МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

ОЦЕНКА НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ РАЗЛИЧНИ ХРАНИТЕЛНИ РЕЖИМИ И ПРИЕМ НА ХРАНИТЕЛНИ ДОБАВКИ

АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА НАУЧНА СТЕПЕН

„ДОКТОР“

НА **Д-Р МАРГАРИТА СТРОКОВА-СТОИЛОВА**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: **ПРОФ. Д-Р ПАВЛИНА ГАТЕВА, ДМ**

ДОЦ. Д-Р ДАНИЕЛА ПОПОВА, ДМ

СОФИЯ

2024 Г.

Дисертационният труд се състои от 149 страници текст (въведение –3 страници, пет глави – 97 страници и изводи – 2 страници) и 10 страници приложения. Библиографията включва 316 източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрата „ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ" към МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ на МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ на 19.04.2024.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 26.09.2024 г. в МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности при МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ, пред научно жури, назначено със заповед на Ректора РК1847/ 26.06.2024 в състав:

1. *Проф. Румен Павлов Николов, дм – Вътрешен член за МУ София, Катедра по фармакология и токсикология на Медицински факултет към МУ София*
2. *Проф д-р Емил Милчев Гачев, дм - Вътрешен член за МУ София, Катедра по фармакология и токсикология на Медицински факултет към МУ София*
3. *Проф д-р Стефка Василева Вълчева – Кузманова, дмн - Външен член за МУ София, Медицински университет Варна*
4. *Проф д-р Мария Ганева Ганева - дм - Външен член за МУ София, Тракийски университет Стара Загора*
5. *Проф д-р Милка Василева Власковска – дмн - дмн - Външен член за МУ София, пенсиониран преподавател повече от пет години от академичния състав на катедра по фармакология и токсикология на Медицински факултет към МУ София*

Резервни членове:

1. *Доц д-р Цветанка Петрова Дончева, дм - Вътрешен резервен член за МУ София, Катедра по фармакология и токсикология на Медицински факултет към МУ София, който става редовен при отсъствие на вътрешен титуляр по горепосочената заповед*
2. *Доц д-р Делян Пенев Делев, дм - Външен резервен член за МУ София, Медицински университет Пловдив, който става редовен при отсъствие на вътрешен титуляр по горепосочената заповед*

СЪДЪРЖАНИЕ НА АВТОРЕФЕРАТА

1. ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 5
1.1. Значимост и актуалност на темата 5
1.2. Цел на дисертационния труд 7
1.3. Задачи на дисертационния труд 7
1.3. Научна хипотеза 8
1.4. Материали и методи 8
1.4.1. Материали и методи, използвани при експерименти с животни 8
1.4.1.1. Изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D 8
1.4.1.2. Изследване нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими 10
1.4.2. Материали и методи, използвани при проучвания при хора 11
1.4.2.1. Изследване на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България 11
1.4.2.2. Изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D 14
2. КРАТКО ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 16
2.1. Резултати от проведените експерименти с опитни животни 16
2.1.1. Резултати от изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D 16
2.1.2. Резултати от изследването на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими 16
2.2. Резултати от проведените проучвания с хора 24
2.2.1. Резултати от изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България 24
2.2.2 Резултати от изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D 28
3. ДИСКУСИЯ 39
3.1. Обсъждания по отношение на проведените експерименти с опитни животни 39
3.1.1 Обсъждания на изследването свързано с промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D 39
3.1.2. Обсъждания по отношение на изследваните нива на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими 42
3.2. Обсъждания по отношение на проведените проучвания при хора 43
3.2.1. Обсъждания по отношение на изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България 43

3.2.2. Обсъждания върху изследването на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D 44
5. ИЗВОДИ 46
5. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 48
6. ПУБЛИКАЦИИ 49
7. БЛАГОДАРНОСТИ 50

1. ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1.1. Значимост и актуалност на темата

Биологичните тъкани се нуждаят от кислород, за да задоволят своите енергийни нужди. Въпреки това, консумацията на кислород също води до генериране на свободни радикали, които могат да имат вредни ефекти върху клетките. Мозъкът е особено уязвим към ефектите на реактивните кислородни видове поради високата му нужда от кислород и изобилието от силно пероксидиращи субстрати. Оксидативният стрес е открит в редица невродегенеративни заболявания и появяващите се доказателства от in vitro и in vivo модели на заболяване предполагат, че играе роля в патогенезата на заболяването.

Оксидативният стрес е състояние, при което балансът между производството на реактивни форми на кислорода (ROS) и нивото на антиоксидантите е значително нарушен и води до увреждане на клетките от прекомерните ROS. ROS може да се насочат към няколко различни субстрата в клетката, причинявайки окисляване на протеин, ДНК, РНК или липидна пероксидация. Продуктите на окисление на полиненаситените мастни киселини, особено арахидоновата киселина и докозахексановата киселина, които са в изобилие в мозъка, са малондиалдехид и 4-хидроксиноненал. ROS атакуват протеините, нарушавайки чрез окисление както полипептидната последователност, така и страничната верига. Те от своя страна реагират със страничните вериги на аминокиселините, за да образува карбонилни производни. ROS атакуват нуклеиновите киселини по редица начини, причинявайки омрежване на ДНК с протеини, разкъсвания във веригата и модификация на пуринови и пиримидинови бази, което води до мутации на ДНК.

Хранителните режими играят ключова роля в регулирането на оксидативния стрес в организма, тъй като различните храни съдържат различни нива на антиоксиданти и хранителни съставки, които могат да влияят на нивата на свободните радикали. Например, консумацията на храни, богати на антиоксиданти, като плодове, зеленчуци и ядки, често може да намали оксидативния стрес в организма, докато диетите с високо съдържание на мазнини обикновено се свързват с увеличен риск от оксидативно увреждане. Също така, приемът на хранителни добавки, като витамини и минерали, може да играе важна роля в балансирането на оксидативния стрес. Например, суплементирането с витамин D има антиоксидантни свойства и може да помогне за намаляването на нивата на свободните радикали в организма.

Витамин C, витамин E, бета-каротин и селен са известни със своите антиоксидантни свойства и могат да помогнат за намаляване на оксидативния стрес.

Интересът към взаимодействието между диетата и генетичната експресия е ключов за разбирането на това как изборът на храни може да влияе върху здравето. Кетогенната диета, която се отличава с ниско съдържание на въглехидрати и високо съдържание на мазнини, е известна със своите потенциални ползи за метаболизма и управлението на теглото. Витамин D е известен със своето важност за метаболизма и здравето на костите, но се изследва все повече и неговото възможно влияние върху генетичната експресия. Изследванията в областта на експресията на гените след кетогенна диета и суплементация с витамин D могат да разкрият нови механизми, чрез които тези фактори могат да влияят върху здравето. Например, може да се открият специфични гени или генетични пътища, които са свързани с регулацията на метаболизма на глюкозата и инсулиновата чувствителност. Изследванията на взаимодействието между храненето и генетиката може да предостави основа за разработване на персонализирани диети и подходи за здравеопазване, които са оптимални за конкретния генетичен профил на индивида.

Оценката на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими и ролята на витамин D може да даде ценна информация за въздействието на различните диети върху здравето и метаболизма, а също така и да покаже как различните хранителни режими влияят на оксидативния стрес и съответно на риска от развитие на различни заболявания, като например метаболитни синдроми, кардиоваскуларни заболявания и диабет тип 2. Такива данни могат да предоставят основа за препоръки за здравословни хранителни режими и добавки за хората.

В настоящата разработка относно изследването на нагласите за онлайн самолечение в контекста на COVID-19 в България е, се установява, че пандемията е променила начина, по който хората търсят и получават медицинска помощ. С ограниченията в движението и опасенията от зараза мнозина са се обърнали към онлайн платформи и услуги за справяне със здравните си проблеми. Този преход към онлайн самолечение може да има както положителни, така и отрицателни страни. От една страна, това предоставя по-удобен и лесен достъп до здравни грижи, особено за хора, които са в рискови групи или се намират на отдалечени места. От друга страна, има опасения за качеството и ефективността на онлайн консултациите и лечението, както и за сигурността на личните данни.

1.2. Цел на дисертационния труд

Нашето проучване има за цел оценка на ефектите на различни хранителни и двигателни режими с фокус върху оксидативния стрес като един от основните патогенетични механизми, свързани с хронични метаболитни заболявания

1.3. Задачи на дисертационния труд

1. Оценка на маркерите на оксидативен стрес при опитни животни, подложени на нисковъглехидратна диета с високо съдържание на мазнини в сравнение с приложено стандартно хранене.
2. Наблюдение и оценка на нивата на маркерите на оксидативен стрес при хора с различни двигателни и хранителни режими.
3. Оценка на протективното въздействие на витамин D.
4. Наблюдение и оценка на влиянието на пандемията COVID-19 върху показателите за здраво състояние на пациентите и връзка с нивата на оксидативен стрес.

Тези основни задачи бяха конкретизирани в четири проучвания, залегнали при разработването на дисертационния труд, както следва:

- Задачи на проучването "*Изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D*": Оценка на експресията на инсулиновия ген в панкреас на мишки, приемащи кетодиета, суплементация с витамин Д или и двете заедно за 1 месец, сравнени с контролна група на стандартна диета.

- Задачи на проучването "*Изследване на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими":* Ооценка на метаболитните показатели, както и нивата на глутатион-пероксидаза като антиоксидантен маркер и на 8-OHdG като прооксидантен маркер при опитни животни, подложени на кетодиета, суплементирани с витамин D, приемащи кетодиета и витамин D едновременно и контролна група на стандатрна диета.

- Задачи на *"Изследване на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България":* Проучване нагласите за онлайн закупуване на лекарствени средства без рецепта и хранителни добавки с лечебно действие с цел установяване на честотата на поръчване на лекарства и добавки за отслабване, на такива са стимулиране

на имунната система, отношението на потребителите към съветите на лекаря и удовлетвореността от използвания продукт, както и нагласите и честотата на докладване на потенциални нежелани реакции.

- Задачи на проучването от "*Изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D*": Оценка на нивата на оксидативен стрес и тези на витамин D при здрави лица над 18 г, с различен хранителен и двигателен режим.

1.3. Научна хипотеза

Нашата хипотеза е, че нивата на оксидативен стрес се влияят от прилагането на различни двигателни и хранителни режими. Очаквахме да установим връзка между нивата на витамин D и тези на антиоксидантните маркери. Очаквахме да установим статистически значими разлики в метаболитните показатели и нивата на про- и антиоксидантни маркери при опитни животни, подложени на нисковъглехидратна диета с високо съдържание на мазнини и тези, с приложено стандартно хранене.

1.4. Материали и методи

1.4.1. Материали и методи, използвани при експерименти с животни

1.4.1.1. Изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D

Поставената цел беше да се оцени експресията на инсулиновия ген в панкреас на мишки, приемащи кетодиета, суплементация с витамин D или и двете заедно за един месец, сравнени с контролна група на стандартна диета.

Четири групи мъжки мишки (n=10 във всяка група) бяха разделени, както следва: на стандартна диета (контролна група), на кетогенна диета, суплементирани с витамин D и приемащи кетодиета с витамин D. След един месец на третиране мишките бяха сакрифицирани според приетите етични стандарти и бяха събрани проби от панкреасна тъкан. Контролната група и суплементираната с витамин D бяха хранени със стандартна лабораторна храна за животни ad libitum. В групата на кетодиета и тази на кетодиета+витамин D стандартната храна за животни беше изцяло заменена с Nutricia KetoCal 4:1 ad libitum. Съдържанието на нутриенти в двата приложени диетични режима е дадено в Таблица 1. Суплементирането с витамин D се извършваше ежедневно с 1 капка 500 UI Vigantol per os. Стандартната лабораторна храна за животни съдържа 2,4 UI/g

витамин D3, а средното количество храна на ден за една мишка е 3,5 g или приблизително 30 UI дневен прием на витамин D на мишка.

