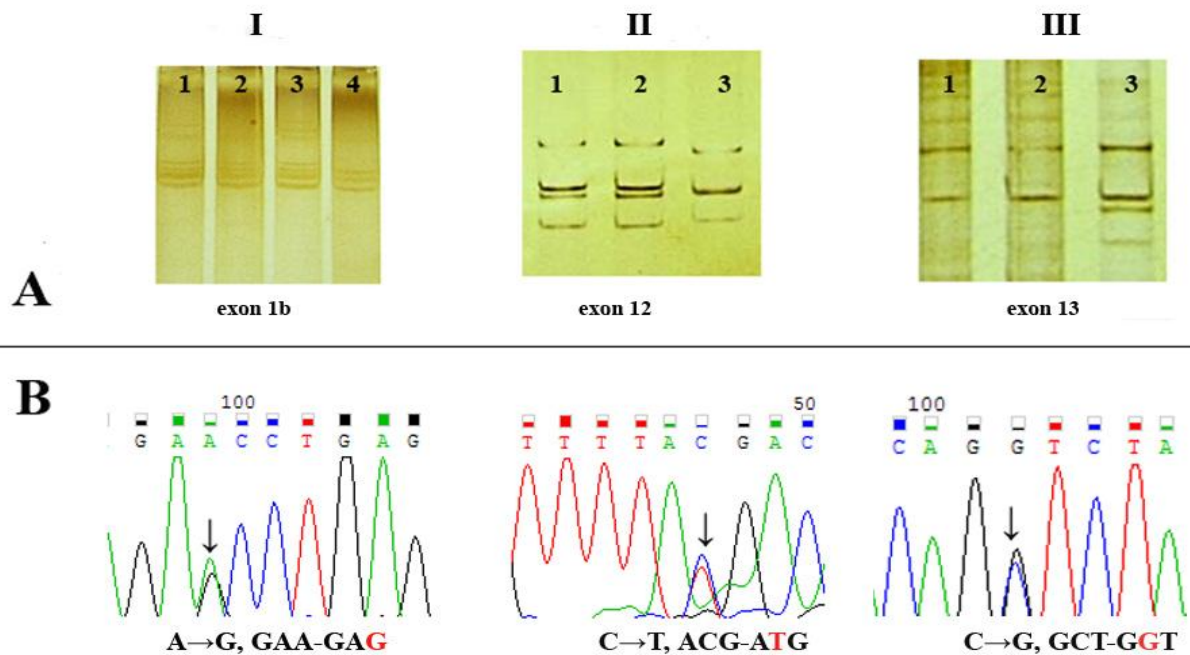
Фигура 6. MSP-анализ на *ATM* гена при болни с РМЖ. А- 2%-на агарозна гел-електрофореза на PCR продукти, получени с праймери за неметирана (Н)-старт 1, 3, 5, 7, 9 и за метилирана (М) – старт 2, 4, 6, 8, 10 ДНК; 50 bp маркер за молекулно тегло. Б- 2%-на агарозна гел-електрофореза на PCR продукти, получени с праймери за неметирана (Н) и за метилирана (М) ДНК на пациент с РМЖ – старт 1 и 2 и на *in vitro* тотално метилирана ДНК; 50 bp маркер за молекулно тегло

4.5. Детекция на генетични изменения в *CHEK2* туморно супресорния ген

4.5.1. PCR – SSCP анализ на *CHEK2* гена

След оптимизация на PCR реакцията и SSCP електрофоретичният анализ на 14-те екзона на *CHEK2*, за наличие на мутации бяха анализирани всички 145 ДНК-и на болните от групата с РМЖ. За идентификация на нормалния и мутантния профил на всеки гел бяха нанасяни PCR продукти от клинично здравите контроли. PCR-SSCP анализът на *CHEK2* гена разкри аберантни

бендове при 14 от изследваните проби (9.65%). Установените различия в миграционното поведение бяха отнесени до екзони 1б, 12 и 13 на *CHEK2* (Фиг. 7А).



Фигура 7. А - SSCP анализ на *CHEK2*; I - екзон 1б, аберантен профил (стартове 1, 2, 3) и нормален профил (старт 4); II – екзон 12, аберантен профил (стартове 1, 2) и нормален профил (старт 3); III – екзон 13, аберантен профил (старт 3) и нормален профил (стартове 1, 2). В – Секвенционен анализ с правия праймер на пробите със съответния аберантен електрофоретичен профил.

4.5.2. Секвенционен анализ на *CHEK2* гена

PCR продуктите на *CHEK2* гена с установен аберантен SSCP профил бяха пречистени и подадени за секвениране. Данните от секвенционния анализ на регистрираните в *CHEK2* мутации са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Секвенционен анализ на намерените аберантни варианти в *CHEK2*

Пациенти	Екзон	Позиция	Кодон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Тип мутация
3, 7, 36, 42, 109, 111, 112, 121, 139	16	237 A→G	79	GAA-GAG	Glu - Glu	<i>silent</i>
39, 60, 133	12	1427 C→T	476	ACG-ATG	Thr - Met	мис-сенс
17, 25	13	1520 C→G	507	GCT-GGT	Ala - Gly	мис-сенс

4.5.3. Честота и тип на *CHEK2* генетичните изменения

Резултатите от секвенционния анализ определиха наличие на 14 несинонимни базови замени. Установените базови замени се асоциираха с два типа аминокиселинни замени в *CHEK2* протеина: мис-сенс и *silent* (мълчащи). Мутации от типа мис-сенс бяха намерени в екзон 12 – при три от болните жени (21.42%) и в екзон 13 - при две (14.28%). Мълчаща мутация беше установена в екзон 16 при 9 от пациентките (64.28%).

Деветте мутации в екзон 16 имат идентичен електрофоретичен профил (Фиг. 7А, I) и съответстват на базова замяна А→G в кодон 79 (GAA-GAG,) (Фиг. 7Б, I). Замяната на аденин с гуанин (А→G) в позиция 237 не променя аминокиселинния състав на *CHEK2* протеина, тъй като GAA кодонът определя включването в полипептидната верига на глутаминова киселина (Glu) и при базовата замяната се променя в GAG, който също кодира глутаминова киселина (Glu). Резултатите от секвенционния анализ на трите проби с установен аберантен SSCP профил (Фиг. 7А, II) за екзон 12 на *CHEK2* гена показаха наличие на еднотипна мис-сенс замяна (Фиг. 7Б, II). При всяка една от тези три проби установихме субституция на цитозин в позиция 1427 с тимин, водеща до промяна в аминокиселинната последователност Thr→Met на *CHEK2* полипептида в кодон 476. Секвенционният анализ за екзон 13, за който SSCP анализа определи наличие на характерен тип аберантен профил (Фиг. 7А, III), показва наличие на друг тип мис-сенс замяна (Фиг. 7Б, III). Аберацията представлява замяна на цитозин в позиция 1520 с гуанин, която се изразява с промяна Ala→Gly в аминокиселинния състав на *CHEK2* белтъка в кодон 507.

Намерената тук *silent* мутация Glu79Glu, А→G в екзон 16 по наше знание е първата от този тип, описана при пациенти с РМЖ. Тя не е съобщена в нито една от наличните бази данни, във връзка с което и да е злокачествено заболяване. В настоящата работа вариантът Glu79Glu, А→G е установен със сравнително висока честота – при 9 от изследваните пациенти (0.062). Замяната А→G не засяга аминокиселинната последователност в кодон 79, разположен в областта между SCD и FNA домените на *CHEK2* полипептида. По тази причина вероятно няма пряк ефект върху функцията на *CHEK2* полипептида, но е възможно да оказва влияние върху сплайсинга, стабилността на мРНК и др.

Субституцията на цитозин с тимин в позиция 1427, водеща до промяна Thr→Met в кодон 476, не е съобщавана до сега при нито един от видовете рак при човека. Базите от данни *UniProtKB* и *Ensembl*, поддържащи информация за

CHEK2 гена, съобщават за наличие на друг тип несинонимна замяна в същата позиция (1427) - замяна на цитозин с аденин (C→A) (CM030427) при пациенти с тумори на простатата (Dong X et al., 2003; Zheng L et al., 2006).

Установената несинонимна замяна в екзон 13 (Ala507Gly) се отнася до кодон 507, локализиран в областта между киназния домен и С-крайната област на *CHEK2* полипептида. С оглед на местоположението ѝ, тази замяна вероятно не повлиява пряко киназната функция на белтъка, но има вероятност тя да оказва въздействие върху неговата стабилност и конформация. Направената справка в базите от данни показва липса на информация за намерения от нас мутантен вариант в екзон 13. Информационните бази *Ensembl* и *NIEHS SNPs program* съобщават за полиморфни варианти, засягащи близко разположените кодони 500 (rs28909981), 501 (rs17883172) и 512 (rs17882942). Последните не се свързват с развитие на канцерогенетичен процес.

