

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД 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.

# СЪДЪРЖАНИЕ

СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ВЪВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА ПЪРВА.....	11
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР .....	11
1.1. Концепция за оксидативен стрес .....	11
1.1.1. Определение за оксидативен стрес.....	11
1.1.2. Исторически аспекти .....	13
1.1.3. Активиране на кислород и производство на ROS.....	14
1.1.4. Физиологични роли на оксидативния стрес .....	16
1.1.5. Патогенна роля на оксидативния стрес.....	18
1.2. Биомаркери за оценка на нивата на оксидативен стрес.....	21
1.2.1. Ендогенни антиоксиданти .....	21
1.2.1.1. Каталаза (CAT).....	22
1.2.1.2. Супероксид дисмутаза (SOD).....	22
1.2.1.3. Глутатион пероксидаза (GPx) .....	23
1.2.1.4. Глутатион S-трансферазите (GSTs) и Глутатион редуктаза (GR).....	23
1.2.1.6. Други ендогенни антиоксиданти .....	24
1.2.2. Липидна пероксидация (LPO).....	27
1.2.3. Окисляване на протеини.....	30
1.2.4. Окисление на нуклеинова киселина .....	31
1.3. Ефект на оксидативния стрес върху човешкото здраве.....	32
1.4. Затлъстяване и оксидативен стрес.....	35
1.4.1. Условия, генериращи оксидативен стрес при затлъстяване .....	39
1.4.1.1. Хипергликемия и оксидативен стрес при затлъстяване .....	39
1.4.1.2. Повишени нива на липиди и оксидативен стрес при затлъстяване.....	40
1.4.1.3. Дефицит на витамини и минерали и оксидативен стрес при затлъстяване .....	41
1.4.1.4. Други условия.....	42
1.4.2. Метаболитен синдром и затлъстяване.....	43
1.5. Отслабване на тегло и оксидативен стрес.....	45
1.5.1. Механизми за отслабване на тегло .....	46

1.6. Роля на витамин D при отслабване и върху показатели на метаболитния синдром.....	49
1.6.1. Роля на витамин D при отслабване и ефекти върху оксидативен стрес .....	49
1.6.2. Влияние на витамин D върху показатели на метаболитния синдром .....	51
1.7. Роля на кетодиетата за отслабване и оксидативен стрес .....	55
1.7.1. Хранителна кетоза.....	55
1.7.2. Кетогенна диета – биохимични процеси.....	56
1.7.3. Кетогенна диета – наблюдавани ефекти .....	57
1.8. Оксидативен стрес: ролята на физическите упражнения и антиоксидантните хранителни добавки .....	58
ГЛАВА ВТОРА .....	65
НАУЧНА ХИПОТЕЗА, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	65
2.1. Цел на проучването.....	65
2.2. Задачи на проучването.....	65
2.3. Научна хипотеза .....	66
ГЛАВА ТРЕТА .....	67
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	67
3.1. Материали и методи, използвани при експерименти с животни.....	67
3.1.1. Изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D .....	67
3.1.2. Изследване нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими .....	68
3.2. Материали и методи, използвани при проучвания при хора .....	70
3.2.1. Изследване на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България .....	70
3.2.2. Изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D .....	73
ГЛАВА ЧЕТВЪРТА.....	75
РЕЗУЛТАТИ.....	75
4.1. Резултати от проведените експерименти с опитни животни .....	75
4.1.1. Резултати от изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D.....	75
4.1.2. Резултати от изследването на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими .....	75
4.2. Резултати от проведените проучвания с хора .....	83
4.2.1. Резултати от изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България .....	83

4.2.2 Резултати от изследване на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D .....	87
ГЛАВА ПЕТА.....	98
ОБСЪЖДАНЕ.....	98
5.1. Обсъждания по отношение на проведените експерименти с опитни животни.....	98
5.1.1 Обсъждания на изследването свързано с промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D .....	98
5.1.2. Обсъждания по отношение на изследваните нива на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими .....	101
5.2. Обсъждания по отношение на проведените проучвания при хора.....	103
5.2.1. Обсъждания по отношение на изследването на нагласите за онлайн самолечение: влияние на COVID-19 в България .....	103
5.2.2. Обсъждания върху изследването на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D .....	104
6. ИЗВОДИ.....	105
7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	107
8. ПУБЛИКАЦИИ .....	108
ГЛАВА СЕДМА .....	109
БЛАГОДАРНОСТИ .....	111
БИБЛИОГРАФИЯ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	139