Животните бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия. Експериментът се проведе през м. юни. За провеждане на опита беше получено разрешение от Българската агенция по безопасност на храните № 244/25.9.2019.

Панкреасните проби от всички групи бяха използвани за пречистване на обща РНК за експресионен анализ на гена Ins 1 в панкреасните клетки. РНК беше изолирана чрез кит RNeasy Kit (Qiagen). Количество от 500 ng от всяка РНК проба беше подложено на обратна транрскрипция до кДНК (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen).

Таблица 1. Макронутриенти и калориен състав на използваните диети

	Nutricia KetoCAL 4:1	Стандартна храна за гризачи
Нутриенти	**Per 100 g**	**Per 100 g**
Енергия, kcal (kJ)	705(2950)	335 (1400)
Протеини, g	14,4	20
Въглехидрати, g	8,2	59,4
Мазнини, g	69,2	4,8

Използвани бяха праймери RT^2 qPCR Primer Assay for Mouse Ins 1 (Qiagen). Амплификацията чрез PCR в реално време (RT-PCR) беше извършена с Rotor-Gene инструмент. Общият обем на всяка реакция е 25 pl с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условията на амплификация на всеки RT-PCR цикъл са както следва: реакция на денатуриране при 94°C за 15 секунди, етап на праймер анийлинг при 55°C за 30 секунди, последвано от удължаване на праймера - 72°C за 30 sec. Нивата на експресия на Ins 1 бяха нормализирани към GAPDH, използвайки ΔCт калкулациите. Изчислена беше относителната експресия на Ins 1 във всяка група спрямо експресията на този фактор при контролите. Пробите бяха изследвани под ръководството на проф. И. Димова в Катедрата по медицинска генетика на МУ-София.

1.4.1.2. Изследване нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими

80 броя опитни животни (мъжки ICR мишки) бяха резделени на четири групи (n=20 във всяка група) и бяха подложени на различни хранителни режими и суплементиране за 30 дни:

- Група 1– кетодиета (KetoCAL 4:1 at libidum).
- Група 2 - кетодиета + витамин D (KetoCAL 4:1 at libidum + 1 капка 500 UI Vigantol per os дневно).
- Група 3 – витамин D (1 капка 500 UI Vigantol per os дневно).
- Група 4 – контролна група на стандартна диета at libidum.

Използвани бяха същите храни, както при първия експеримент (вж. таблица 1).

Теглото на опитните животни беше измервано веднъж седмично. В края на експеримента беше измерено и общото нарастване на тегло, както и ръстът и циркумферентна обиколка на корема на опитните животни. Животните бяха отглеждани при стандатрни лабораторни условия. Експериментът се проведе през месец ноември 2021. За провеждане на опита беше получено разрешение от Българската агенция по безопасност на храните № 316/15.10.2021.

Шест броя мишки - една от група 2 (кетодиета + витамин D) и пет от група 4 (контролна група) не доживяха до края на експеримента поради канибализъм от страна на другите опитни животни. Крайните данни от изследването обхващат 74 броя мишки.

След 30 дневно третиране, мишките бяха сакрифицирани според приетите етични стандатри и бяха взети кръвни проби.

Метаболитните показатели (нива на глюкоза в кръвта, кетотела и холестерол) бяха изследвани от кръвни проби в края на експеримента. Изследването се осъществи с апарат с тест ленти Wellion GALILEO.

Нивата на инсулин в кръвта са измерени чрез Mouse Insulin Ultra Sensitive ELISA Kit. Пробите за инсулин бяха съхранявани при -80°C и беше определен в Катедрата по биология на МФ, МУ-София под ръководството на проф. Димитрова-Диканарова по метода ELISA, при спазване на инструкциите на производителя на кита.

Нивата на глутатион-пероксидазата в кръвния серум бяха изследвани като антиоксидантен маркер. Използван беше Mouse Glutathione Peroxidase (GSH-PX) Quantitative sandwich ELISA kit. Нивата на витамин D / бяха изследвани при използване на Mouse 25-OH Vitamin D (25OHVD) ELISA Kit. Нивата на глутатион-пероксидазата, 8-хидрокси-дезоксигуанозина и витамин D бяха измервани в Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт под ръководството на проф. Райко Пешев.

Статистика

Данните са анализирани със статистически софтуер MedCalc Version 20.116. Данните се проверяват за нормалност на разпределението и за еднаквост на вариациите и в съответствие с резултата са анализирани с параметричния one-way ANOVA или с непараметричния Kruskal-Wallis test. Като ниво на статистическа значимост е възприето $p<0.05$. За идентифициране на групите, които се различават статистически значимо, е приложен post-hoc анализ съответно с тест на Tukey или с тест на Dunn. Посредством множествена линейна регресия беше оценена зависимостта на 8-OHDG от глутатион-пероксидазната активности и от нивото на витамин D.

1.4.2. Материали и методи, използвани при проучвания при хора

1.4.2.1. Изследване на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България

Наднорменото тегло и затлъстяването са основен проблем за общественото здраве, годишно водещ до 2,8 милиона смъртни случая в световен мащаб [340]. При изследване на въздействието на храненето в контекста на глобалната тежест на болестите, лошите хранителни навици са отговорни за повече смъртни случаи, отколкото всеки друг рисков фактор при незаразните болести, с изключение на тютюнопушенето. Затлъстяването (повишен индекс на телесната маса) и свързаните с него усложнения могат да бъдат предотвратени чрез промени в начина на живот и увеличаване на физическата активност.

Пандемията COVID-19 засегна всички аспекти на здравната система и социалния живот на хората. Изолацията и социалната дистанция проправиха път на редица нови предизвикателства Затруднен беше достъп до здравни заведения и услуги, недостигът и

нередовни доставки на лекарствени средства. Промени се начинът на живот и хранене на населението, движението и спортуването бяха ограничени, а търсенето и ползването на дигиталните канали се увеличи значително [341, 342].

Голямото разпространение на интернет дава на потребителите достъп до огромни информационни ресурси и приложения, където се рекламират различни лекарствени продукти или добавки [343, 344]. В същото време не винаги е ясно как се осигурява и контролира качеството на предлаганите стоки и услуги, както и дали се спазват етичните стандарти [341]. Остава отворен въпросът за верификацията на източниците на информация и съотношението риск/полза.

Методи:

Със съдействието на Easyads ЕООД, онлайн платформа за интернет реклама, беше разработена онлайн анкета от три въпроса с възможни варианти на отговор. За целите на проучването беше използвана технология с HTML5 (Hypertext Markup Language 5 - език за маркиране, за структуриране и представяне на хипертекстови документи в World Wide Web) банери, като в конкретния случай беше програмиран банер-анкета, който измерва и събира данни от потребителското поведение.

Анкетата започва със следния призив: **Твоето мнение е много важно за нас!** Отдели само 30 сек да споделиш своя опит от онлайн пазаруването на добавки и ни помогни с анкетата.

Първи въпрос: **Купувам лекарства или добавки онлайн...**

- За отслабване (група А)
- За усилване на имунитета (група В)
- Не поръчвам онлайн лекарства (група С)
- Потребителят може да избере една от трите посочени възможности. Кликването върху съответния отговор води към нов въпрос.

Втори въпрос група А **...за отслабване, защото**

- Искам да влезна във форма
- Имам здравословни проблеми
- Лекар ми препоръча продукта

Втори Въпрос група В: ..за усилване на имунитета, защото

- Прочетох, че е важно
- Имам здравословни проблеми

- Лекар ми препоръча продукта

Втори въпрос група С: ...не поръчвам, защото

- Имам лош предишен опит
- Нямам доверие на онлайн магазините
- Съветвам се предварително с лекар или фармацевт

Третият въпрос е еднакъв за първите две групи анкетирани:

Трети въпрос (група А и група В): А имаше ли ефект?

- Да, постигнах резултат
- Имаше ефект, но получих нежелана реакция
- Нямаше никакъв ефект

Четвърти въпрос за група А и група В и трети въпрос за група С

- Докладвали ли сте нежеланите реакции?
- Да, на производителя
- Да, на регулаторните власти
- Не

Анкетата завършва със следното послание: Благодарим Ви за участието и за отговорното отношение към Вашето здраве! Всяка информация по безопасността и ефикасността на лекарствата е изключително важна! Можете да докладвате такава информация към регулаторните власти (Изпълнителна агенция по лекарствата за лекарствени продукти и Българска агенция по безопасност на храните за хранителни добавки) или към производителя.

Онлайн покупката на лекарства по лекарско предписание в България не е разрешена, следователно терминът лекарство се използва само за лекарствени продукти без лекарско предписание.

С помощта на EasyDNS анкетата е публикувана за един месец (от 08 май 2020 до 08 юни 2020) в онлайн пространството чрез два основни канала:

1. Lifestyle & Women Websites – www.dama.bg, www.skafeto.com, www.dama.bg, www.kliuki.bg; www.receptitenababa.com; www.vijti.com; www.vsyakajena.com; www.zajenata.bg

2. News Websites – www.actualno.com, www.btvnovinite.bg; www.dnes.bg; www.faktor.bg; www.investor.bg; www.marica.bg; www.money.bg; www.news.bg; www.offnews.bg; www.petel.bg; www.plovdiv24.bg; www.pogled.info; www.standartnews.com

Финансиране на проучването - Изследователят самофинансира научното изследване.

Получаване на разрешение от етична комисия не е приложимо. Данните са събирани анонимно и не съдържат чувствителна информация.

1.4.2.2. Изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D

Направената справка в научната литература посочва наличието на взаимовръзка между начина на живот, дефицита на витамин D и нивата на оксидативен стрес. Оксидативният стрес е ключов фактор за здравето и заболяванията и неговото особено участие в развитието на затлъстяване, захарен диабет тип 2, сърдечно-съдови нарушения, невродегенеративни и други заболявания привличат голямо внимание от научната общност през последните години.

Освен в скелетната минерализация, понастоящем е известно, че витамин D участва в проапоптотични, антиангиогенни, антипролиферативни, продиференциращи, антиинвазивни и антиметастатични биологични процеси. Освен това има и нови доказателства, че витамин D може да има антиоксидантни и противовъзпалителни функции. Суплементирането с витамин D може да предотврати нивата на оксидативен стрес и да подобри възпалението чрез намаляване на липидната пероксидация и производството на цитокини.

Глутатион пероксидазата (GPx) е селенсъдържащ антиоксидантен ензим, който ефективно намалява H_2O_2 и липидните пероксиди съответно до вода и липидни алкохоли и от своя страна окислява глутатиона до глутатион дисулфид. Глутатионът играе основна роля в регулирането на вътреклетъчното окислително-възстановително състояние на съдовите клетки, като осигурява редуциращи еквиваленти за много биохимични пътища.

Различният хранителен и двигателен режим оказва въздействие върху гореописаните показатели. Към момента посочените взаимовръзки не са проучвани системно в България.

Проведено беше проучване върху потенциалната връзка между нивата на глутатион-пероксидаза и тези на витамин D, така и влиянието на начина на живот.

Резултатите от попълването на анкетата насочват и към потенциалното влияние на промените в ежедневието, които пандемията COVID-19 наложи.

Методика:

1. Получаване на положително становище от КЕНИМУС - № 157/12.01.2022 г.
2. В периода 01.12.2021 – 31.03.2022 г., всяко лице над 18 г., което доброволно посещава Медикодиагностичната лаборатория Бодимед за извършване на изследване на ниво на витамин D, е поканено да участва в изследването. Всички, които се съгласяваха да участват в проучването, подписваха ИНФОРМАЦИОНЕН ЛИСТ ЗА УЧАСТНИКА В ИЗСЛЕДВАНЕТО.
3. Изследван брой пациенти – 84.
4. Пациентите получаваха безплатно резултатите от своето изследване на ниво на витамин D, като им беше извършвано допълнително безплатно изследване за нива на глутатион-пероксидаза и са помолени да попълнят анкета за своите хранителни и двигателни навици. Всеки пациент беше завеждан под уникален идентификационен номер, според стандартите на медико-диагностичната дейност на МДЛ Бодимед, по който той/тя получаваше своите резултати.
5. Изследователят получаваше резултатите от изследванията *на всеки п*ациент, както и попълнената от него анкета, по идентификационен номер, без да има достъп до личните данни на пациента.