4.5.4. Оценка на прогностичното значение на мутантния *CHEK2* статус за РМЖ

4.5.4.1. Връзка на мутантния *CHEK2* статус с клинично-патологични и молекулярно-генетични характеристики на болните с РМЖ

Оценката на клиничният потенциал на мутантния *CHEK2* статус за туморогенезата при РМЖ беше извършена чрез редица сравнителни анализи на клинично-патологичните и молекулярни туморни характеристики на болните с установени изменения в *CHEK2* гена (група *CHEK2*⁺) спрямо болните с див тип *CHEK2* (*CHEK2*⁻) (Таблица 6).

В сравняваните групи от болни - *CHEK2*⁺ и *CHEK2*⁻, статистически значима зависимост беше установена само по отношение на хистологичния тип на карцинома ($p=0.04$). И в двете групи преобладава дукталния тип карцином, но неговата честота в *CHEK2*⁺ групата е значително по-ниска (71.43%) в сравнение с тази при *CHEK2*⁻ болните (91.61%). Получената стойност за p ($p=0.092$), отнесена към PR статуса е близка до достоверната и очертава тенденция за наличие на доста по-висока численост на случаите с позитивен рецептор за прогестерона в *CHEK2*⁺ групата, в сравнение с тази в *CHEK2*⁻ групата.

Таблица 6. Сравнителна характеристика между болните от групи *CHEK2*⁺ и *CHEK2*⁻ по отношение на изследваните клинично-патологични и молекулярно-генетични характеристики.

Показател		Общ брой (n = 145)	<i>CHEK2</i> ⁺ (n = 14)	<i>CHEK2</i> ⁻ (n = 131)	<i>p</i>
Възраст	Възраст (години)	54.4	52.92	54.37	1
		29-88	32-74	29-88	
	<50	52	5	47	
	≥50	93	9	84	
Размер на тумора	T1	65	8	57	0.401
	T2-T4	80	6	74	
N статус	N0	92	8	84	0.771
	N+	53	6	47	
Степен на малигненост	G1	6	1	5	0.473
	G2	103	8	95	
	G3	36	5	31	
Хистологичен тип	лобуларен	15	4	11	0.04
	дуктален	130	10	120	
ER статус	ER+	81	8	73	1
	ER-	64	6	58	
PR статус	PR+	81	11	70	0.092
	PR-	64	3	61	
ATM статус	позитивен	11	2	9	0.287
	негативен	134	12	122	
p53 статус	позитивен	16	1	15	1
	негативен	129	13	116	
PIK3CA статус	позитивен	45	5	40	0.764
	негативен	99	9	90	
HER2 статус	позитивен	21	1	20	0.679
	негативен	78	8	70	
	неизвестен	46	-	-	

За оценка на индивидуалното значение на *CHEK2* мутациите за клиничните параметри на болните, пациентките с позитивен мутантен статус бяха разделени в две групи: пациенти със *silent* вариант в екзон 16 (*CHEK2*_v⁺) и болни с *mis-sens*

мутация (*CHEK2_m⁺*) (пациентките със замени в екзони 12 и 13, поради малкия им брой, бяха обединени в обща група) (Таблица 7).

Таблица 7. Сравнителен анализ по отношение на характерния клиничен и генетичен статус на двете групи пациенти - *CHEK2_v⁺* и *CHEK2_m⁺*

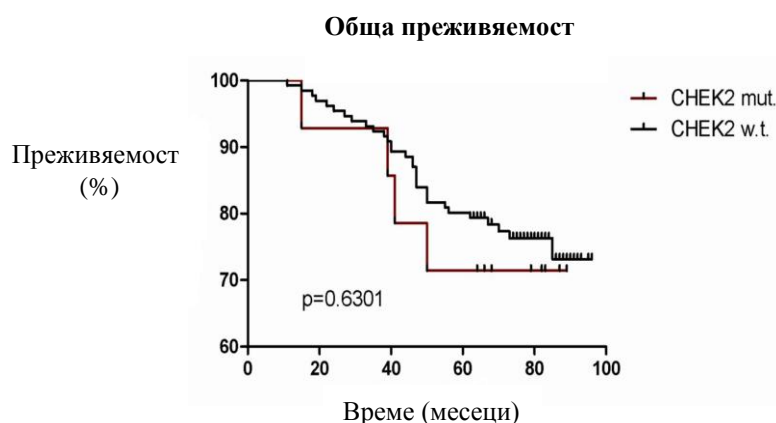
Показател		<i>CHEK2_v⁺</i> (n = 9) <i>silent</i> - екзон 16	<i>CHEK2</i> (n = 136)	<i>p</i>	<i>CHEK2_m⁺</i> (n = 5) <i>mis-sense</i> - екзон 12/13	<i>CHEK2</i> (n = 140)	<i>p</i>
Възраст	Възраст (години)	55.2		0.722	53.8		0.655
		35-70			32-74		
	<50	4	48		1	51	
	≥50	5	88		4	89	
Размер на тумора	T1	5	60	0.514	3	62	0.657
	T2-T4	4	76		2	78	
N статус	N0	5	87	0.724	3	89	1
	N+	4	49		2	51	
G статус	G1		6	0.332	1	5	0.193
	G2	5	98		3	100	
	G3	4	32		1	35	
Хистологичен тип	лобуларен	2	13	0.234	2	13	0.083
	дуктален	7	123		3	127	
ER статус	ER+	3	78	0.183	5	76	0.067
	ER-	6	58		-	64	
PR статус	PR+	9	72	0.004	2	79	0.654
	PR-		64		3	61	
ATM статус	позитивен		11	1	2	9	0.046
	негативен	9	125		3	131	
p53 статус	позитивен		16	0.597	1	15	1
	негативен	9	120		4	125	
PIK3CA статус	позитивен	3	42	1	2	43	1
	негативен	6	93		3	96	
HER2 статус	позитивен	1	20	1	1	20	1
	негативен	4	74		3	75	

Резултатите показват статистически достоверна значимост на PR статуса при болните от група *CHEK2_v⁺* ($p=0.004$) и на ATM статуса ($p=0.046$) при болните от групата *CHEK2_m⁺*. Всички жени от *CHEK2_v⁺* групата имат позитивен рецептор за прогестерона, което налага тенденция за по-малка агресивност на злокачествения процес при тях. При жените от групата *CHEK2_m⁺* на фона на сравнително благоприятната клинична картина се откроява статистически

достоверно ($p=0.046$) покачване на броя на случаите с регистрирана *ATM* мутация.

4.5.3.2. Връзка на *CHEK2* мутантния статус с общата преживяемост и риск за летален изход при болните с РМЖ

Резултатите от Kaplan-Meier анализът показаха понижаване в ОП на пациентите с позитивен *CHEK2* статус (*CHEK2* mut.) в сравнение с тази на болните с див тип *CHEK2* ген (*CHEK2* w.t.), въпреки че тази зависимост не бе статистически значима ($p = 0.6301$) (Фиг. 8).



Фигура 8. Обща преживяемост на болните с нормален (*CHEK2* w.t.) и мутирал (*CHEK2* mut.) ген по метода на Kaplan-Meier.

С цел оценка на връзката на мутантния *CHEK2* статус с относителния риск за смърт (HR) беше проведен едно- и мултифакторен анализ на Кокс (Таблица 8).

Таблица 8. Еднофакторен и мултифакторен анализи

Фактор	Еднофакторен			Мултифакторен		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
<i>CHEK2</i>	1.290	0.455-3.654	0.632	3.295	0.85-12.778	0.085
<i>p53</i>	2.288	0.999-5.239	0.050	1.310	0.456-3.757	0.616
<i>PIK3CA</i>	0.502	0.219-1.149	0.103	0.480	0.179-1.287	0.145
<i>ATM</i>	1.084	0.331-3.543	0.894	1.958	0.391-9.802	0.414
<i>HER2</i>	1.266	0.505-3.174	0.616	0.874	0.300-2.547	0.805
Възраст	1.283	0.629-2.620	0.493	0.716	0.286-1.793	0.476
G статус	1.469	0.764-2.824	0.249	1.332	0.539-3.293	0.535
Размер на тумора	HR	0.958-3.996	0.065	4.701	1.536-13.92	0.007
N статус	1.290	0.495-1.956	0.963	0.962	0.381-2.425	0.934
ER статус	2.288	0.725-2.859	0.297	0.953	0.375-2.424	0.920
PR статус	0.502	0.268-1.027	0.060	0.427	0.174-1.048	0.063