## СЪКРАЩЕНИЯ

**АТФ** - Аденозинтрифосфат

**БАБХ** - Българска агенция по безопасност на храните

**ДНК** - дезоксирибонуклеинова киселина

**ИТМ** - индекс на телесна маса

**КД** - Кетогенната диета

**НСПВЛ** - нестероидни противовъзпалителни лекарства

**РААС** - Ренин-ангиотензин-алдостероновата система

**РНК** - рибонуклеинова киселина

**ЦНС** - централната нервна система

**ADP** - аденозин дифосфата в митохондриите

**ALA** - Алфа-липоевата киселина

**ALS** - амиотрофичната латерална склероза

**AOPP** - Advanced Oxidation Protein Products

**ARDS** - Acute respiratory distress syndrome

**CAT** – Каталаза

**CCS** - copper chaperone for superoxide dismutase

**CKD** - Chronic kidney disease

**CO** - въглероден оксид

**CYGB** - Cytoglobin

**DMNT** - Dietitians in Medical Nutrition Therapy

**DNPB** – Dinitrophenylhydrazine

**ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay

**ER** - ендоплазмен ретикулум

**FADH** - Flavin adenine dinucleotide

**FFA** - свободни мастни киселини

**FRAP** - Fluorescence recovery after photobleaching

**FRC** - реакция на свободни радикали

**GC-MS** - Gas chromatography–mass spectrometry

**GPx** - Глутатион пероксидаза

**GPX1** - Glutathione Peroxidase 1  
**GR** - Глутатион редуктазата  
**GSH** - Reduced Glutathione  
**GSSG** - Glutathione disulfide  
**GSTP1** - glutathione S-transferase pi gene  
**GSTs** - Глутатион S-трансферазите  
**HDL** - high-density lipoprotein  
**HDL** - high-density lipoprotein  
**HPLC** - High-performance liquid chromatography  
**HSP** - Heat shock protein  
**IDF** - Международната диабетна федерация  
**JNK** - c-Jun N-terminal kinases  
**КТх** - kidney transplant procedure  
**LC-MS** - Liquid chromatography–mass spectrometry  
**LDL** - липопротеин с ниска плътност  
**LDL** - липопротеините с ниска плътност  
**L-DOPA** - L-дихидроксифенилаланин  
**MAPK** – Mitogen-activated protein kinase  
**MDA** – малондиалдехид  
**NADPH** - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
**NCF1** - Neutrophil Cytosolic Factor 1  
**NOS2** - Nitric oxide synthase 2  
**NOX** - the oxidase  
**ONOOH** - Peroxynitrous acid  
**РТ** - проксималния тубул  
**RBS** – reactive bromine species  
**RCS** - reactive chlorine species  
**RNS** – reactive nitrogen species  
**ROS** - reactive oxygen species  
**SOD** - Супероксид дисмутаза  
**TAC** - total antioxidant capacity  
**TAS** - Total antioxidant status

**TBARS** - Thiobarbituric acid reactive substances

**UV** - ультрафиолетово

**VDBP** - Vitamin D Binding Protein

**VDRE** - Vitamin D response element

## ВЪВЕДЕНИЕ

Биологичните тъкани се нуждаят от кислород, за да задоволят своите енергийни нужди. Консумацията на кислород от друга страна обаче води до генериране на свободни радикали, които могат да имат вредни ефекти върху клетките. Мозъкът е особено уязвим към ефектите на реактивните кислородни видове (ROS) поради високата му нужда от кислород и изобилието от силно пероксидиращи субстрати.

Оксидативният стрес е състояние, при което балансът между производството на ROS и нивото на антиоксидантите е значително нарушен и води до увреждане на клетките. ROS може да се насочи към няколко различни субстрата в клетката, причинявайки окисляване на протеини, ДНК, РНК или липидна пероксидация.