Определянето на глутатион-пероксидазната активност (фотометрично) и на витамин D (25-OH) (електрохемилуминисцентен метод) се извърши в лаборатория Бодимед.

Статистика

Резултатите са проверявани за нормалност на разпределението и за еднаквост на вариациите. Приложен е корелационен анализ, при сравняване на повече от две групи - еднофакторен ANOVA и post-hoc тест на Tukey или непараметричен Kruskal-Wallis (при липса на нормалност на разпределението) . При сравняване на две групи –параметричен Т-тест или непараметричен Mann-Withey U-тест. Данните са анализирани със софтуер SigmaPlot 11.0.

Финансиране: Изследователят самофинансира научното изследване.

2. КРАТКО ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2.1. Резултати от проведените експерименти с опитни животни

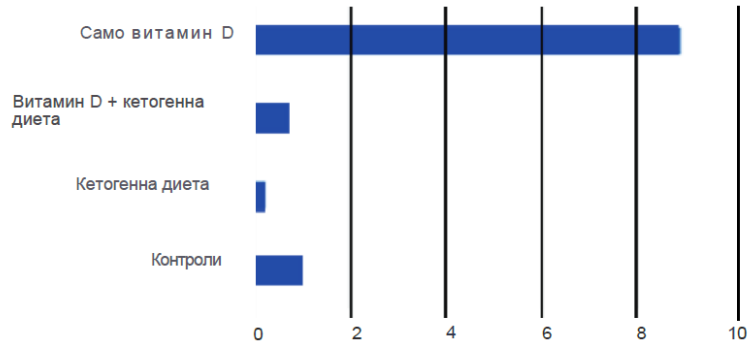
2.1.1. Резултати от изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D

Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета - RQ= 0,24, в сравнение с контролната група

В групата, суплементирана едновременно с витамин D и приемаща кетодиета, се наблюдава по-висока експресия на гена (RQ = 0,73) спрямо групата само на кетогенна диета, но не достигаща тази при контролите

Резултатите от групата само с витамин D показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната група (RQ= 8,9, p = 0,02)

На Фигура 1 са представени обобщените данни от експресионния анализ.



Фигура 1. Относителна панкреасна експресия на инсулиновия ген след различно третиране

2.1.2. Резултати от изследването на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими

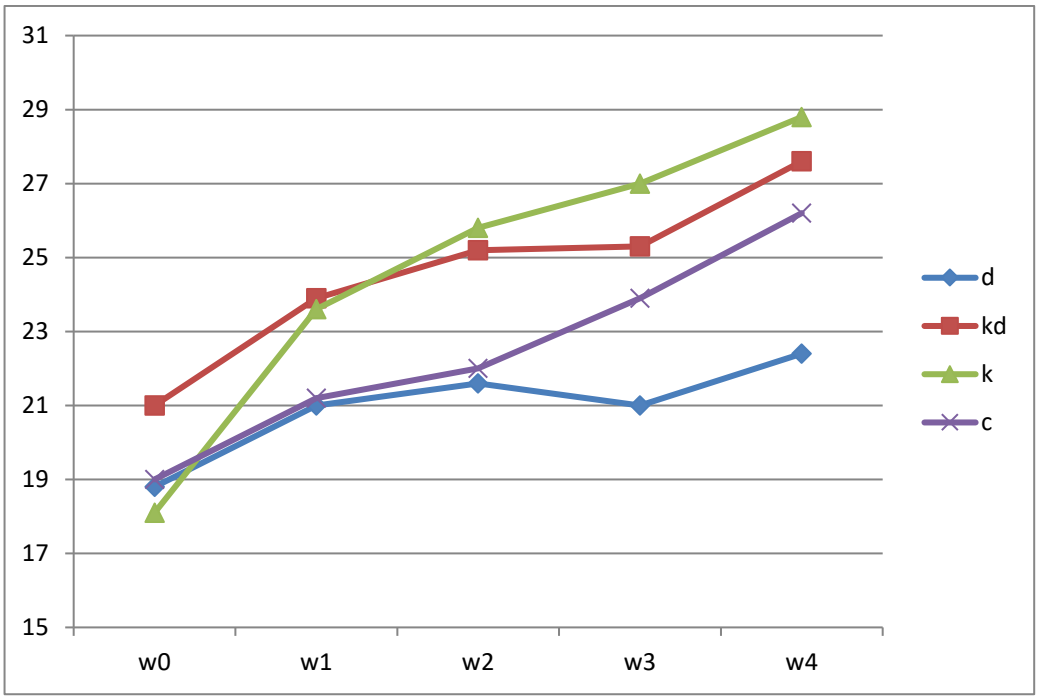
Опитните животни понасят добре всички хранителни режими. Не се наблюдават значителни разлики в наддаването на тегло между изследваните групи.

Динамиката на средното тегло е показана в таблица 2.

Таблица 2. Промени в теглото при различните групи изследвани опитни животни. Данните са представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

Група	Начално тегло (г)	Тегло на 1-ва седмица (г)	Тегло на 2-ра седмица (г)	Тегло на 3-та седмица (г)	Тегло на 4 седмица (г)	Общо нарастване (%)
Витамин D	18,8 ± 3,2	21,0 ± 4,2	21,6 ± 4,4	21,0 ± 4,1	22,4 ± 4,3	19%
Витамин D + Кетодиета	21,0 ± 3,5	23,9 ± 3,6	25,2 ± 3,6	25,3 ± 4,4	27,6 ± 3,00	31%
Кетодиета	18,1 ±4,2	23,6 ± 3,4	25,8 ± 4,0	27,0 ± 2,9	28,8 ± 3,1	59%
Контролна група	19,0 ± 2,4	21,2 ± 4,0	22,0 ± 3,8	23,9 ± 3,9	26,2 ± 3,1	38 %

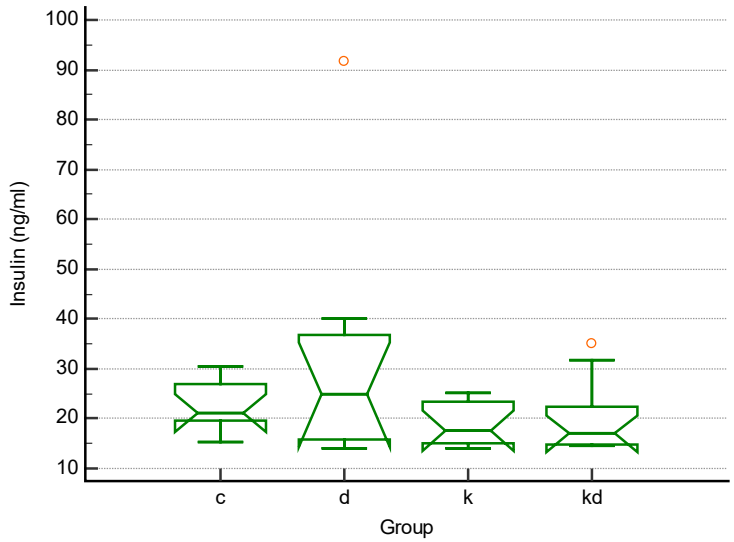
Общата динамика в теглото на опитните животни е показана на фигура 2.



Фигура 2. Промени в теглото след 4-седмично третиране. w0-4 – седмици. Групите са означени, както следва: d – суплементирани с витамин D, kd – суплементирани с витамин D и на кето-диета, к – на кето-диета, с – контроли.

Инсулин

Не се установява статистически значима разлика в нивата на инсулина между групите p=0.288 (Фиг. 3 .)



Фигура 3. Нива на инсулина в четирите групи

Легенда:

C – контрола,

d – суплементирана с витамин Д

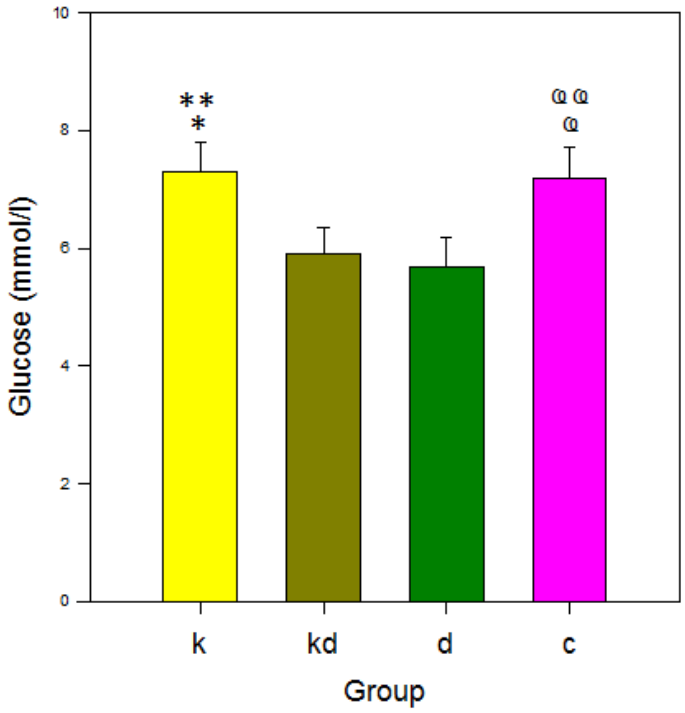
k – на кето-диета

kd – кето-диета +суплементиране с витамин Д

Данните са представени с медианна стойност и 25-75 персентил.

Глюкоза

Установява се статистически значима разлика между групите в зависимост от различния начин на третиране $F(3,76) = 57.29$, $p < 0.001$. Нивото на гликемията е статистически значимо по-ниско в групите, суплементирани с витамин D в сравнение с другите две (Фиг. 4).



Фигура 4. Ниво на глюкозата в кръвта

Легенда:

*- p< 0.001 k спрямо kd

**- p< 0.001 k спрямо d

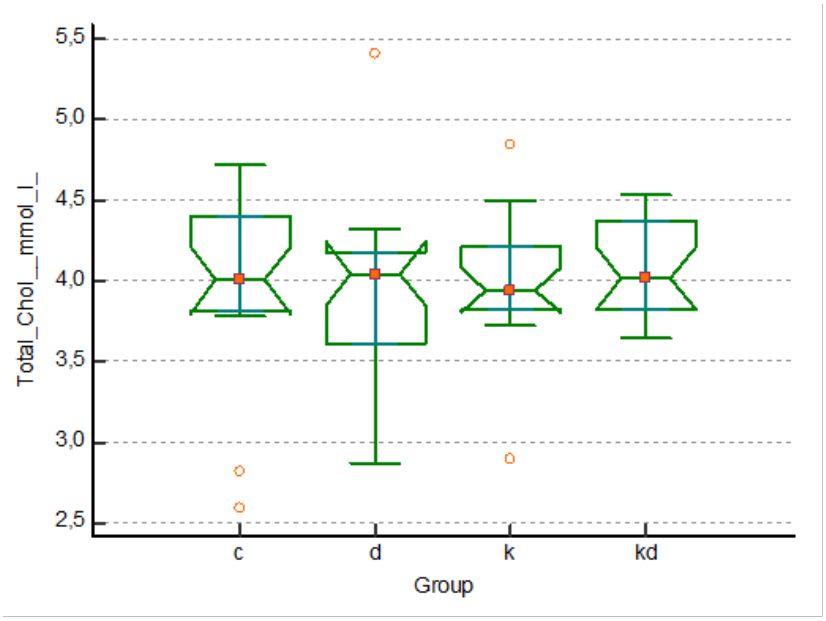
@ - p< 0.001 c спрямо kd

@ @ p< 0.001 c спрямо d.