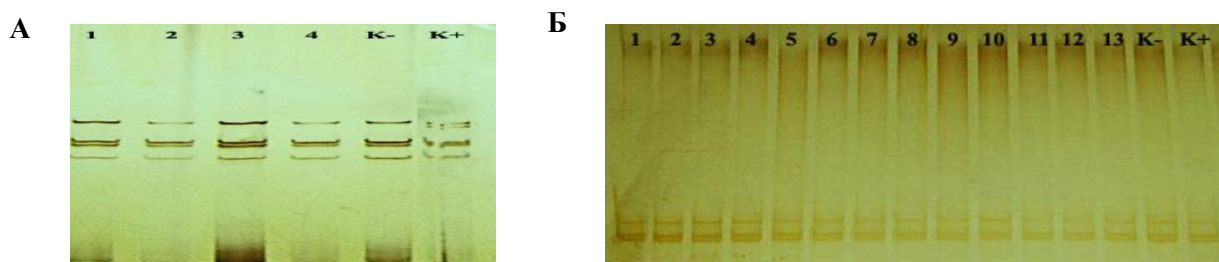
Съкращения: HR, относителен риск; CI, интервал на достоверност; Статистически значимите стойности за *p* са подчертани

Данните показаха статистически достоверни зависимости, сходни на тези, наблюдавани при анализа на *ATM* гена (виж Таблица 4) по отношение на размера на тумора (HR = 4.701, 95%CI 1.536-1.392, **p = 0.007**) и *p53* мутантния статус (HR = 2.28 95%CI 0.455-3.654, **p= 0.050**). Трябва да се отбележи, че при мултифакторния анализ беше регистрирано трикратно повишение на риска за смърт при пациентите с установено *CHEK2* изменение (HR = 3.295, 95%CI 0.850-12.778, **p = 0.085**). Този ефект на мутантния *CHEK2* статус е независим от останалите параметри, включени в анализа. Резултатът е в съгласие с данните от Kaplan-Meier анализа, показващи понижаване в ОП на *CHEK2* позитивните пациенти.

4.6. Анализ на профила на метилиране в промоторната област на *CHEK2* гена

За оценка на статуса на метилиране в промоторната област на *CHEK2* гена беше използван метилационно-чувствителен SSCP (Methylation-sensitive SSCP) анализ. Методът е многоетапен и включва: конверсия на прицелната ДНК чрез третиране с натриев бисулфит, амплификация на богати на CpG динуклеотиди области (CpG острови) от промотора на гена с помощта на специфични праймери, ограничавачи тези ДНК сегменти и следващ SSCP анализ за откриване на PCR продукти с аберантно миграционно поведение. На анализ бяха подложени всичките 145 туморни ДНКи на болните с РМЖ. Като отрицателни контроли във всеки анализ бяха използвани ДНКи от венозна кръв на клинично здрави лица.

Резултатите от проведения метилационно-чувствителен SSCP анализ показаха идентичен профил на метилиране при туморните и контролните проби. При всички анализирани туморни проби и негативни контроли беше отчетена липса на метилиране в далечния CpG остров. Електрофоретичният профил на PCR фрагментите, получени с праймери MIP2/3/4/5 при болните е еднакъв с този, получен при клинично здравите лица и различен от профила на позитивната (напълно метилирана) контрола (Фиг. 9А).



Фигура 9. Метилационно-чувствителен SSCP анализ на *CHEK2* гена. **А-** 10%-на гел-електрофореза на PCR продукти с праймери MIP3. Стартове- 1-4–болни

от РМЖ. Б- 12%-на гел - електрофореза на PCR продукти с праймери MIP1. Стартове- 1- 13 – PCR продукти от туморни проби на болни. К(-) - негативна контрола (ДНК от клинично здрави лица); К(+) - позитивна контрола (напълно метилирана *in vitro* ДНК).

Обратно, близкият CpG остров в *CHEK2* промотора беше изцяло метилиран при всички анализирани туморни проби и негативни контроли. Електрофоретичният профил на PCR фрагментите, получени с MIP1 беше идентичен с този на позитивната контрола при всички анализирани случаи (Фиг. 9Б).

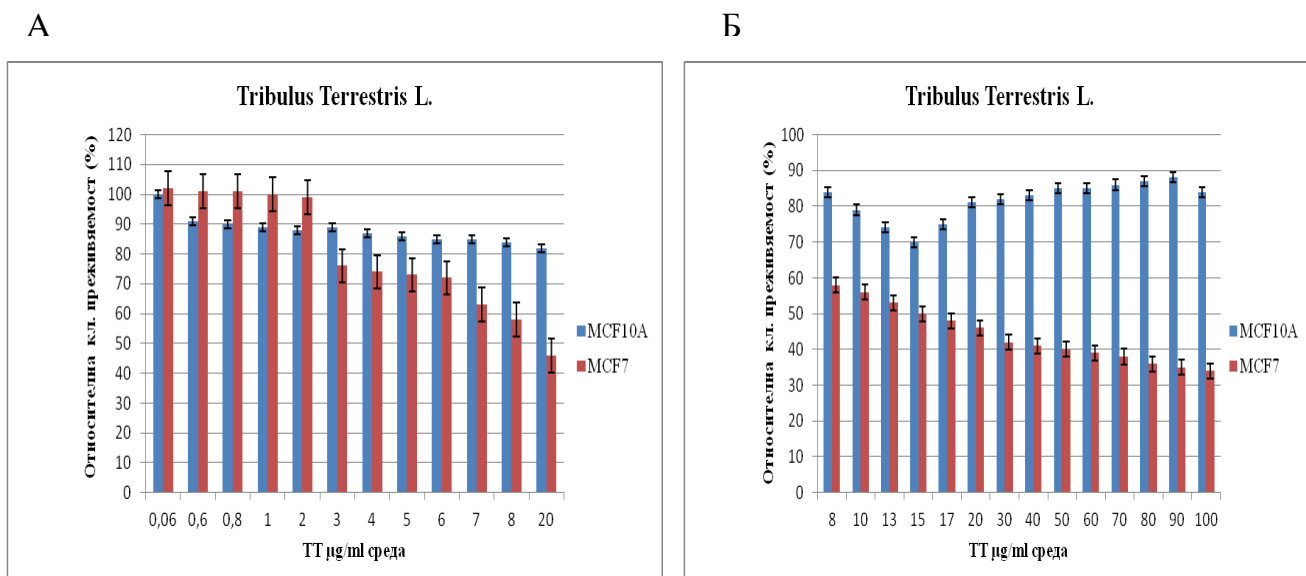
4.8. Антитуморна активност на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris* L.

4.8.1. Анализ на преживяемостта на нормална и ракова клетъчни линии след третиране с тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris* L.

За анализ на относителната клетъчна преживяемост на третираните туморни и контролни клетки с тотален екстракт от *Tribulus terrestris* L. и със сапонинова фракция беше избран МТТ методът. Методът е бърз, количествен, високо възпроизводим и подходящ за оценка на антитуморния ефект на широк диапазон от лечебни субстанции и лекарства. За антитуморната активност най-често се съди по IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) - концентрацията на активното вещество, необходима за редуциране на преживяемостта до 50%. Колкото е по-ниска тази стойност, толкова по-силни са антитуморните свойства на изследваното вещество. При концентрация IC₅₀ относително се запазва виталността на третираните клетки и това дава възможност да бъдат изучени *in vitro* молекулните механизми в основата на антитуморния ефект. Поради това в експерименталната работа е прието, всички последващи МТТ анализа опити да се провеждат с концентрацията IC₅₀.

Ефектът на тоталния екстракт от *Tribulus terrestris* L. (ТТ) върху преживяемостта на клетките от изследваните нормална MCF10A и ракова MCF7 клетъчни линии беше оценен чрез паралелното им третиране за 24 часа с различни концентрации на екстракта, вариращи в широк диапазон: 0, 0.06, 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 20, 60 µg ТТ на ml среда. Като разтворител при приготвяне на разтворите беше използвана средата за култивиране на клетките. Диапазонът от концентрации беше избран съгласно данни за ефекта на сапонинова фракция от българската билка *Tribulus terrestris* L. върху виталността на нормални човешки фибробласти (Neychev VK et al., 2007).

Резултатите показаха, че водноалкохолният екстракт от ТТ има изразен дозозависим ефект върху преживяемостта на клетки от тумори на млечната жлеза. Установено беше, че в диапазона от концентрации от 0.06 до 2 μg ТТ/ml среда преживяемостта на туморните клетки е съпоставима с тази на контролни нетретирани туморни клетки, приета условно за 100% (Фиг. 10А).



Фигура 10. МТТ анализ на нормална МCF10А и ракова МCF7 клетъчни линии, третирани за 24 часа с нарастващ диапазон от концентрации на тотален екстракт от *Tribulus terrestris L.*

С увеличаване на концентрацията (в диапазона от 3 до 20 μg ТТ/ml среда) се наблюдаваше стабилно понижаване на преживяемостта на туморните клетки.