Оксидативният стрес е ключов фактор за множество заболявания, включително сърдечно-съдови заболявания, диабет тип 2, рак и невродегенеративни заболявания като Алцхаймер и Паркинсон.

Храната, която се консумира, играе критична роля в регулирането на оксидативния стрес. Диети, богати на антиоксиданти, като например сезоните плодове и зеленчуци, ядки, мазнини от риба и зелени чайове, могат да помогнат за намаляване на оксидативния стрес. От друга страна, диети, богати на преработени храни, захари и наситени мазнини, могат да увеличат нивата на свободните радикали и да допринесат за повишената оксидация. Витамините и минералите, които се приемат през храната или чрез добавки, могат да участват в антиоксидантни процеси. Някои от тях, като витамин С, витамин Е, бета-каротин и селен, са известни със своите антиоксидантни свойства и могат да помогнат за намаляване на оксидативния стрес.

В настоящата разработка интересното в изследването на нагласите за онлайн самолечение в контекста на COVID-19 в България е, 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.

Интересът към взаимодействието между диетата и генната експресия е ключов за разбирането на това как хранителните избори могат да влияят 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. Също така, витамин D е известен със своето значение 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 влияят върху нашето здраве. Например, може да се открият специфични гени или генетични пътища, които са свързани с регулацията на метаболизма на захарта и инсулиновата чувствителност. Такива изследвания не само ще допринесат за нашето разбиране за взаимодействието между храненето и генетиката, но и може да предоставят основа за разработване на персонализирани диети и подходи за здравеопазване, които са оптимални за конкретния генетичен профил на индивида.

Изследването на нивата на прооксиданти, антиоксиданти и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими може да даде ценна информация за въздействието на различните диети върху здравето и метаболизма.

Изследването може да помогне да разберем 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. Изследването на нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяването на протективното влияние на витамин D е от особено значение за разбирането на връзката между диетата и здравето. Хранителните режими, които включват богати на антиоксиданти храни, като зеленчуци, плодове и ядки, вероятно ще имат намален оксидативен стрес в сравнение с диетите, богати на мазнини. Такива храни са богати на антиоксиданти, които могат да намалят образуването на свободни радикали и да подпомогнат балансирането на оксидативния стрес.

Изследванията показват, че витамин D може да увеличи производството на антиоксиданти в клетките и да помогне за предотвратяване на увреждането на ДНК,

причинено от свободни радикали. Така, изследванията в тази област могат да потвърдят връзката между хранителните режими, витамин D и нивата на оксидативен стрес, като предоставят ценна информация за превенцията и лечението на различни заболявания, свързани с оксидативен стрес, като например сърдечно-съдови заболявания и рак. Изследванията в областта на оценката на оксидативния стрес при различни хранителни режими и прием на хранителни добавки са от съществено значение за оптимизиране на здравето и предотвратяване на заболяванията. Те могат да дадат важни насоки за препоръчване на хранителни стратегии и добавки, които да поддържат баланса на оксидативния стрес в организма и да подобрят общото здравословно състояние.

# ГЛАВА ПЪРВА

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1.1. Концепция за оксидативен стрес

#### 1.1.1. Определение за оксидативен стрес

Оксидативният стрес често се определя като дисбаланс между прооксиданти и антиоксиданти [1]. Възниква, когато производството на реактивни кислородни видове (ROS) преобладава над наличните антиоксиданти в организма. Живите клетки са подложени на постоянна окислителна атака от ROS, което води до „окислително увреждане“ и сложната антиоксидантна защитна система обикновено държи тази атака в баланс [2]. Регулирането на редокс (редукция и окисление) състояние е критично за клетъчната жизнеспособност, активиране, пролиферация и функция на органите. Патологична промяна в този баланс води до нарастващи концентрации на ROS, което може да причини неблагоприятни модификации на клетъчните компоненти, като липиди, протеини и ДНК [3]. Балансът се поддържа или от ензимни антиоксиданти, или от неензимни антиоксиданти, които съставляват общия антиоксидантен капацитет (ТАС) и показват способността на клетките да противодействат на увреждането, предизвикано от оксидативен стрес. ТАС се поддържа значително от редуцирани и окислени форми на глутатион GSH/GSSG. Равновесието обаче се поддържа и от много други вещества и се регулира чрез дискретни редокс пътища, а не чрез директен отговор на химически токсични вещества и физиологични стимули. По този начин оксидативният стрес може също да се дефинира като прекъсване на редокс сигнализирането и контрола [1]. Незначителните смущения водят до хомеостатични адаптации, докато значителните смущения могат да доведат до непоправими увреждания и клетъчна смърт [2].