Означенията на групите са както на фигура 3. Данните са представени като средна стойност и стандартно отклонение. Липсва статистически значима разлика между k и c групите.

Общ холестерол

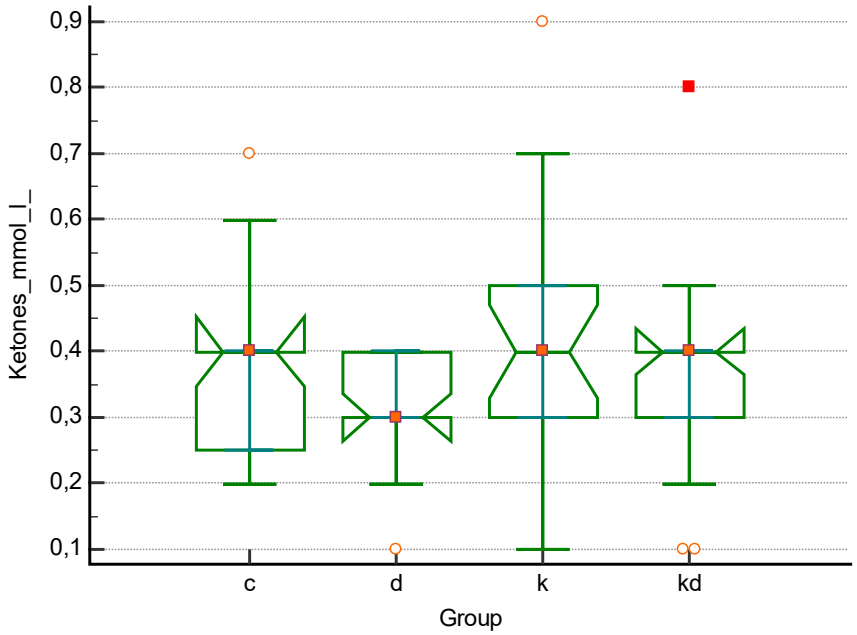
Не се установяват статистически значима разлика (p=0.813) – Фигура 5.



Фигура 5. Общ холестерол. Данните са представени с медианна стойност и 25-75 персентил

Кетотела

Не се установена статистически значима разлика между групите (P = 0,180) – Фигура 6.



Фигура 6. Кетотела в групите. Данните са представени с медианна стойност и 25-75 персентил

Средните серумни нива на про-оксидантни, анти-оксидантни маркери и витамин D, измерени в края на експеримента, за показани в таблица3.

Таблица 3. Серумни нива на лабораторните показатели в различните групи опитни животни. Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение

група	Глутатион пероксидаза (u/l)	8-OHDG (ng/ml)	Витамин Д (ng/ml)
1 (**К**)	136	15	30
2 (**ДК**)	146	10	45
3 (**Д**)	130	13	53
4 (**С**)	97	20	33

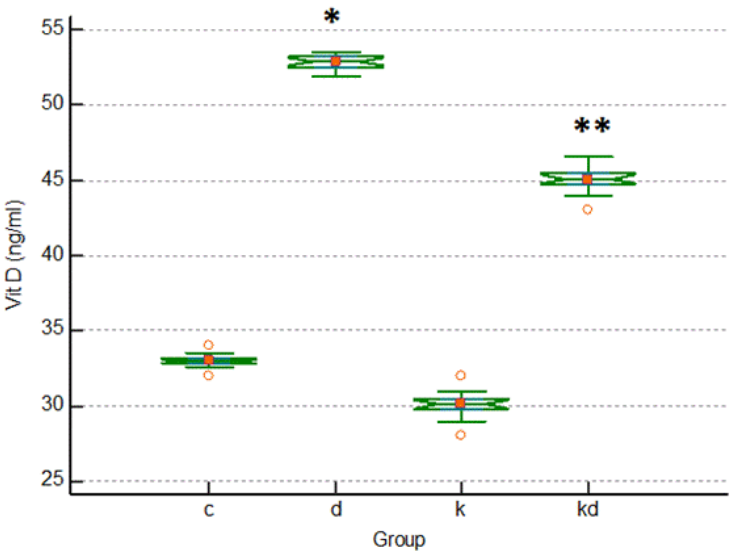
Най-високи нива на глутатион пероксидаза се наблюдават в групата на кетодиета + витамин D (146,65 u/l), а най-ниски – в контролната група (97,54 u/l). Серумните нива на глутатион-пероксидаза в групата с витамин D (130,95 u/l) са по-високи от тези в контролната група и малко по-ниски от тези в групата с кетодиета (136,76 u/l).

Най-високи серумни нива на 8-OHDG са наблюдавани в контролната група (19,99 ng/ml), последвана от групата на кетодиета (15,06 ng/ml) и тази на витамин D (12,93 ng/ml). Най-ниските стойности на 8-OHDG са наблюдавани в групата с Витамин D+ кетодиета (10,02 ng/ml)

Най-високи средни нива на витамин D са наблюдавани в групата, приемала витамин D (53 ng/ml), последвана от тази на кетодиета +витамин Д (45 ng/ml). Най-ниски нива на витамин Д са наблюдавани в групата на кетодиета (30 ng/ml).

Витамин D

Установява се статистически значими разлики в нивата на витамин D. H = 74,073 при 3 степени на свобода. (P = <0,001) – Фигура 7 .



Фигура 7. Нива на витамин D в групите

Легенда:

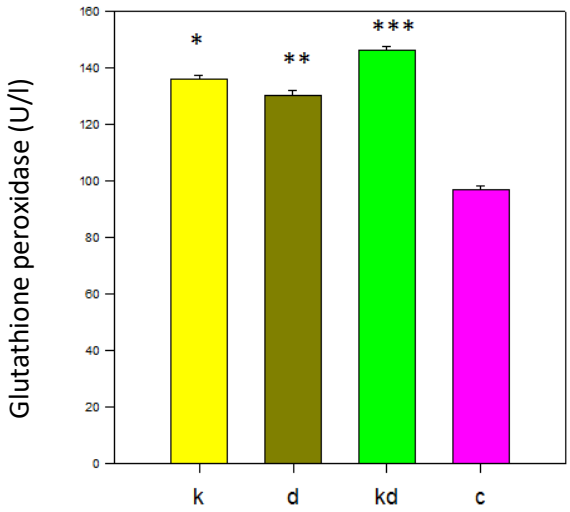
* - p < 0.001 между група d и всяка от трите останали групи

** - p < 0.001 между група kd и всяка от трите останали групи

Между с и к не се установява статистически значима разлика. Данните са представени с медианна стойност и 25-75 персентил.

Глутатион пероксидаза

Разликата между групите е статистически значима F (3, 76) = 3867.7 – Фигура 8.



Фигура 8. Нива на глутатион-пероксидаза в групите. Данните са представени като средни стойности и стандартно отклонение

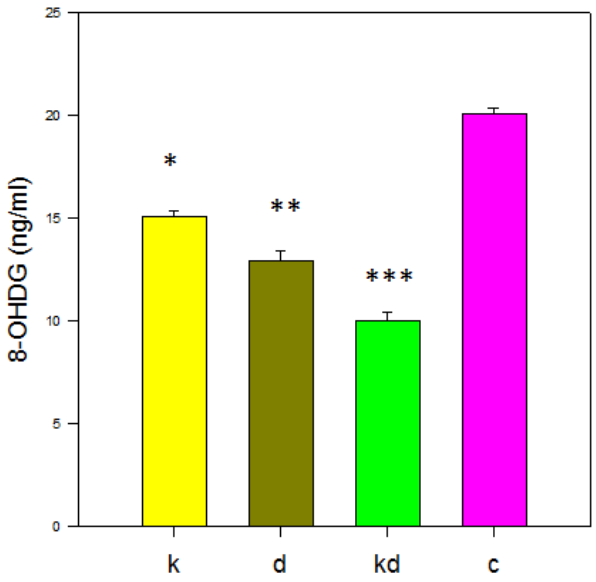
Легенда:

* p <0.001 за к спрямо всяка една от другите групи.

** p <0.001 за d спрямо всяка една от другите групи.

*** p <0.001 за kd спрямо всяка една от другите групи.

8-OHDG (ng/ml)



Фигура 9. 8-OHDG (ng/ml) в групите. Данните са представени като средни стойности и стандартно отклонение

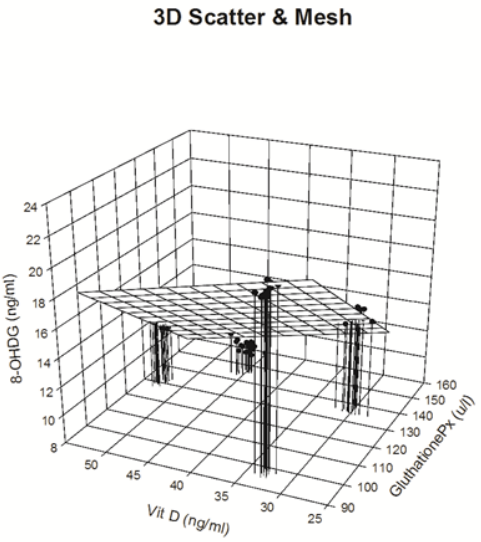
Легенда:

* p <0.001 за к спрямо всяка една от другите групи

** p <0.001 за d спрямо всяка една от другите групи

*** p <0.001 за kd спрямо всяка една от другите групи

При провеждане на множествена линейна регресия по отношение на нивата на 8-OHDG се станови статистически значима зависимост от активността на глутатион-пероксидазада и от нивата на витамин D – фигура 10.



Фигура 10. Обратнопропорционална зависимост на 8-OHDG от глутатион-пероксидазата и витамин, установена чрез множествен линейнорегресионен анализ

Зависимостта между 6-OHDG и глутатион-пероксидазата и витамин D за цялата изследвана популация е както следва:

8-OHDG (ng/ml) = 40,654 - (0,163 * GluthationePx (u/l)) - (0,133 * Vit D (ng/ml))

N = 74 , R = 0,979 Rsqr = 0,958 Adj Rsqr = 0,957, Standard Error of Estimate = 0,732

Това показва, че 95% от резултатите на маркера 8-OHDG зависят обратнопропорционално от активността на глутатион-пероксидазата и нивото на витамин D ($p < 0.001$).

2.2. Резултати от проведените проучвания с хора

2.2.1. Резултати от изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България

Пътят на взаимодействие на потребителите с банера е показан на Фигура 11.



Фигура 11. Общ брой показвания и интеракции на банера

Уникалната интеракция е първото взаимодействие на отделния потребител с банера. Всеки следващ отговор в анкетата влиза в графата общ брой интеракции. Примерно, ако един потребител е отговорил на всички възможни въпроси, той ще има най-малко три интеракции с банера и една уникална интеракция.

Получените резултати от двете кампании са показани в таблица 4.