С цел определяне на IC_{50} , тестовия диапазон от концентрации между 8 и 20 μg ТТ/ml беше детайлизиран: 8, 10, 13, 15, 17, 20 μg ТТ/ml. Бяха включени и по-високи концентрации за установяване на тенденциите на тяхното влияние върху преживяемостта: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg ТТ в ml среда (Фиг. 10Б).

Редуциране на преживяемостта на туморните клетки до 50% беше наблюдавано при третиране с 15 μg ТТ на ml среда. Тази концентрация беше приета за IC_{50} .

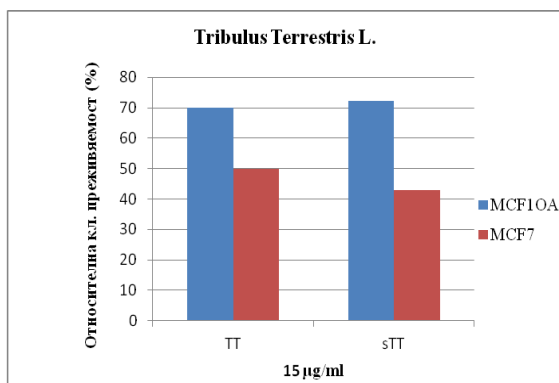
По отношение на нормалната клетъчна линия, при по-ниските концентрации (от 0.06 до 8 μg ТТ/ml) беше отчетено умерено понижаване на преживяемостта (до 84%), без дозозависим ефект (Фиг. 10А). В зоната на инхибиторната концентрация IC_{50} , установена за туморните клетки, преживяемостта на нормалните клетки намаляваше значително и беше с най-ниска стойност (от порядъка на 70%) (Фиг. 10Б). С нарастване на концентрацията над 20 μg ТТ/ml,

обаче беше отчетена тенденция за увеличение на преживяемостта на MCF 10A клетките.

С концентрацията 15 μg ТТ на ml среда, която приехме за IC_{50} , бяха проведени всички останали, съпътстващи анализи.

➤ *МТТ анализ на пречистена сапонинова фракция от Tribulus terrestris L.*

Сапониновата фракция (sTT) е стандартизирана по отношение на съдържанието ѝ на протодиосцин чрез търговски прототип (ChromaDex, Inc., Santa Ana, CA) като стандарт съгласно Ganzera M (Ganzera M et al., 2001). Стандартизирането е извършено от В. Лозанов, Медицински Университет - София. МТТ анализът на сапониновата фракция беше проведен при инхибиторната концентрация IC_{50} - 15 μg sTT на ml среда, установена за тоталния растителен екстракт. Клетките от MCF 7 и MCF10A линиите бяха третираны за 24 часа.



Фигура 11. МТТ анализ на нормална MCF10A и ракова MCF7 линии, третираны за 24 часа с инхибиторна концентрация (IC_{50}) от 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ среда от тотален екстракт на ТТ и фракция sTT.

Резултатите показаха леко понижаване в преживяемостта на туморните клетки под действие на сапониновата фракция спрямо тоталния екстракт (43% спрямо 50%) (Фиг. 11). При третиране на нормалните клетки както с ТТ, така и sTT, преживяемостта остана от порядъка на 70%.

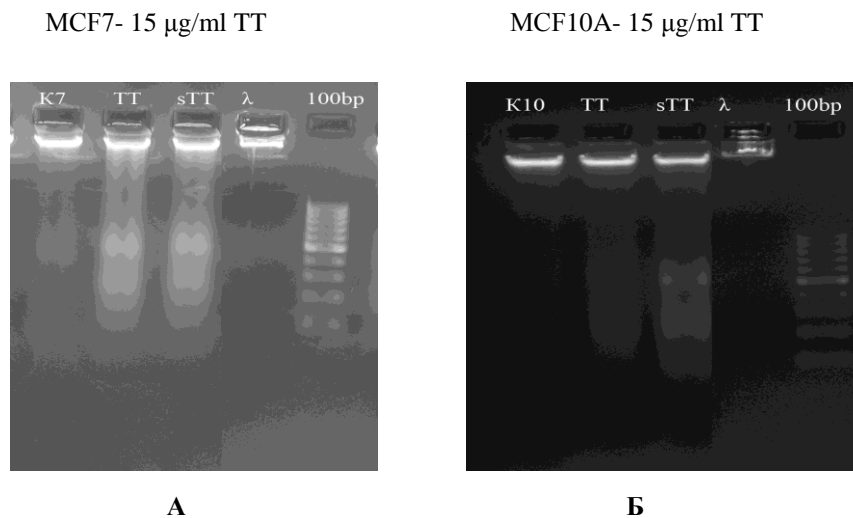
4.8.2. Анализ на апоптотичния потенциал на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris L.*

За оценка на апоптотичния потенциал на тоталния екстракт и сапониновата фракция от *Tribulus terrestris L.* бяха проведени: 1) анализ на състоянието на генетичния материал на третираните клетки (анализ на ДНК фрагментацията) и 2) анализ на морфологични промени в третираните клетки, асоциирани с апоптотични процеси (флуоресцентно–микроскопски анализ).

• *Анализ на ДНК фрагментацията*

Клетъчните линии MCF10A и MCF7 бяха паралелно третираны с тотален екстракт и сапонинова фракция в установената при МТТ анализа инхибиторна

концентрация IC_{50} - 15 $\mu\text{g/ml}$. Клетките бяха подложени на въздействие за 24 часа, а впоследствие - за 48 и 72 часа. Изолираната ДНК беше анализирана в 1,5% агарозен гел за наличие на фрагментация (Фиг. 12).



Фигура 12. Анализ на фрагментацията в 1,5%-на агарозна гел–електрофореза на ДНК изолирана от: **А** –MCF7 клетки; **Б** - MCF10A клетки, третирани с TT и sTT в концентрация 15 $\mu\text{g/ml}$ за 24часа. K7 – ДНК от нетретирани туморни клетки; K10 – ДНК от нетретирани нормални клетки; старт 4 – λ маркер; старт 5 -100 bp маркер

Резултатите от фрагментационния анализ, извършен на 24-я час от третирането, показаха наличие на фрагментация на ДНК както в туморните, така и в нормалните клетки след въздействие както с тоталния екстракт, така и със сапониновата фракция. Отчетеното ниво на фрагментация обаче беше по-високо при туморните клетки. По-силно изразен ефект върху интегритета на генетичния материал на туморните и нормалните клетки под действие на сапониновата фракция спрямо тоталния екстракт не беше намерен.

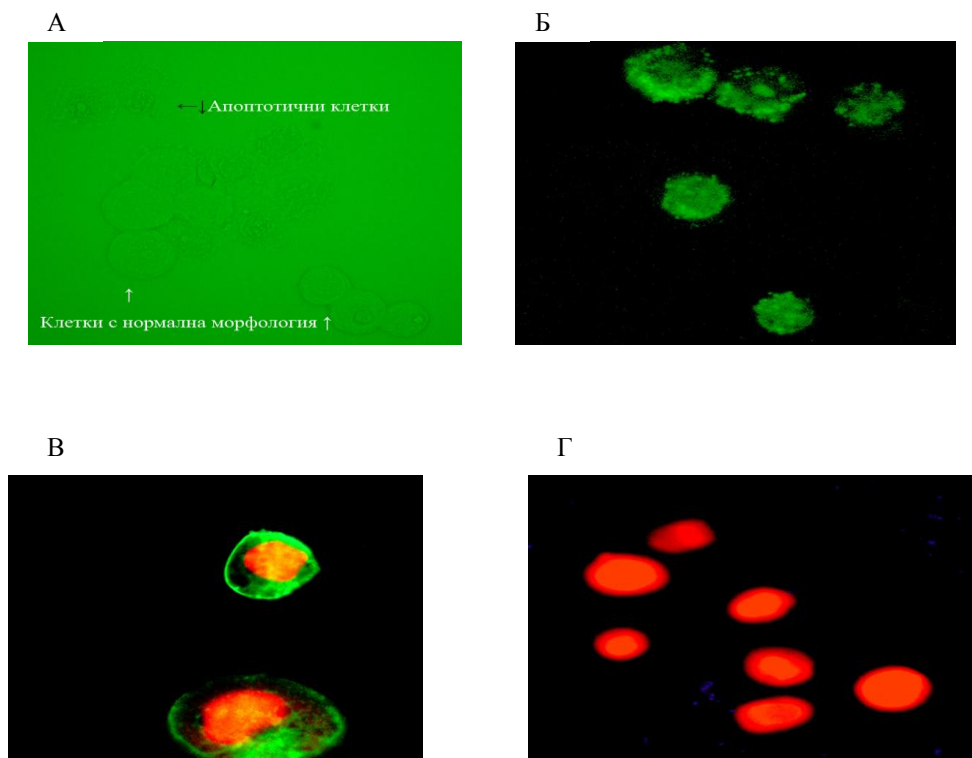
- *Флуоресцентно–микроскопски анализ*

Анализът е високочувствителен и дава възможност да бъдат отчетени морфологични клетъчни промени, асоциирани с различни фази на апоптозата.