Оксидативният стрес активира множество вътреклетъчни сигнали, което индуцира апоптоза или клетъчен свръхрастеж, което води до органна дисфункция на сърцето, панкреаса, бъбреците и белите дробове, като допълнително причинява хипертония, диабет, хронично бъбречно заболяване и белодробни нарушения [4]. Включени са различни пътища, включително апоптотични гени: каспаза-3, -8, -9, Bim,

Bcl-2, Bax и Bax и гени на оксидативен стрес: CYGB (цитоглобин), GSTP1 (глутатион S-трансфераза рi 1), NCF1 (неутрофилен цитозолен фактор 1), GPX1 (глутатион пероксидаза 1), SOD1 (супероксид дисмутаза 1), SOD2, CCS (меден шаперон за супероксид дисмутаза) и NOS2 (азотна оксидна синтаза 2) [5, 6, 7]. Експресията на GSTP1 и апоптотичното сигнализиране чрез активиране на c-Jun N-терминална киназа (JNK) изглежда са механизми, свързващи оксидативния стрес и хипертонията при спонтанно хипертензивни плъхове [6, 8, 9, 10].

Оксидативният стрес се признава като рисков фактор за различни нежелани събития, включително атеросклероза и смъртност при пациенти с хронично бъбречно заболяване (CKD). Оксидативният стрес и оксидативното увреждане са признати за важни фактори за развитието на различни заболявания: болест на Алцхаймер [11], атеросклероза [12], мъжко безплодие [13], ХОББ [14], глаукома [15], хронично възпаление и амилоидоза [16], болест на Паркинсон [17], затлъстяване [18, 19, 20, 21] и диабет [22], както и стареене [23].

ROS играят важна роля като втори посредник в много вътреклетъчни сигнални каскади, насочени към поддържане на клетката в хомеостаза с нейната непосредствена среда. Те причиняват безразборно увреждане на биологични молекули на по-високи нива, което води до загуба на функция и клетъчна смърт. Биомолекулите в живите организми са силно изложени на оксидативен стрес. ROS се произвеждат от молекулярен кислород поради нормалния клетъчен метаболизъм. Много други фактори обаче променят този процес.

ROS могат да бъдат разделени на две групи: свободни радикали и нерадикали. Свободните радикали са молекули, съдържащи един или повече несдвоени електрони ( $\cdot$ ), което им придава висока реактивност. ROS, които споделят своите несдвоени електрони, са нерадикални форми. Те имат важни химически разлики, но имат сходни механизми за увреждане на ниво биомолекули [24]. Основните ROS, които са от физиологично значение от първата група, са супероксиден анион ( $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$ ), хидроксилен радикал ( $H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + OH^{\cdot}$ ) и хидропероксилен радикал ( $O_2^{\cdot -} + H_2O \rightarrow H_2O^{\cdot}$ ); от втората група - водороден прекис ( $H_2O^{\cdot} + e + H \rightarrow H_2O_2$ ) [3]. Всички кислородни радикали са ROS, но не всички ROS са кислородни радикали. Въпреки че са частици с обикновено кратък полуживот, те отдавна са признати за вещества с важна двойна роля. От една страна те причиняват клетъчно увреждане, като реагират с биомолекули, но също така

функционират като клетъчни сигнални агенти [25]. Реактивните видове (RS), получени от молекулярен кислород (ROS) и азот (RNS), са задълбочено проучвани. Въпреки това, нови радикални видове като хлор (RCS), бром (RBS) и производни на сяра видове също са идентифицирани [26].