Таблица 4. Брой получени отговори, разпределение по въпроси и кампании

	Лайфстайл кампания		Кампания в новинарски сайтове		Общо	
	No	%	No	%	No	%
Импресии	2899119		1550534		4449653	
Уникални интеракции	21252		12292		33544	

Първи въпрос - Купувам лекарства или добавки онлайн						
За отслабване (група А)	1173	24%	366	17%	1539	22%
За усилване на имунитета (група В)	1085	22%	461	21%	1546	22%
Не поръчвам онлайн лекарства (група С)	2722	55%	1350	62%	4072	57%
Общо отговори на първи въпрос	4980	100%	2177	100%	7157	100%
Втори въпрос група А ... за отслабване, защото:						
Искам да вляза във форма	366	79%	103	72%	469	78%
Имам здравословни проблеми	86	19%	34	24%	120	20%
Лекар ми препоръча продукта	10	2%	6	4%	16	3%
Общо отговори на втори въпрос – група А	462	100%	143	100%	605	100%
Втори въпрос група В: .. за усилване на имунитета, защото						
Прочетох, че е важно	161	36%	82	37%	243	35%
Имам здравословни проблеми	234	52%	124	56%	358	54%
Лекар ми препоръча продукта	56	12%	16	7%	72	11%
Общо отговори на втори въпрос група В	451	100%	222	100%	673	100%
Втори въпрос група С: ... не поръчвам, защото						
Имам лош предишен опит	60	4%	25	3%	85	4%

Нямам доверие на онлайн магазините	724	46%	350	48%	1074	47%
Съветвам се предварително с лекар или фармацевт	779	50%	359	49%	1138	50%
Общо отговори на втори въпрос група С	1563	100%	734	100%	2297	100%
Трети въпрос (група А и група В): А имаше ли ефект?						
Да, постигнах резултат	372	51%	158	59%	530	53%
Имаше ефект, но получих нежелана реакция	158	22%	35	13%	193	19%
Нямаше никакъв ефект	202	28%	77	29%	279	28%
Общо отговори на трети въпрос (група А и група В)	732	100%	270	100%	1002	100%
Четвърти въпрос за група А и група В и трети въпрос за група С - Докладвали ли сте нежеланите реакции?						
Да, на производителя	8	10%	6	20%	14	13%
Да, на Регулатора	24	31%	10	33%	34	31%
Не	46	59%	14	47%	60	56%
Общо отговори на четвърти въпрос (група А и група В) и трети въпрос група С	78	100%	30	100%	108	100%

Както е показано в таблица 4, 57% от потребителите, отговорили на първия въпрос, не закупуват лекарствени продукти и хранителни добавки онлайн. По-висока е мотивацията за самолечение при респондентите от лайфстайл кампанията, докато 62% от тези от кампанията на новинарски сайтове се въздържат от онлайн покупки. Респектът

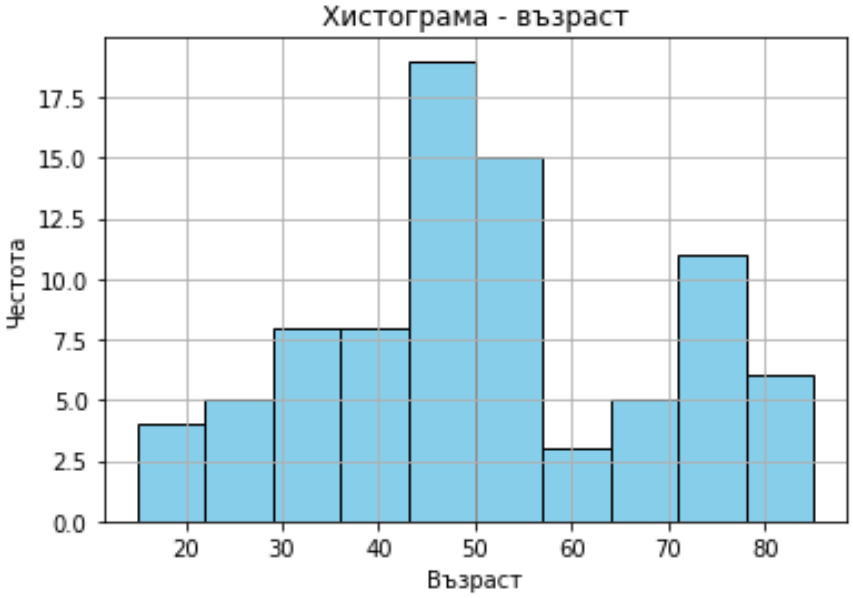
към съветите на лекаря се потвърждава от отговора на втория въпрос (група С) – 50% се консултират с медицински специалист преди поръчката на лекарства.

78% от тези, които купуват онлайн продукти за отслабване, го правят с цел да влязат във форма, а не с цел лечение.

Стресът и страхът от пандемията и нарастващия брой случаи провокира хората да се справят самостоятелно със своите проблеми и „подсилването“ на имунната система изглежда логично решение. 358 (54%) от тези, които поръчват имуностимуланти онлайн смятат, че имат здравен проблем, и 35% от тях са повлияни от други информационни канали. 47% от отговорилите, че не поръчват онлайн лекарства и хранителни добавки, се консултират предварително с медицински специалист, докато 50% от същата група, нямат доверие на интернет магазините. По отношение на постигнатите резултати, 53% от отговорилите на третия въпрос са получили очаквания резултат, докато 28% са останали разочаровани, а 19% са получили както ефект, така и нежелана реакция. 56% от тези, които са дали отговор на последния въпрос, не са докладвали получените странични ефекти.

2.2.2 Резултати от изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D

Изследвани са 84 пациенти, на възраст от 19 до 85 г. Хистограма на разпределението по възраст е представена на Фигура 12.



Фигура 12. Разпределение на изследваните лица по възраст

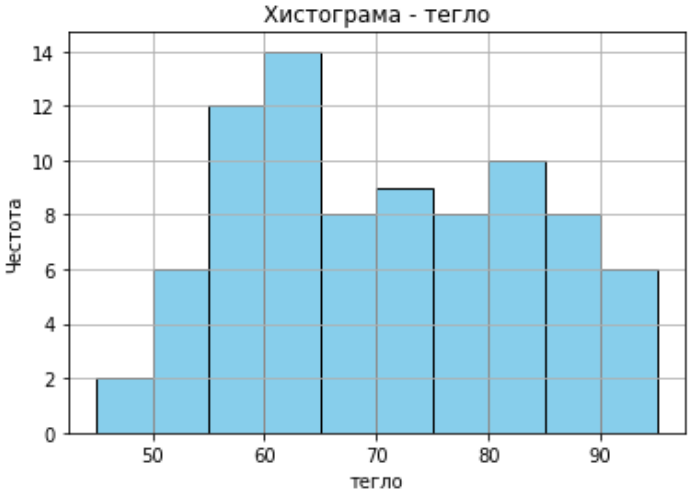
От тях жени бяха 61, а мъжете – 23.

Стойностите на индекс на телесна маса (ИТМ) бяха между 17 и 29 (Средно за изследваните жени – 23; средно за изследваните мъже – 25,64). Разпределенията на изследваните лица по ИТМ и по тегло са визуализирани съответно на Фиг. 13 и Фиг. 14.

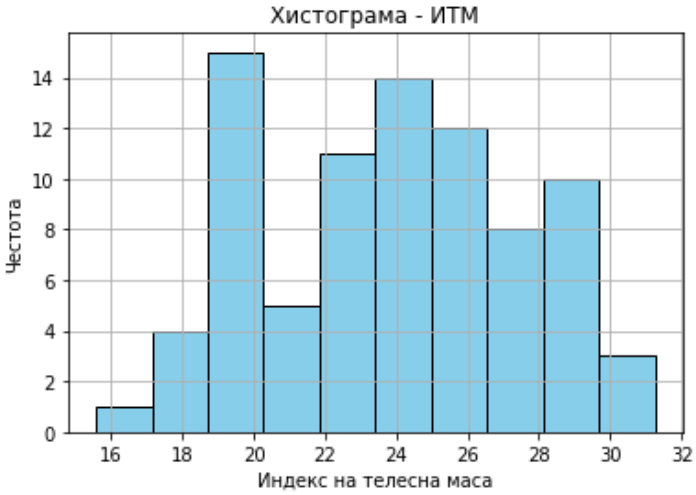
Таблица 5. Демографски данни

	Възраст	Ръст	Тегло	ИТМ
Минимална стойност мъже	22	168	61	21,36
Максимална стойност мъже	78	185	95	29,38
Средна стойност мъже	49,43	177,8	81,17	25,64
Минимална стойност жени	18	158	48	15,6
Максимална стойност жени	85	181	92	31,2
Средна стойност жени	51,43	168,3	65,27	23,21

Разпределението на теглото и ИТМ на изследваните лица е представено на Фиг. 16 и Фиг. 13.



Фигура 13 . Разпределение на изследваните лица по индекс на телесна маса

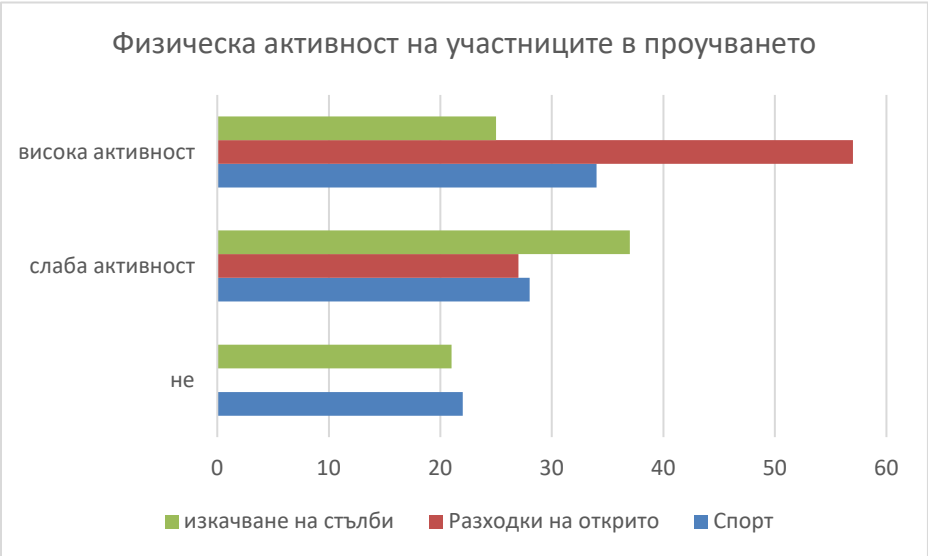


Фигура 14. Разпределение на изследваните лица по индекс на телесна маса.

Резултати от проведената анкета:

Физическа активност:

32 от анкетираните (38%) са споделили повишаване на теглото по време на пандемията, 5 (6%) са отслабнали, а при 47 (56%) не е имало разлика. 22 от анкетираните (26%) не спортуват, 28 (33%) – имат физическа активност 1-2 пъти в седмицата, а 34 (41%) спортуват 3-4 пъти а седмицата. Всички анкетирани твърдят, че се движат пеша поне 15-30 мин през деня, като 48 (57%) са посочили, че извършват разходки с продължителност над 30 мин. 25 (30%) от анкетираните предпочитат да се изкачват пеш по стълби, 21 (25%) винаги ползват асансьор, а 37 (45%) – понякога се изкачват с асансьор, понякога по стълбите. 16 от анкетираните (19%) споделят, че рядко прекарват време на открито, 5 (6%) – често, а 60 (75%) средно.



Фигура 15 Физическа активност на участниците в проучването.

Хранителни навици:

Участниците в проучването средно се хранят по 3 пъти на ден. 23 от анкетираните (27%) се хранят 2 пъти на ден, 48 (57%) – 3 пъти ден, 13 (16%) – 4 пъти ден.

Спрямо специфичните диетични режими – 11 анкетирани (13%) са на нискокалорична диета, 11 (13%) – с намален прием на въглехидрати или мазнини; 2 (2,4%)– вегетарианци, 3 (3,6%) – прилагат периодично гладуване. Останалите участници (68%) не спазват определен хранителен режим.

33 от анкетираните (39%) слагат допълнително сол в храната си.

Според отговорите от анкетата средната консумация на вода на ден е 1,17 л.; 54 (64%) приемат около 1 литър вода на ден, 25 (30%) – литър и половина на ден, 1 анкетиран (1,2%)– 2 л вода на ден.

39 от анкетираните (46%) консумират месо 4 или повече пъти седмично, 32 (38%)– 2-3 пъти, 11 (13%) – 1 път седмично или по-рядко.

Консумацията на риба е доста по-ниска – 53 от анкетираните (63%) консумират риба 1 до 2 пъти седмично.

57 (68%) от анкетираните консумират мляко и млечни продукти всеки ден или почти всеки ден; 13 (15%) – 2-3 пъти седмично; 21 (17%) – 1 път седмично или по-рядко.