Принципът на флуоресцентно–микроскопския анализ включва няколко последователни етапа: 1) третиране на туморните и контролните клетки за период от 24ч/48ч/72ч; 2) оцветяване с Annexin V и пропидиев йодид и 3) наблюдение под флуоресцентен микроскоп.

Резултатите от флуоресцентно–микроскопския анализ показаха наличие на морфологични клетъчни изменения, свързани с апоптотични процеси в раковите

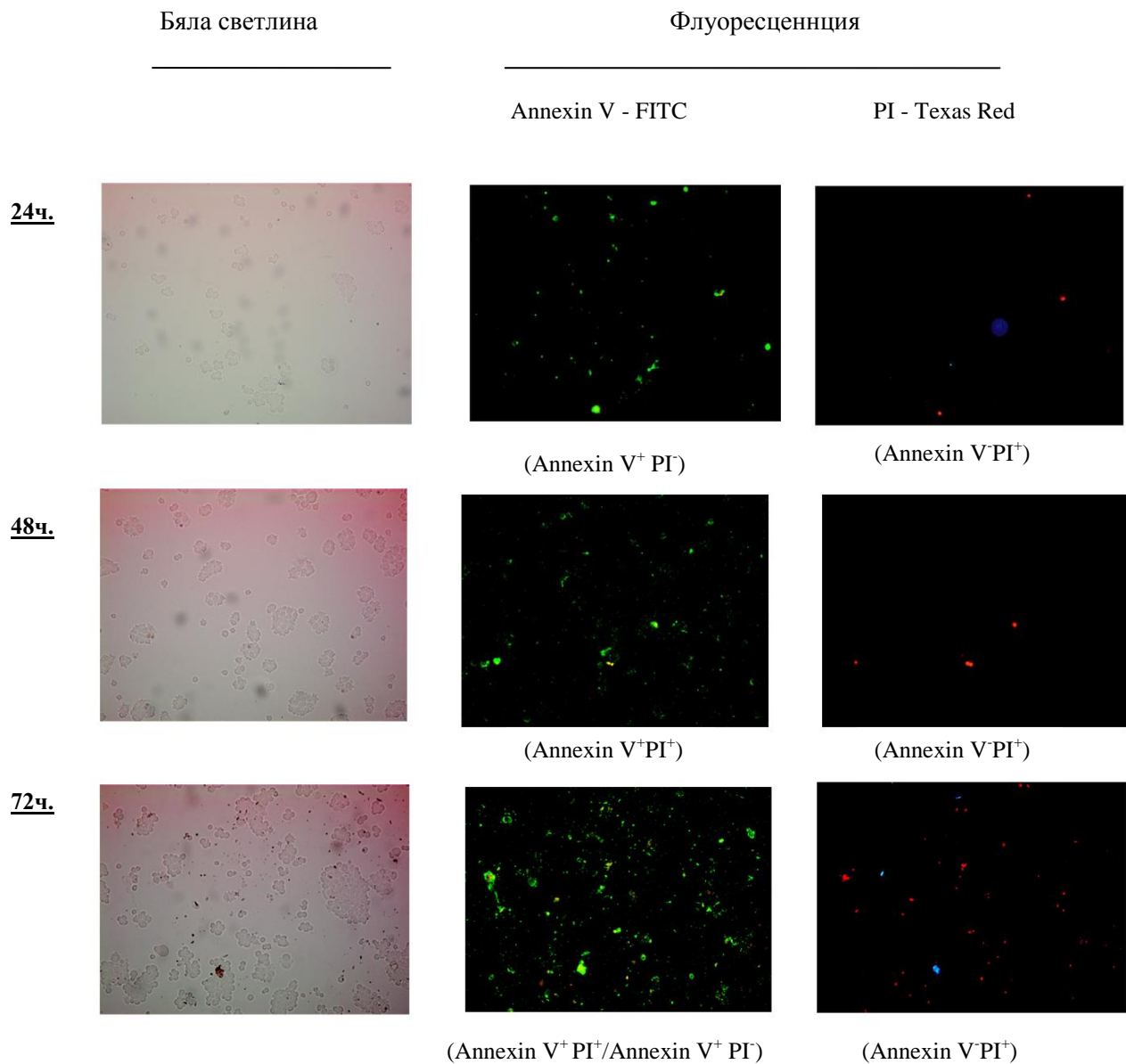
клетки при третирането им с тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris* L. при концентрация 15 μg ТТ/sТТ на ml среда. Доказателство за наличие на апоптотични процеси в MCF7 линията след въздействие с ТТ/sТТ беше наличието на туморни клетки с морфологични аномалии, асоциирани както с ранна апоптоза (зелен сигнал – Фиг.13Б), характеризираща се с променена пространствена локализация на мембранните рецептори за фосфатидилсерин и образуване на изпъкналости в клетъчната повърхност, така и на туморни клетки в късна апоптоза (зелен/червен сигнал – Фиг.13В) - с фрагментирани ядрени и плазмени мембрани.



Фигура 13. Микроскопски анализ на третираните с тотален екстракт от *Tribulus terrestris* L. ракови клетки при концентрация 15 μg ТТ на ml среда за 24 часа: А - MCF7 клетки с нормална морфология и апоптотични (бяла светлинна); Б - MCF7 клетки в ранна апоптоза (Annexin V⁺ PI⁻), наблюдавани с филтър FITC - (560-600nm); В - MCF7 клетки в късна апоптоза (Annexin V⁺ PI⁺), наблюдавани с филтър FITC - (560-600nm); Г - MCF7 клетки в некроза (Annexin V⁻ PI⁺), наблюдавани с филтър Texas Red (595-605 nm).

Резултатите от флуоресцентно-микроскопския анализ показаха пропорционално нарастване на броя на туморните клетки в апоптоза с увеличаване на периода на третиране. Тази зависимост беше установена както по

отношение на анализите, проведени с тоталния екстракт (Фиг. 14), така и по отношение на тези със sTT фракцията.



Фигура 14. Микроскопски анализ на третиран с тотален екстракт от *Tribulus terrestris L.* ракови клетки при концентрация 15 µg TT на ml среда за 24, 48 и 72 часа (наблюдение на едно и също зрително поле)

Най-много туморни клетки в апоптоза бяха намерени при третиране за 72 часа с sTT фракцията.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Съгласно съвременните представи, канцерогенезата при РМЖ включва загуба на контрол над клетъчния цикъл като резултат от генетично и/или епигенетично обусловено инактивиране на туморно супресорните гени и/или активиране на прото-онкогените. По наше знание, до този момент няма данни за генетичния и епигенетичен статус на *ATM* и *CHEK2* туморно супресорните гени при български болни с РМЖ. В тази връзка в дисертационния труд е изучен мутационният спектър и профилът на метилиране в промоторната област на *ATM* и *CHEK2* гените при български пациенти с РМЖ. Направена е и оценка на тяхното прогностично значение за канцерогенезата на рака на млечната жлеза.

5.1. *ATM* генът като прогностичен фактор за канцерогенезата на РМЖ

5.1.1. Особености на мутационния спектър на *ATM* гена

ATM генът е важен сензор за двойноверижни скъсвания в ДНК и осигурява активен надзор във всеки от контролните пунктове на клетъчния цикъл. Генът е изучен при болни с рядкото автозомно рецесивно заболяване Ataxia Telangiectasia (A-T), характеризиращо се с тежък клиничен статус и увеличен риск за развитие на карциноми, в това число и РМЖ. Понастоящем, в базите от данни са описани над 3000 изменения в *ATM*. Мутациите възникват по цялата дължина на гена, без да са характеризирани горещи точки. Във връзка с РМЖ мутациите са предимно герминативни и от типа мис-сенс. Значително по-рядко са описани и соматични мутации с доста ниска честота. Ролята на *ATM* гена, като асоцииран с РМЖ, все още не е напълно изяснена и е твърде дискуссионна. Причината за това е ниската мутационна честота на измененията при болни извън А-Т фамилията и значителната големина на кодиращата последователност.

В настоящото изследване чрез PCR-SSCP-Секвенционен анализ, проведен в група от 145 пациенти с РМЖ от българската популация, са намерени общо 11 мутации в *ATM* гена (7.6%). Установената за българската популация честота е съизмерима с тази, установена при други анализирани популации. Резултатите от молекулярно-генетичния скрининг определят мутационния спектър на *ATM* гена при българските пациенти с РМЖ като твърде хомогенен. Регистрираните изменения са локализирани единствено в екзони 15 и 39 и са само от типа базови субституции, водещи до аминокиселинна замяна в АТМ протеина (мис-сенс): две - Ser707Pro, пет Asp1853Asn и четири Asp1853Asn в комбинация с IVS38 -

8T>C интронен вариант. Установените мис-сенс варианти не засягат функционалните домени на ATM протеина.