22 от анкетираните (26%) консумират зърнени храни всеки или почти всеки ден; 32 – 2 до 4 пъти седмично; 23 – 1 път седмично или по-рядко.

11 участниците в проучването (13%) консумират мазнини всеки ден, 41 (49%) – 1-2 пъти седмично; 32 (38%) – рядко или не употребяват.

Всички анкетирани консумират редовно плодове и зеленчуци.

30 (36%) от анкетираните консумират сладко всеки ден, 16 (19%)– 2-3 пъти седмично, 30 (36%) – избягват; 7 (9%) не консумират сладко.

41 (49%) от участниците в проучването консумират алкохол, 43 (51%) – не употребяват.

20 (24%) от анкетираните пушат.

45 от анкетираните (54%) закусват всеки или почти всеки ден, 25 (30%) – 2-4 пъти седмично, 14 (16%) – не закусват

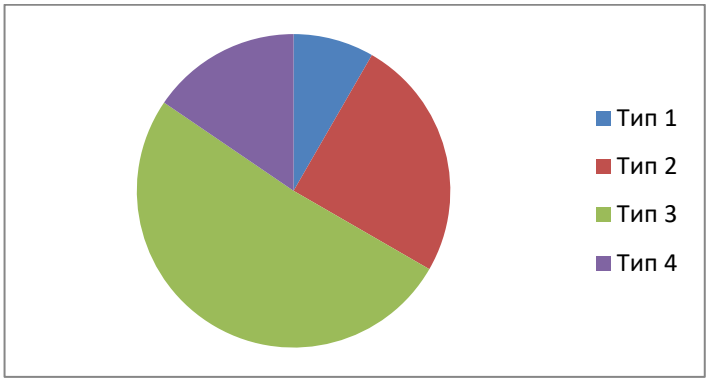
Най – обилно хранене при 45 (54%) участниците в проучването е вечерята, при 38 (45%) е обядът и при един анкетиран (1,2%) е закуската.

Други:

37 (44%) от участниците в проучването приемат допълнително витамини, от тях – 16 (19%) се суплементират с витамин D.

18 (21%) от анкетираните спят около 8-9 часа в денонощие; 50 (60%%) – 6-7часа; 16 (19%) – под 6 часа в денонощие.

Разпределението на участниците в проучването според типа кожа по скалата на Фицпатрик е: 7 души (8,33%) – тип 1; 21 души (25%) тип 2; 43 (51,19%) – тип 3; 13 (15,48%) – тип 4.



Фигура 16. Разпределение на изследваните лица по тип кожа (по скалата на Фицпатрик)

Таблица 6. Типове кожа според скалата на Фицпатрик

Тип	Характеристики	Тен/изгаряне
1	много бледо бяла кожа, често със зелени или сини очи, светла или червена, наличие на лунички	изгаря без да придобие тен
2	бяла кожа, често със сини очи, светла или червена коса	изгарят и не придобиват тен лесно
3	светла кожа с кафяви очи и кестенява коса	първо изгаря, после придобива тен
4	светлокафява кожа, тъмни очи, тъмна коса	малки изгаряния, придобива тен

5	кафява кожа, тъмни очи, тъмна коса	лесно придобива тен, рядко изгаря
6	тъмнокафява или черна кожа, тъмни очи, тъмна коса	никога не изгаря, придобива тъмен тен

Лабораторни резултати

Таблица 7. Референтни стойности на витамин D и глутатион пероксидаза в кръвта

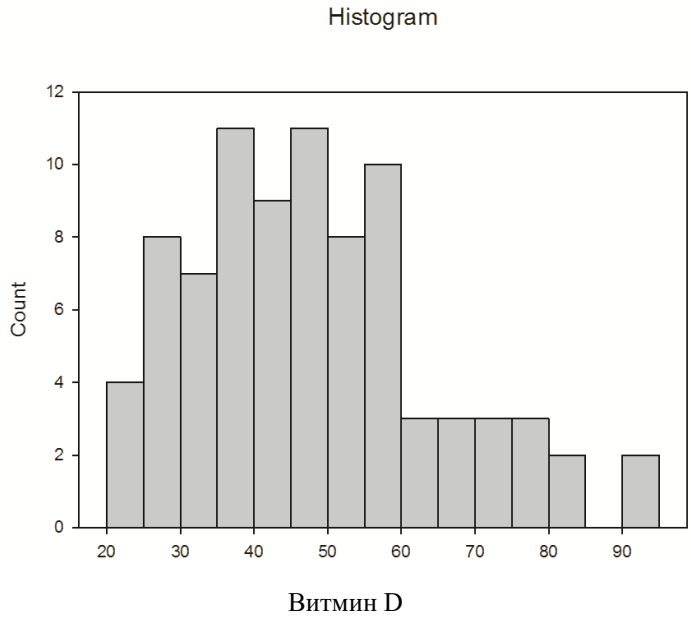
Показател	**Мерни единици**	**Референтни стойности**
Glutathion-Peroxidase	U/gHb	27.5 -73.5
25-OH-Vitamin D	nmol/L	80 – 250

Таблица 8. Нива на витамин D и глутатион-пероксидаза в кръвта на изследваните пациенти

	Дефицит	Понижени стойности	Референтни стойности
Витамин D	6 (7%) (≤ 50 nmol/l)	69 (82%) (51-79 nmol/l)	9 (11%) (≥ 80 nmol/l)
Глутатион-пероксидаза	/	28 (33%) (< 27.5 U/gHb)	56 (67%) (≥27.5 U/gHb)

Средните стойности на витамин D са 43,4 mmol/l. (Фиг. 17 и 18) Въпреки климатичните особености и слънчевото греене, средните стойности на изследваната популация са под нормата.

По отношение на нивата на витамин D в изследваната популация само 5-тима от пациентите бяха със стойности в референтните граници на нормата, 27 с ниски нива и 52-ма са с дефицит.

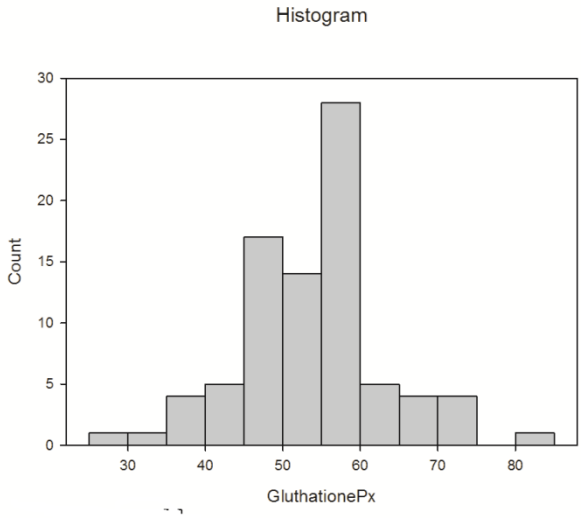


Фигура 17. Разпределение на стойностите на Витамин D.



Фигура 18. Разпределение на изследваните лица по отношение на стойностите им на Витамин D спрямо референтните стойности.

Средната стойност на глутатион-пероксидазата в изследваната популация е 53,2 U/gHb. Разпределението е показано на Фигури 19 и 20.



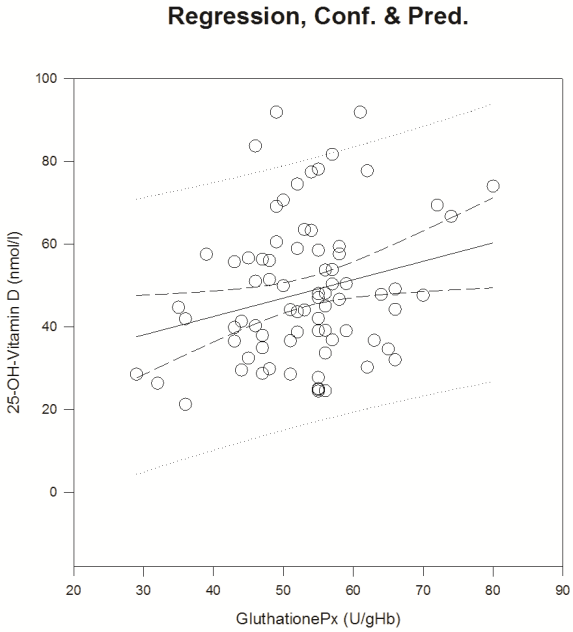
Фигура 19. Разпределение на стойностите на глутатион пероксидаза

По отношение на глутатион-пероксидазната активност всички стойности на изследваната популация бяха в референтните граници.

Връзка между стойностите на витамин D и глутатион пероксидаза:

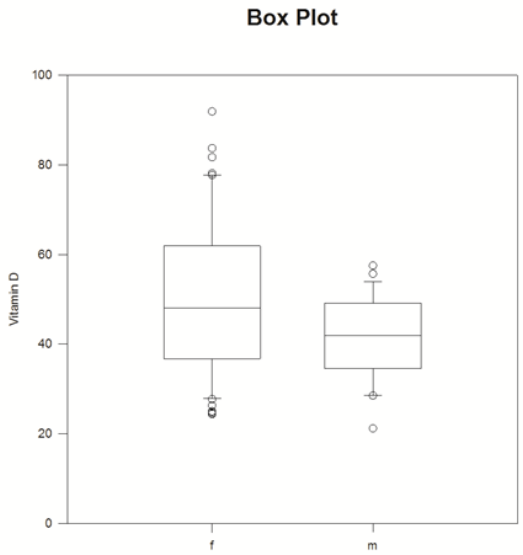
Линейният регресионен анализ открива статистически значима връзка между нивата на Витамин D и глутатион пероксидаза: Установи се слаба положителна корелация между стойностите на витамин D и активността на глутатион-пероксидазата със следната зависимост:25-OH-Vitamin D (nmol/l) = 24,642 + (0,445 * GluthationePx (U/gHb))

(N = 84, R = 0,246, Rsqr = 0,0605,Adj Rsqr = 0,0490, p = 0.024)



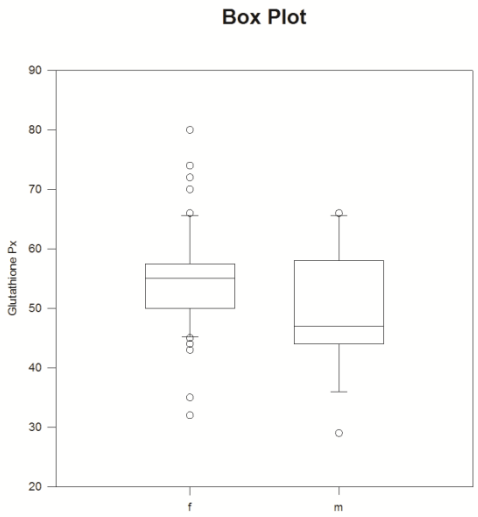
Фигура 20. Връзка между нивата на витамин D и глутатион пероксидазата в изследваната популация

По отношение на витамин D се установиха статистически значимо по-високи нива при жените спрямо мъжете в изследваната популация: Mann-Whitney U Statistic= 461,000, T = 737,000 n(small)= 23 n(big)= 61 (P = 0,016) – фигура 21.



Фигура 21. Нива на витамин D в зависимост от пола. f – женски пол, m – мъжки пол. (P = 0,016)

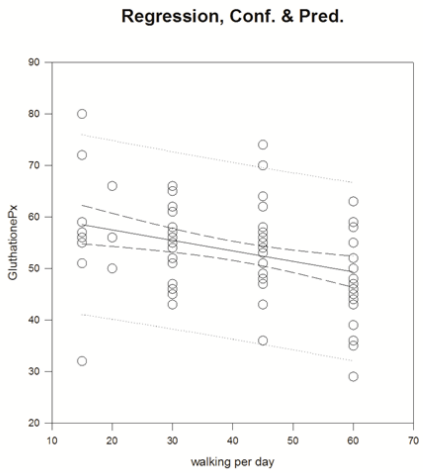
По отношение на глутатион-пероксидазната активност в изследваната популация също се установиха статистически значимо по-високи нива при жените в сравнение с мъжете. Mann-Whitney U Statistic= 448,000 T = 724,000 n(small)= 23 n(big)= 61 (P = 0,011) – фигура 22.



Фигура 22. Глутатион-пероксидазна активност в зависимост от пола. Означенията са като на фигура 21. P=0.011.

Установи се слаба статистически значима обратна корелация между времето на ходене пеша дневно и глутатион-пероксидазната активност:

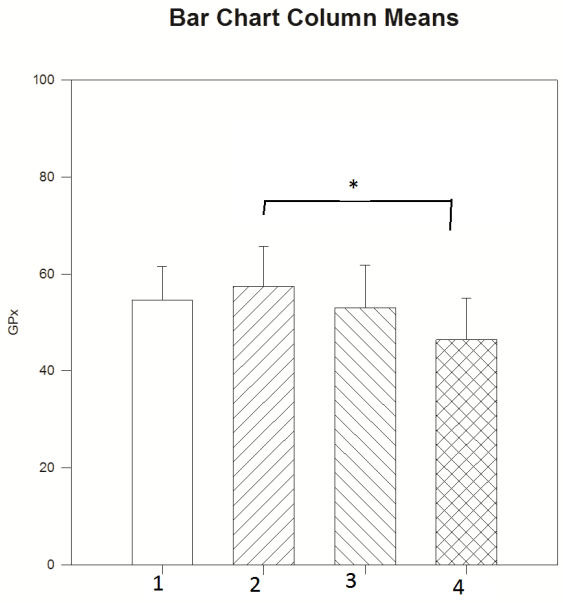
GluthationePx = 61,550 - (0,204 * walking per day), N = 84 , R = 0,336, Rsqr = 0,113,Adj Rsqr = 0,102, p=0.002 – фигура 23.



Фигура 23. Слаба обратнопропорционална зависимост между активността на глутатион-пероксидазата и времето на ходене пеша, p=0.002

Други наблюдения:

При пациентите, които спят под 6 часа на нощ, стойностите на глутатион-пероксидаза (въпреки, че са нормални), са под средните – 49-52,5 Ug/Hb.



Фигура 24 . Връзка между типа кожа и нивата на глутатион пероксидаза. Еднофакторен ANOVA и post-hoc test на Tukey. * - p = 0.002.

Факторният анализ показа, че типът кожа е от значение за активността на глутатион-пероксидазата F(3, 83)= 4,575, p=0,005. След провеждане на теста на Tukey се установи, че статистически значима е разликата между групата пациенти с тип 2 спрямо тип 4 кожа по Фицпатрик (p=0,002)– фигура 24.

3. ДИСКУСИЯ

3.1. Обсъждания по отношение на проведените експерименти с опитни животни

3.1.1 Обсъждания на изследването свързано с промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D

В настоящето проучване анализирахме експресионните нива на инсулиновия ген в панкреаса на мишки след различно третиране - кетогенна диета, прибавяне на витамин D към кетогенната диета и прием само на витамин D. Експресията на инсулина и съответно неговата способност да регулира нивата на плазмената глюкоза може да се променя в зависимост от съдържанието на макронутриенти в храната. Въпреки че някои проучвания при хора са доказали, че кето-диетата е ефективна за краткосрочна редукция на тегло, ефектът й върху глюкозната хомеостаза остава противоречив. От друга страна обаче диета, която е и бедна на въглехидрати, каквато е кето-диетата, често се прилага за контрол на симптомите на захарен диабет тип 2 (ЗД тип 2) при хора. Към момента не е известно дали ефектът на тази диета върху глюкозната хомеостаза е резултат от редукцията на тегло или от рестрикцията на въглехидратите с храната. Kinzig et al. провеждат проучване, което доказва, че консумирането на нисковъглехидратна кето-диета от гризачи води до потискане нивата на инсулина и глюкозата, което се наблюдава и при прием на диета с нисък гликемичен индекс от хора. Скорошни проучвания при мишки установяват, че кето-диетата подобрява инсулиновата чувствителност в целия организъм, редуцира инсулиновите нива на гладно въпреки увеличаването на чернодробната стеатоза. В нашето проучване установихме четирикратно намаляване на транскрипционните нива на инсулиновия ген след прилагане на кетодиета. Едно проучване изследва панкреасната експресия на гени, свързани с глюкозната хомеостаза след третиране на панкреатични клетки с кетонни тела и установява намаляване на експресията на glucose transporter-1 (GLUT1) и лактат-дехидрогеназа A (LDHA), без данни за инсулиновата експресия. В друго проучване се съобщава за редуциране на α и β-клетъчната маса в панкреаса след дългосрочна кето-диета, което би могло да има отношение към наблюдаваната редукция в инсулиновата експресия.

Множество проучвания подкрепят ролята на витамин D в панкреасната β-клетъчна функция чрез директни и индиректни ефекти. Директният ефект се осъществява чрез свързването на витамин D към неговия рецептор върху β-клетката, а

индиректният - чрез регулация върху калциевото навлизане в β-клетките (330). В нашето проучване установихме статистически значимо повишаване в транскрипционните нива на инсулиновия ген повече от 8 пъти след суплементация с витамин D и трикратно повишаване на нивата при добавянето му към кетогенната диета спрямо тези само от кетогенната диета.

Няколко проучвания съобщават, че дефицитът на витамин D причинява нарушение на глюкозомедиираната секреция на инсулин в β-клетките на панкреаса на плъх, което е възстановено след добавянето му. Биоактивната форма на витамин D е в състояние да индуцира секреция на инсулин чрез директно свързване на комплекса витамин D-рецептор-ретиноид-Х-рецептор (VDR-RXR) с витамин D респондерни елементи (VDRE), идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните β-клетки. В съответствие с това откритие, мишките с липса на функционални VDR показват нарушена секреция на инсулин след стимулация с глюкоза Забележително е, че VDRE може да стимулират не само транскрипцията на инсулиновия ген, но и много други гени, участващи в организацията на цитоскелета, клетъчния растеж, диференциацията и оцеляването на β-клетките на панкреаса.

В допълнение към геномните ефекти, бързият негеномен механизъм на действие на витамин D изглежда участва в стимулираната от деполяризация инсулинова екзоцитоза чрез регулиране на вътреклетъчния калций. Известно е, че инсулиновата секреция е калций-зависим процес и се повлиява от калциевото навлизане през клетъчната мембрана. Витамин D регулира калбиндин - цитозолен калций-свързващ протеин, който се намира в β-клетките. Той действа като модулатор на инсулиновото освобождаване, което е стимулирано от деполяризацията, чрез регулиране на вътреклетъчния калций. По този начин витамин D може индиректно да повлияе допълнително инсулиновата секреция, регулирайки калбиндина. В инсулин-чувствителните тъкани, като скелетни мускули и мастна тъкан, калцият е важен за инсулин-медиираните вътреклетъчни процеси. Определено количество калций е необходимо за оптимално функциониране.

Смята се, че неадекватният калциев прием или недостатъчност на витамин D може да повлияе баланса между екстра - и интрацелуларното ниво на калция, което да промени нормалното инсулиново освобождаване, особено в отговор на глюкозно натоварване. Стимулиращият ефект на витамин D върху инсулиновата секреция се проявява само при адекватни количества на калция. Инсулиновата секреция е калций-зависим процес поради което промени в нивата на калция биха имали негативни ефекти

върху β-клетъчната секреторна функция. Витамин D увеличава инсулиновата чувствителност като стимулира експресията на инсулинови рецептори и/или чрез активиране на рецепторите, активируеми от пероксизомни пролифератори-γ (PPAR- γ). Промяна във вътреклетъчния калций в таргетните на инсулина тъкани може да доведе до периферна инсулинова резистентност чрез изменяне на пътищата на сигнална трансдукция, което да предизвика намалена активност на глюкозните транспортери. Витамин D подобрява преживяемостта на β-клетките, като инактивира ядрения фактор-кВ (NF-кВ). Той може индиректно да повлияе инсулиновата резистентост чрез ренин-ангиотензин-алдостероновата система (RAAS). Ангиотензин II инхибира действието на инсулина в съдовете и скелетните мускули, което води до нарушено усвояване на глюкоза. Витамин D потиска образуването на ренин и на локална RAAS в панкреаса, като по този начин се явява негативен ендокринен регулатор на RAAS.

Големи популационни проучвания, като the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), откриват положителна връзка между нивото на 25(OH)D и инсулиновата чувствителност. По-нататъшни проучвания, използвайки резултатите от NHANES III, потвърждават обратната асоциация между нивото на 25OHD от една страна, и хипергликемията на гладно и инсулиновата резистентност, от друга. В едно от най-големите проспективни проучвания-The Nurses' Health Study - жените, които са приемали най-висока доза витамин D, над 800 IU дневно, са имали 33% по-ниска честота от ЗД тип 2 в сравнение с тези, приемащи 200 IU или по-малко. Нормализирането на нивото на витамин D подобрява глюкозния толеранс при хора, които са били с дефицит, и подобрява инсулиновия отговор при жени, които са със ЗД тип 2. Рандомизирани клинични проучвания показват, че или ЗД тип 2 може да бъде предотвратен, или инсулиновото освобождаване и инсулиновата чувствителност могат да бъдат подобрени чрез суплементация с витамин D. От друга страна, метаанализ, включващ 15 проучвания върху ефекта на суплементацията с витамин D върху гликемията и инсулиновата резистентност показва слаб ефект на приема на витамин D върху намаляването на кръвната захар на гладно и подобряването на инсулиновата чувствителност при пациенти със ЗД тип 2 и предиабет, и липса на ефект при здрави. Някои in vitro проучвания, а също и при хора, доказват, че витамин D има функционална роля в запазването на глюкозния толеранс чрез ефектите си върху инсулиновата секреция и инсулиновата чувствителност. Зайци и мишки с дефицит на витамин D имат нарушена инсулинова секреция като след суплементация дефектът се коригира. Мишки с мутация на VDR имат нарушена инсулинова секреция в сравнение със здрави.

Jayanarayanan et al. доказват, че суплементацията с витамин D увеличава нивата на инсулина чрез регулиране на променената експресия на рецепторите IP3 и AMPA в панкреасни острови на плъхове с индуциран със стрептозотоцин диабет. Добавянето на витамин D възстановява промяната в експресията на VDR, плътността на AMPA рецептора и експресията на IP3 и AMPA - рецепторите в панкреасните острови и така се възстановява калций-медиираната инсулинова секреция.

3.1.2. Обсъждания по отношение на изследваните нива на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими

В настоящето проучване беше анализирана динамиката на теглото, метаболитните показатели и нивата на прооксидантни и антиоксидантни маркери при опитни животни, подложени на различни хранителни режими. В края на 4-седмичното третиране се отчете най-голямо нарастване на теглото в групата на кето-диета (59% спрямо изходното тегло), следвано от контролната група (38% нарастване), групата на кето-диета и витамин D (31%) и групата на витамин D (19%). Освен това се установи и статистически значимо понижаване на нивото на гликемията Нивата на глюкозата в групата на кетодиета са сходни с тези в контролната група. При добавяне на витамин D при стандартна и кетодиета се отчитат статистически по-ниски нива на кръвната захар. Нивата на инсулина не се различават статистически между групите. Не се отчитат разлики в общия холестерол и кетотелата. Тези данни съвпадат с установения от други автори ефекти на витамин D да понижава гликемията и да редуцира теглото, действайки на ниво хипоталамус.