Кодон 707 е обект на чести аномалии при болни с рак на млечната жлеза и яйчниците. Субституцията Ser707Pro в хомозиготно състояние не води до А-Т. Въпреки това се предполага, че вариантът има ефект върху стабилността на матричната РНК (Dombrowsky SL et al., 2008). Има данни за достоверна връзка на Ser707Pro варианта с риска за РМЖ. За мутантния вариант Asp1853Asn е предположен негативен ефект във връзка със сплайсинга на базата на установен при болните носители аберантен транскрипт (Thorstenson YR et al., 2003). Има данни за достоверна взаимовръзка на Asp1853Asn мутацията с повишение на риска за развитие на РМЖ, както и някои други карциноми. Предполага се, че комбинацията на Asp1853Asn и IVS38-8T>C в *cis* позиция оказва коригиращ ефект върху сплайсинга. Предположението е базирано на липсата на аберантен ATM транскрипт при болните с двойно мутантния генотип. Нашите данни показваха, че интронният вариант IVS38 -8T>C винаги присъства в комбинация с Asp1853Asn.

5.1.2. Връзка на мутантния *ATM* статус с клиничните показатели, преживяемостта и риска от летален изход на болните с РМЖ

Понастоящем, данните за прогностичното значение на *ATM* гена във връзка с РМЖ са непълни и доста противоречиви. Нашите резултати показваха, че *ATM* мутантният статус се свързва с някои от класическите клинично-патологични показатели, включително ниска степен на малигненост и лобуларен хистологичен тип на тумора, както и с молекулярно-генетични характеристики, като позитивен статус на *PIK3CA* прото-онкогена.

Степента на малигненост е основен белег за агресивността на злокачествения процес и важен фактор за прогнозата и терапевтичното поведение на карциномите. Известно е, че докато болните с тумори с G1 степен на диференциация преживяват в над 90% от случаите, преживяемостта на болните с тумори с G3 степен е понижена до 30%. Преобладаването на високо и умерено диференцирани тумори при болните с *ATM* мутация предполага благоприятна клинична картина и прогноза. Налага се и предположението, че *ATM* мутациите възникват предимно на по-ранен етап от канцерогенезата.

Хистологичният тип на тумора е класически прогностичен фактор, обвързан с общата преживяемост. Смята се, че инвазивният дуктален карцином е по-неблагоприятен хистологичен белег в сравнение с лобуларния, поради по-често

изразената при него мултифокалност, синхронно ангажиране на другата млечна жлеза и по-чести локални рецидиви. Увеличената честота на лобуларния карцином при болните с *ATM* мутация е друг показател за благоприятна прогноза.

Известно е, че съществува връзка между гените, осигуряващи контролните нива в клетъчните сигнални вериги в отговор на геннотоксичен стрес. *ATM* и *PIK3CA* принадлежат към обща *PIK* киназна суперфамилия и между тях съществува функционална връзка. Вероятно при възникване на повреди в *ATM*, в клетъчните сигнални пътища се генерира нестабилност, нарушават се репаративните механизми и се натрупват грешки в други сензори, медиатори или ефектори.

Анализът на общата преживяемост показва липса на достоверна взаимовръзка с *ATM* мутантния статус. Достоверно понижаване в преживяемостта беше установено само в подгрупата с негативен ER рецептор и позитивен *ATM* статус. Известно е, че пациентките с РМЖ с позитивен статус на хормоналните рецептори имат добра прогноза и обща преживяемост след прилагане на хормонотерапия. В тази връзка съществува вероятност ефектът на *ATM* мутациите върху общата преживяемост да се извява само при болните с негативен ER статус. При болните с позитивен ER и *ATM* статус, ефектът на *ATM* аберантната форма вероятно се маскира от проведеното при тях ефективно хормонолечение.

В допълнение към сравнително благоприятния клиничен статус на болните с позитивен *ATM* и липсата на понижение в общата преживяемост, при тях не беше установено и увеличение на риска за смъртен изход. Вероятно обяснение за тази благоприятна прогноза е установеният при еднофакторния анализ протективен ефект на позитивният ER статус и ефективността на приложената хормонална терапия при тези болни.

Наскоро в ограничен брой научни публикации беше предположено, че наличието на аберантно хиперметиране в промоторната област на *ATM* гена е вероятен епигенетичен фактор за неговото инактивиране. Към момента данните за статуса на метилиране на *ATM* гена във връзка с канцерогенезата при РМЖ са твърде ограничени и противоречиви. Преобладават данните за липса на аберантен профил на метилиране в промотора на *ATM* гена при болни със спорадичен карцином на млечната жлеза. Нашите данни също показват липса на аберантно хиперметиране в промотора на *ATM* гена, което предполага по-

голяма значимост на генетичните изменения за канцерогенезата при РМЖ. Може да се предположи, че други епигенетични механизми като хистоновите модификации, мРНКи и т.н. повлияват функционалната активност на *ATM* в процесите на туморогенезата.

5.2. *CHEK2* генът като прогностичен фактор за канцерогенезата на РМЖ

5.2.1. Особености на мутационния спектър на *CHEK2* гена

CHEK2 туморно супресорният ген има водеща роля в регулацията на клетъчния цикъл и апоптозата. Независимо от интензивните изследвания през последното десетилетие, цялостният мутационен спектър и клинично значение на гена във връзка с канцерогенезата все още не са напълно изяснени. Понастоящем *CHEK2* мутационният спектър може да бъде определен като твърде хетерогенен, както по отношение на честота и типа на намерените мутации, така и по отношение на тяхната популационна принадлежност. Липсват обособени горещи точки с висока мутационна честота. Няколко мутантни варианти, умерено асоциирани с повишен риск за развитие на РМЖ са намерени и характеризирани: *1100delC*, *1157T*, *S428F*, *IVS2+1G>A* и *del5395*. Тези варианти показват специфика в популационната си изява и не са установени във всички проучени популации в световен мащаб.

До този момент няма данни за *CHEK2* мутационния спектър при български пациенти с РМЖ. Резултатите, представени в дисертацията, са първите за българската популация по отношение на рака на млечната жлеза. Намереният спектър на измененията в *CHEK2* показва добре изразена специфичност при българските пациенти. Прави впечатление, че най-честите и най-добре характеризирани мутантни варианти липсват при българските пациенти от проучваната група. Нещо повече - в настоящето изследване бяха намерени три нови типа мутации, нерегистрирани и неописани в базите от данни: *Glu79Glu* (A→G), *Thr476Met* (C→T), *Ala507Gly* (C→G). Общата мутационна честота на намерените изменения в *CHEK2* гена в групата от 145 болни възлизаше на 9.65%, като базовата замяна A→G (*Glu79Glu*) е със значителна честота 6.20% (9/14). Може да се предположи, че този мутантен вариант се асоциира с известна специфичност по отношение на българската популация. Първостепенна задача при бъдещи изследвания е да бъде валидиран статусът и честотата на този мутантен вариант в представителна контролна група включваща голям брой здрави лица.

Данните показват, че от трите типа установени в изследването изменения в *CHEK2*, само мутацията Thr476Met (C→T) засяга функционално ангажиран домен в *CHEK2* протеина. Тази мис-сенс мутация променя аминокиселинния състав в киназния домен и вероятно е свързана с нарушение в основната функция на белтъка. Останалите две мутации са локализирани в зони извън функционалните домени и е възможно те да оказват влияние върху стабилността на мРНК, конформацията на белтъка и/или взаимодействието им с останалите таргетни метаболити.

5.2.2. Връзка на мутантния *CHEK2* статус с клиничните показатели, преживяемостта и риска за летален изход на болните с РМЖ

Наличните данни относно клиничното значение на *CHEK2* обхващат само добре известните мутантни варианти. Резултатите от проведените тук анализи показаха, че *CHEK2* статусът достоверно се свързва с някои от класическите клинично-патологични показатели, включително лобуларен хистологичен тип на тумора и позитивен статус на PR рецептора, както и с някои молекулярно-биологични характеристики, като *ATM* мутантния статус. Както вече беше дискутирано лобуларния хистологичен тип на тумора и позитивният статус на хормоналните рецептори се асоциират с добра прогноза и с добра обща преживяемост на болните.

Известно е, че *CHEK2* киназата директно взаимодейства с някои от ключовите участници в сигналните пътища, които регулират клетъчния отговор при генотоксичен стрес, включително *ATM* киназата. В настоящото изследване ние намерихме интересна взаимовръзка между *CHEK2* мис-сенс мутациите и *ATM* мутантния статус. При инактивиране на *ATM* киназата тя губи способността да предава сигнала при възникване на ДНК повреда. Това създава база за нарушения в сигналните пътища и репаративните механизми, натрупване на изменения в ТСГ и прото-онкогени и е предпоставка за инициране на туморогенен процес.