В настоящето проучване бяха анализирани и нивата на про-оксидантни и антиоксидантни маркери при опитните животни, подложени на различни хранителни режими - кетогенна диета, кетогенната диета с добавяне на витамин D, само прием на витамин D и контролна група на стандартна диета. Нивата на глутатион пероксидаза са статистически значимо повишени при комбинирано прилагане на кетодиета и суплементиране с витамин D, а също и при самостоятелно суплементиране с витамин D или третиране с кетодиета. Тези резултати кореспондират с нивата на 8-OHDG, които са значително по-ниски при комбинирано суплементиране с витамин D и третиране с кето-диета.

Множество научни изследвания показват връзка между прилагането на кетогенна диета и стимулирнето на редица антиоксидантни и противовъзпалителни механизми. Положителното влияние на кетонните тела се развива с течение на времето. Първоначално е наблюдавано повишение на ROS и медиатори на възпалението, последвано от адаптивен клетъчен защитен отговор. Това води до положителна регулация на защитните клетъчни механизми, което от своя страна повишава антиоксидантна и противовъзпалителна активност и възстановяване на клетките. Смята се, че кетогенната диета проявява своите положителни ефекти чрез стимулиране на митохондриалната функция.

Витамин D участва в редица клетъчни процеси, свързани с глюкозната и липидната обмяна и има противовъзпалителни, антиоксидантни и невропротективни свойства. Недостигът на витамин D е свързан с повишен оксидативен стрес и възпалението и по този начин с намалена протекция при състояния като диабет и чернодробна исхемия. Суплементирането с витамин D може да намали нивата на оксидативния стрес и да намали липидната пероксидация и производството на цитокини.

В научната литература няма категорични данни за влиянието на комбинация от кетодиета и суплементиране с витамин D върху нивата на оксидативен стрес.

3.2. Обсъждания по отношение на проведените проучвания при хора

3.2.1. Обсъждания по отношение на изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България

Проучването се проведе в онлайн среда, което говори, че самите анкетирани използват интернет и са активни потребители онлайн, т.е. предполага се, че и пазаруват онлайн и са релевантна статистическа извадка. Тъй като анкетата е анонимна и не се събират лични данни, можем да смятаме, че отговорите са били напълно откровени и автентични.

Затварянето вкъщи и намалената физическа активност по време на COVID-19 пандемията постави редица предизвикателстваq както пред здравната система, така и пред отделния човек. Управлението на теглото е едно от тях. Българските пациенти са заинтересувани от дискусии и онлайн обучения за здравословно хранене и начин на живот и са склонни да поддържат фигурата си чрез поръчване на добавки и лекарства, но не и за разрешаване на здравен проблем. Ролята на медицинския специалист остава водеща, особено в управлението на „инфодемията“ в настоящия период.

Растителни и „природни“ добавки се прилагат в целия свят, но доказателствата за тяхната клинична ефикасност са ограничени. Различни билкови продукти се рекламират като „имуно-бустер“ срещу коронавирус, като се твърди, че повишават естествената защита на пациентите и намаляват възможните клинични симптоми в случай на евентуална инфекция. Безопасността и правилната употреба на растителни и хранителни добавки не може да бъде внимателно проследявана онлайн.

Ниското ниво на докладване на нежелани реакции допринася за несигурността на полза/риск профила на доставяните по интернет лекарства. Потенциална мотивация за пасивното отношение към съобщаване на странични ефекти е свързана от една страна със желанието на пациента да остане анонимен и да не споделя своите притеснения и опити за самолечение, а от друга – с липсата на лесен и достъпен начин за докладване в сайтовете, рекламиращи билкови продукти.

Покачването на теглото и грешките в диетата се случват често и социалните медии могат да бъдат потенциален инструмент за улесняване и промоция на здравословен начин на живот, когато се извършва от легитимни източници и при строго спазване на регулаторните изисквания.

3.2.2. Обсъждания върху изследването на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D

В настоящото проучване оценихме нивата на глутатион пероксидаза и витамин D при пациенти с различни хранителни и двигателни режими. Данните ни показаха, че 94% от изследваните пациенти имат нива на витамин D под нормалните. Това е в съгласие с предишни проучвания, правени в България. С напредване на възрастта намалява кожната продукция на витамин D и от друга страна тези лица прекарват по-малко време на открито. Ето защо възрастните лица имат ниско ниво на 25(OH)D в сравнение с младите лица, живеещи в същите географски региони и имащи подобна оцветка на кожата. Нашето проучване показа дифузно разпределение на ниските стойности и не се установи връзка с възрастта или пола на изследваните лица. Вероятно за това играе роля пандемията COVID-19, която след масовото затваряне по домовете, доведе до съществена промяна в начина на живот и дългосрочно намаляване на активностите на открито във всички възрастови групи. В литературата се съобщава за асоцииране на дефицита на витамин D и метаболитен синдром. Понижените нива на витамин D са

свързани с повишени нива на провъзпалителни цитокини, промени в калциевата хомеостаза, високи липидни нива и хипергликемия, дължаща се на инсулинова резистентност. Всички тези фактори допринасят за прогресирането на сърдечно-съдовите заболявания. Недостигът на витамин D е един от факторите, които повлияват повишаването на оксидативния стрес.

С настоящото проучване се установи положителна корелация между нивата на витамин D и активността на глутатион-пероксидазата. Повишаването на нивата на витамин D може да помогне за повишаване на тези на глутатион пероксидаза, и обратно, дефицитът на 25(OH)VD може да намали антиоксидантните защитни механизми в организма. Нивото на глутатион пероксидаза е понижено при пациенти с дефицит на витамин D, както и при пациенти с обменни заболявания. Резултатите от настоящото проучване потвърждават наблюденията на други автори, получени при опитни животни и при хора.

В подкрепа на връзката между нивата на витамин D и активността на глутатион-пероксидазата е и установената с настоящото проучване статистически значимо по-ниска активност на глутатион-пероксидазата при пациентите с цвят на кожата тип 4 по Фицпатрик.

Анализът на резултатите от настоящото проучване потвърди докладваната от други автори полова разлика в активността на глутатион-пероксидазата в полза на жените. Данните в литературата сочат директното влияние на женските полови хормони върху активността на този ензим.

Данни, за които не се откриват данни в литературата, но които установява настоящото проучване, се отнасят до слабата отрицателна връзка между активността на глутатион-пероксидазата и времето на ходене пеша. От една страна, това би могло да се дължи на факта, че изследваната популация най-вероятно е със заболявания, по повод на които се изследва в лаборатория Бодимед. Този факт обаче следва да се интерпретира и в светлината на това, че данните за ходенето пеша са по спомени на анкетираните, което би могло да въведе грешка в интерпретирането.

5. ИЗВОДИ

1. Суплементирането с Витамин D при опитни животни:

- повишава експресията на инсулиновия ген в много по-голяма степен при едновременно прилагане на стандартна диета, в сравнение с кето-диета.
- способства за много по-слабо наддаване на тегло;
- способства за намаляване нивото на гликемията;
- е асоциирано с по-висока активност на глутатион-пероксидазата;
- е асоциирано с по-ниски нива на 8-OHDG.

2. Кето-диетата при опитни животни:

- способства за наддаване на тегло
- способства за по-високи нива на гликемията
- е асоциирана с по-висока активност на глутатион-пероксидазата
- е асоциирана с по-ниски нива на 8-OHDG

3. Повишеното използване на интернет логично води до увеличаване на онлайн покупките, но все пак медицинските специалисти имат водеща роля в промоцията на здраве и техните съвети покачват мотивацията за покупка. Различни аспекти на пандемията COVID-19 – както преки, като социално дистанциране, претоварване на здравната система , така и дългосрочни, като промяна в начина на живот, доведоха до повишено самолечение. Това се потвърждава и от резултатите от нашето проучване. Тази тенденция ясно показва необходимостта от ясна, регламентирана и масирана здравна информационна кампания, където интернет каналите могат да вземат значително участие. Взаимодействието лекар – пациент е част от холистичния подход към здравето в дългосрочен план.

4. Нормални стойности на витамин D се срещат много рядко сред случайно подбрана популация на пациенти- посещаващи клинична лаборатория. Преобладават пациентите с витамин D-дефицит (62% според настоящото проечване).

5. Налице е положителна корелация между активността на глутатион-пероксидазата и нивата на витамин D в организма.

6. По-светлата кожа се асоциира с по-висока активност на глутатион-пероксидазата

7. Активността на глутатион-пероксидазата е статистически значимо по-висока при жените, отколкото при мъжете.

5. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

С проучването се установява връзката между кетогенната диета и нивата на прооксидантни и антиоксидантни показатели, както и влиянието на витамин D.

Резултатите са от интерес за общата медицина, нутрициологията, ендокринологията, транслационната медицина и ще бъдат популяризирани чрез публикации в научната литература и на подходящи научни форуми.

Изследва се взаимната връзка между нивата на оксидативен стрес и тези на витамин Д както при опитни животни, така и при хора.

Изследва се влиянието на различни двигателни и диетични режими върху нивата на оксидативен стрес.

Проследява се влиянието на пандемията COVID-19, чиито дълготрайни последствия върху здравето тепърва ще бъдат установявани.

6. ПУБЛИКАЦИИ

Научни публикации на докторанта:

- Строкова - Стоилова М, Андреева-Гатева П, Попова Д. Кетогенна диета и управление на теглото. Летописи на БАНИ 2020, 1: 50-52
- Строкова-Стоилова М, Андреева-Гатева П. Оксидативен стрес, витамин Д и управление на теглото в условията на COVID-19 пандемия. Здравна политика и мениджмънт 2021, 21(1): 43-47
- Строкова-Стоилова М, Михалева И, Попова Д, Андреева-Гатева П. Нагласи за самолечение в България. Обща Медицина 2021, XXIII (6): 28-33
- Михалева И, Кюркчиян С, Строкова-Стоилова М, Димова И, Андреева-Гатева П. Промени в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин Д. Ендокринология 2021, 2: 22-35
- Andreeva-Gateva P, Tchekalarova J, Kamenova K, Strokova-Stoilova M et Al. Aryl Hydrocarbon Receptors in Indole Derivative Treated Mice: Neuropharmacological Perspectives. Acta Medica Bulgarica 2021, 48(1):25-33
- Строкова-Стоилова М, Попова Д, Пешев Р, Андреева-Гатева П. Оценка на нивата на прооксидативни и антиоксидантни маркери в експериментални животински модели с различни диетични режими. Ендокринология 2022, 2: 84-87
- Strokova-Stoilova M, Popova D, Andreeva-Gateva P. Attitudes for Online Self-Medication: COVID-19 Impact in Bulgaria. J Community Med Health Educ 2023, 13(2)
- Andreeva-Gateva P, Hristov M, Strokova-Stoilova M et al. Therapeutic potential of orally applied KB-R7943 in streptozotocin-induced neuropathy in rats; Heliyon 10 (2024) e27367

Участия в научни проекти:

- Участие с изследователски проект в конкурс „Млад изследовател 2021“, вх номер 7896/19.11.2020г, договор 131/2021; Тема на проекта: “Оценка на нивата на прооксидантни, антиоксидатни и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими”
- КП-06-Русия/25 от 2020 с Фонд научни изследвания
- КП-06-Н63/9 от 2022 с Фонд научни изследвания

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята благодарност на:

- Проф. Павлина Андреева-Гатева, ДМ - научен ръководител, за професионализма, проявеното доверие към мен, за подкрепата, напътствието и съветите при осъществяване на изследванията и оформянето на дисертационния труд.
- Доц. Даниела Попова, ДМ - втори научен ръководител, за напътствията и оказаната помощ при подготовката на проучванията при хора.
- Проф. Иванка Димова, ръководител Ръководител на Лабораторията по геномна диагностика, МФ, МУ-София – за подкрепата и съдействието при изработване на генетичните и биохимични резултати.
- Искрено благодаря на всички преподаватели от катедра Фармакология и токсикология за колегиалната подкрепа и оказаните съвети.

Благодаря на всички колеги и приятели, които по един или друг начин ми помогнаха в изготвянето на настоящата дисертация!