Независимо от благоприятните клинични параметри на болните с позитивен *CHEK2* мултифакторният анализ показва независимо 3.295 пъти увеличение на относителния риск за смърт от РМЖ при пациентите с *CHEK2* изменения (95% CI 0.850-12.778, $p = 0.085$). Този резултат беше подкрепен и от данните на Kaplan-Meier анализа, които показват намаляване на общата преживяемост при пациентите с установени *CHEK2* изменения.

Редица научни изследвания предполагат участието на епигенетични изменения в загубата на функция на *CHEK2*. По отношение на РМЖ данните са ограничени и показват липса на аномално промоторно хиперметиране в този ген. Нашите данни също не показват различия в профила на метилиране при изследваните туморни проби и отрицателни контроли. Това предполага, че епигенетичното хиперметиране вероятно не участва в патогенезата на РМЖ. И в този случай може да се допусне участието на други епигенетични механизми, повлияващи функционалната активност на *CHEK2* в процесите на туморогенезата.

5.3. Оценка на антитуморната активност и апоптотичния потенциал на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris L.* във връзка с РМЖ

Съвременна насока в антитуморната терапия е проучването на цитотоксичната и антипролиферативна активност на природни продукти и лечебни растения с доказани фитохимични свойства и фармакологично значение. Постигане в това отношение е разработването на лекарствени препарати като: винбластин и винкристин (*Catharanthus roseus*), паклитаксел (*T. brevifolia*), силвестрол (*Aglaia foveolata*) и др. Всички тези медикаменти успешно се прилагат при терапията на редица злокачествени заболявания, включително и при рака на млечната жлеза. Понастоящем голяма част от лекарствените препарати имат естествен произход. В резултат от благоприятните климатични условия българските билки съдържат висок процент биологично активни вещества и имат значителен фармакологичен потенциал.

Най-нови данни показват наличие на цитотоксичен ефект на китайското лечебно растение *Tribulus terrestris L.* Активните компоненти на билката са стероидните сапонини. Съдържанието и типът им в представителите от различните географски области силно варира в зависимост от характера на климата и релефа. Сапонините са голяма група глюкозиди, отличаващи се с редица биологични активности, включително: хемолитична, антимикробна, цитотоксична, антитуморна. Известно е, че стероидните сапонини принадлежат към класовете сапонини с най-висок антитуморен потенциал. Българската билка *Tribulus terrestris L.* е изключително богата на активни стероидни сапонини (фуростанолови – протодиосцин и прототрибестин и в по-малка степен спираностанолови – диосцин, псевдопротодиосци и др.). Данните за

биологичната активност на българската билка се ограничават до публикации на Neychev VK (Neychev VK et al., 2007) и Ivanova A (Ivanova A et al., 2009). Първите автори разглеждат ефекта на сапониновата фракция от *Tribulus terrestris* L. върху нормални човешки фибробласти, а другите акцентират върху ефекта на отделни сапонини върху трансформирани миши лимфомни клетки. До момента няма данни за паралелен анализ на антитуморния ефект на тотален екстракт и сапонинова фракция от българското растение *Tribulus terrestris* L. върху туморна и нормална клетъчни линии. Данните в дисертационния труд са първите в тази насока и показваха, че тоталният екстракт от ТТ има изразен дозозависим инхибиторен ефект върху преживяемостта на туморни клетки от РМЖ. По отношение на нормалната клетъчна линия, по-ниските концентрации от ТТ умерено понижават преживяемостта, без изразен дозозависим ефект. Сапониновата фракция има по-силен инхибиторен ефект върху преживяемостта на туморните клетки спрямо тоталния екстракт.

Молекулярните механизми на действие на биологично активните вещества от растенията се свързват с потискане на клетъчната пролиферация и/или с инициране на апоптоза. Индукцията на апоптоза в раковите клетки се възприема като ефикасна стратегия в таргетната терапия на рака за блокиране на прогресията и ограничаване на канцерогенетичните процеси. Ядрените изменения са най-честите отличителни белези на апоптотичния процес. Проведеният тук флуоресцентно-микроскопски анализ потвърди наличие на морфологични промени в раковите клетки, третирани с тотален екстракт и сапонинова фракция на ТТ, което се свързва с релокализацията на мембранните рецептори като индикация за ранна апоптоза. Беше установено, че тези изменения са зависимими от периода на третиране и относителният им дял се увеличава с нарастване на периода на въздействие. Фрагментирани ядрени и плазмени мембрани като индикация за късна апоптоза в туморните клетки също бяха отчетени.

Апоптозата се асоциира с активирането на клетъчните ендонуклеази, чиято активност определя фрагментацията на ДНК до добре диференцирани фрагменти, които могат да бъдат отчетени при електрофореза. Нашите данни показваха, че след третиране с тотален екстракт или със сапонинова фракция от ТТ, ДНК фрагментацията се наблюдава както в туморните, така и в нормалните клетки. Нивото на фрагментацията е по-високо при туморните клетки. Това наблюдение е в съгласие с данните от МТТ анализа, които показваха по-силно понижаване в

преживяемостта на туморната и минимално - в нормалната клетъчна линия. Установено беше, че с увеличаване на периода на третиране, както с тоталния екстракт, така и със сапониновата фракция, нивата на фрагментация на ДНК в туморните клетки леко се повишават. Вероятно обяснение на тези резултати е обстоятелството, че ДНК фрагментация, визуализирана на агарозна гел-електрофореза може да бъде отчетена само при значително и повсеместно накъсване, което настъпва в по-късните етапи на апоптозата. Значение за изявата на апоптотичните процеси в третираните ракови клетки вероятно има и химичният състав и различният механизъм на действие на активните компоненти в растителните фракции, чийто антитуморен ефект се оценява. Предвижда се в бъдеще да бъдат проведени и други методи за анализ на апоптотичните процеси като *FACS*, *RT-PCR*, *Western blot* и др.

В допълнение, може да бъде допуснато и участие на други механизми в основата на действието на ТТ, обусловени от специфичния състав на билката. Такъв потенциален механизъм например може да бъде нарушаването на нормалните междуклетъчни взаимодействия, вероятно в резултат от промяна в рецепторите по клетъчната повърхност.

VI. ИЗВОДИ:

Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Мутационната честота в *ATM* гена при анализирани български пациенти с РМЖ възлиза на 7.6%. Спектър на мутациите е хомогенен, като те са локализирани единствено в два от изследваните екзони и са само от типа базови замени, водещи до мис-сенс аминокиселинни замени. Епигенетично промоторно хиперметиране в *ATM* гена не е установено.

2. Болните с мутантен *ATM* имат предимно благоприятни клинични характеристики: тумори с ниска степен на малигненост и лобуларен хистологичен тип. Мутантният *ATM* статус се свързва със статуса на *PIK3CA* прото-онкогена. При пациентите с *ATM* мутация не е отчетено понижение на общата преживяемост, освен в подгрупата с негативен ER рецептор.

3. Мутации в *CHEK2* гена присъстват при 9.65% от изследваните болни с РМЖ. Спектърът на измененията е специфичен за българските пациенти. Мутациите са базови замени, водещи до синонимни или мис-сенс аминокиселинни замени. Всички мутации са нови – нерегистрирани в базите от данни. Аберантно метилиране в промотора на *CHEK2* гена не е установено.

4. Мутантният *CHEK2* статус се свързва с благоприятни клинични характеристики: позитивен PR рецептор и лобуларен хистологичен тип. Въпреки това, болните с мутация в *CHEK2* имат повишен риск за летален изход от болестта. В подгрупата с мис-сенс изменения в *CHEK2* преобладават *ATM* позитивните болни.

5. Тоталният екстракт от *Tribulus terrestris L.* има изразен дозозависим инхибиторен ефект върху преживяемостта на клетки от тумори на млечната жлеза. Този ефект е по-висок под действие на сапониновата фракция.

6. В механизмите на антитуморната активност на българския *Tribulus terrestris L.* участват апоптотични процеси. Като маркери за ранна и късна апоптоза в туморните клетки след третиране се наблюдават морфологични изменения и фрагментация на ДНК.

ПРИНОСИ:

1) За първи път е анализиран генетичният статус и профилът на епигенетично метилиране в *ATM* и *CHEK2* гените при български пациенти с РМЖ. Приведени са доказателства, че *ATM* и *CHEK2* са ангажирани в етиологията на рака на гърдата, като в инактивирането им участват генетични механизми. Резултатите допринасят за оценката на прогностичното значение на *ATM* и *CHEK2* гените.

2) Получените резултати са първите, показващи наличие на антитуморна активност на българското лечебно растение *Tribulus terrestris L.* в *in vitro* условия и дават насока за бъдещи изследвания, целящи детайлна оценка на фармакологичния му потенциал.

ЛИТЕРАТУРА:

- Ahmad NN, Cu-Unjieng AB, Donoso LA. Modification of standard proteinase K/phenol method for DNA isolation to improve yield and purity from frozen blood. *J Med Genet.* 1995; 32(2):129-30.
- Ai L, Vo QN, Zuo C, Li L, Ling W, Suen JY, Hanna E, Brown KD, Fan CY. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(1):150-6.
- Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrillov IG, Georgieva EI. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136:1657-69.
- Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol.* 2008; 26(18):3057-62.
- Dong X, Wang L, Taniguchi K, Wang X, Cunningham JM, McDonnell SK, Qian C, Marks AF, Slager SL, Peterson BJ, Smith DI, Chevillie JC, Blute ML, Jacobsen SJ, Schaid DJ, Tindall DJ, Thibodeau SN, Liu W. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(2):270-80.
- Ganzer M, Bedir E, Khan IA. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *J Pharm Sci.* 2001; 90(11):1752-8.
- Ivanova A, Serly J, Dinchev D, Ocsovszki I, Kostova I, Molnar J. Screening of some saponins and phenolic components of *Tribulus terrestris* and *Smilax excelsa* as MDR modulators. *In Vivo.* 2009; 23(4):545-50.
- Liu WD, Zhong BY, Zhang YD, Choi GS. Mutation analysis of the checkpoint kinase 2 gene in colorectal cancer cell lines. *Chin Med J (Engl).* 2007; 120(23):2119-23.
- Neychev VK, Nicolova E, Zhelev N, Mitev VI. Saponins from *Tribulus terrestris L.* Are Less Toxic for Normal Human Fibroblasts than for many Cancer Lines: Influence on Apoptosis and Proliferation. *Experimental Biology and Medicine.* 2007; 232:126-133.
- Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, Muhr D, Wayne TL, Chu G, Davis RW, Wagner TM, Oefner PJ. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003; 63:3325-3333.
- Williams LH, Choong D, Johnson SA, Campbell IG. Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(23):6967-72.
- Zheng L, Wang F, Qian C, Neumann RM, Chevillie JC, Tindall DJ, Liu W. Unique substitution of CHEK2 and TP53 mutations implicated in primary prostate tumors and cancer cell lines. *Hum Mutat.* 2006; 27(10):1062-3.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА:

В списания с IF:

1. **Angelova SG**, Markov TsL, Georgieva EI (2008) Frequency and spectrum of ATM mutations in Bulgarian breast cancer patients. *Compt Rend Acad Bulg Sci.* 61:1583-1592. (IF 0.106)

2. Bozhanov S*, **Angelova S***, Krasteva M, Markov Ts, Christova S, Gavrilo I, Georgieva E (2010) Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136 (11): 1657-1669. (IF 2.46)

(*Stefan S. Bozhanov and **Svetla G. Angelova** have contributed equally to this work)

3. Angelova SG, Krasteva ME, Gospodinova ZI, Georgieva EI (2012) Chek2 gene alterations independently increase the risk of death from breast cancer in Bulgarian patients. *Neoplasma* 59, 6:622-630. (IF 1.44)

В научни форуми с доклади, публикувани в пълен текст:

1. **Angelova S**, Krasteva M, Bozhanov S, Markov Ts, Nikolov I, Nacheva M, Gavrilo I, Georgieva E (2005) "Molecular genetic investigations in familial breast cancer". National Conference: "Breast Cancer – Modern Surgical Treatment", 20-22 April, Pleven, p.55-59. Oral presentation.

2. Gavrilo I, Georgieva E, Nacheva M, **S Angelova**, Krasteva M, Bozhanov S, Tzingilev D (2005) "Model for genetic consultation in familial breast cancer". National Conference: "Breast Cancer – Modern Surgical Treatment", 20-22 April, Pleven, p.60-66. Oral presentation.

В научни форуми с постери, доклади и резюмета:

1. **Angelova S**, Bozhanov S, Markov Ts, Krasteva M, Nikolov I, Nacheva M, Gavrilo I, Georgieva E (2004) Mutations in tumor suppressor genes *ATM*, *BRCA1* and *p53* as molecular genetic markers for Breast Cancer. National Oncology Conference "National standards for cancer treatment", 19-21 November, Sofia, p.17, Poster presentation.

2. Nikolov I, Krasteva M, **Angelova S**, Bozhanov S, Markov Ts, Hristova S, Nacheva M, Gavrilo I, Georgieva E (2005) Molecular genetic methods for analysis of tumor suppressor genes and proto-oncogenes in breast cancer. Anniversary Scientific session, 60 Years Medical University of Plovdiv, 10-11 November, Plovdiv, p. 170, Poster presentation.

3. Nacheva M, Gavrilov I, Tzingilev D, **Angelova S**, Krasteva M, Bozhanov S, Georgieva E. Genetic counseling for women at increased familial risk of breast cancer. Balkan Union of Oncology, 6th Congress, 13-16 September 2006, Sofia, p.9, Oral presentation.

4. Antov G, Krasteva M, Gospodinova Z, Bozhanov S, **Angelova S**, Markov Ts, Nikolov I, Georgieva E (2008) Analysis of *p53*, *BRCA1*, *ATM* and *VHL* gene methylation in Bulgarian breast cancer patients. Scientific session on molecular biology in memoriam of Acad. Rumen Tsanev, Sofia, p. 29, Oral presentation.

5. **Ангелова С**, Георгиева Е (2009) Мутационни промени в туморно супресорния ген *CHEK2* и тяхното клинично значение за рака на млечната жлеза. Национална научна конференция по генетика в памет на акад. Дончо Костов, 28-30 Октомври, София (Доклад).

6. **Ангелова С**, Господинова З, Кръстева М, Антоу Г, Лозанов В, Божанов С, Георгиева Е (2012) Оценка на антитуморната активност на *Tribulus Terrestris L.* и *Geranium Sanguineum L.* върху туморни клетки *in vitro*. Национална научна конференция с международно участие “Традиции, посоки, предизвикателства”, 19-21 Октомври, Смолян (Приет абстракт).

Цитирания в международни научни източници:

Bozhanov S*, **Angelova S***, Krasteva M, Markov Ts, Christova S, Gavrilov I, Georgieva E (2010) Alterations in *p53*, *BRCA1*, *ATM*, *PIK3CA* and *HER2* genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer JCRCO 136 (11): 1657-1669. (*Stefan S. Bozhanov and **Svetla G. Angelova** have contributed equally to this work)

1. Banerjee D (2010) Reinventing Diagnostics for Personalized Therapy in Oncology. *Cancers*, 2, 1066-1091

2. Marcos Euzébio Maciel (2011) Análise da expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* em carcinomas mamários. Universidade Federal do Paraná (Dissertation)

3. Zhang M (2011) Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population: Factors modified breast cancer risk. *European Journal of Cancer Care*. doi:10.1111/j.1365-2354.2011.01308.x

4. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM (2010) The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 4: 751-9.

5. Khani H, Hosseinpourefeizi M, Pouladi N, Chaparzadeh N, Montazeri V, Azarfam P (2012) Detection of p53 gene exons 5 and 6 mutations among East Azerbaijani women with breast cancer. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services*.
6. Tikoo A, Roh V, Montgomery KG, Ivetac I, Waring P, Pelzer R, Hare L, Shackleton M, Humbert P, Phillips WA (2012) Physiological Levels of Pik3ca(H1047R) Mutation in the Mouse Mammary Gland Results in Ductal Hyperplasia and Formation of ER α -Positive Tumors. *PLoS One*; 7(5):e36924.
7. Troxell, Megan L (2012) Phosphatidylinositol-3-kinase pathway mutations are common in breast columnar cell lesions. *Modern Pathology* 25: 930-937. doi:10.1038/modpathol.2012.55
8. Christgen M, Noskowicz M, Schipper E, Christgen H, Heil C, Krech T, Langer F, Kreipe H, Lehmann U (2012) Oncogenic PIK3CA mutations in lobular breast cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer*. doi: 10.1002/gcc.22007.

БЛАГОДАРНОСТ

Особено съм признателна на научният ми консултант гл. ас. д-р Мария Емилева **Кръстева** за помощта в научната дейност, ценните съвети, насърчението, приятелството и безрезервната подкрепа.

Изказвам благодарност за съдействието и доброто отношение на **колектива** на секция "Молекулярна генетика", **Валентин Лозанов**, д-р **Мария Начева**, доц. д-р **Иван Таврилов** и всички останали **колеги** подпомогнали дисертационния труд.

Благодарна съм на **моето семейство** и **приятелите ми** за топлината и грижите.

Нещата се случват с лекота само когато вървиш в желаната от теб посока и следваш личният си път.