В групата на свободните радикали трябва да се посочат: карбонат ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ), въглероден диоксид ( $\text{CO}_2^{\cdot-}$ ), атомен хлор ( $\text{Cl}^{\cdot}$ ). В групата на нерадикалите: пероксиазотиста киселина ( $\text{ONOOH}$ ), нитрил (нитрониев) хлорид ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ), хлорамини, хлорен газ ( $\text{Cl}_2$ ), азотиста киселина ( $\text{HNO}_2$ ), нитрозил катион ( $\text{NO}^+$ ), нитроксил анион ( $\text{NO}^-$ ), диназотен триоксид ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), диазот тетраоксид ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), нитрил хлорид ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ), нитрониев (нитрил) катион ( $\text{NO}_2^+$ ), алкилпероксинитрити ( $\text{ROONO}$ ).

### 1.1.2. Исторически аспекти

Кислородът елиминира живите организми, неспособни да развият антиоксидантни системи. Еукариотните клетки поглъщат бактерии, способни да използват кислород за производство на енергия с образуването на ROS като компонент на този процес. Веднъж включени в клетките, тези симбиотични бактерии се развиват като митохондрии, способни да генерират голямо количество енергия от кислород чрез генериране на ROS [27]. Много е важно, че митохондриите също така развиват регулаторни системи, способни да се предпазват от окислителни увреждания, свързани с тези ROS [28].

В средата на 50-те години на миналия век се съобщава за прилики между индуцираната от радиация токсичност и уврежданията, свързани с кислорода. Свободнорадикалната теория на Gerschman et al. за кислородната токсичност, публикувана през 1954 г., твърди, че токсичността на кислорода се дължи на „частично намалени“ форми на кислород, по-късно идентифицирани като ROS. Понастоящем двойните роли на кислорода и ROS са подчертани в различни експериментални и клинични ситуации (обсъдени в разделите за физиологичните и патогенни роли на оксидативния стрес). Успоредно с това, различните аспекти на активирането на кислорода като ROS, все повече се разкриват.

### 1.1.3. Активиране на кислород и производство на ROS

ROS е активната форма на кислород, необходима за няколко клетъчни функции в покой и в отговор на различни стимули [29, 30]. Действително, двуатомната кислородна молекула ( $O_2$ ) не реагира спонтанно с други молекули, тъй като съдържа два сдвоени електрона („бирадикал“). За да се позволи реакцията на кислород с органични молекули, има 2 възможности:

(1) органичната молекула се трансформира в монарадикал (молекула, съдържаща 1 несдвоен електрон) чрез отстраняване на 1 електрон (окисление) и/или

(2) кислородът се превръща в монарадикал чрез добавяне на 1 електрон (редукция).

Тъй като тези процеси изискват значително енергийно снабдяване, са необходими каталитични системи за премахване на енергийната бариера чрез множество последователни нискоенергийни стъпки. *In vivo*, тези системи са йонни комплекси или ензими, оксигенази и оксидази, които съответно трансформират органични молекули или кислород в монарадикали. Оксигеназите (като циклооксигеназите) катализират извличането на  $H^\bullet$  (водороден атом с неговия електрон) от молекула. Оксидазите (като NADPH-оксидазата) прехвърлят един електрон от донорна молекула към кислорода, като по този начин генерират супероксид ( $O^\bullet$ ). От супероксида водородният пероксид ( $H_2O_2$ ) се образува чрез „дисмутация“ (спонтанна или ензимна). Водородният пероксид е относително стабилен и следователно може лесно да се разпространи далеч от мястото на неговото производство. Възможните последващи стъпки включват:

(1) детоксикация във вода от ензимите глутатион пероксидази или каталаза и/или от комплексите на дихателната верига на митохондриите,

(2) образуване на хидроксил ( $^\bullet OH$ ) в присъствието на желязо (напр. желязо в хем групи) или

(3) превръщане в хипохлорна киселина ( $HOCl$ ) чрез пероксидази.

Хипохлорната киселина е мощен окислител, с достатъчен живот, за да премине във и извън клетката и да окислява почти всички видове биомолекули.

Тесни връзки съществуват и между метаболизма на ROS и метаболизма на реактивни азотни видове, главно азотен оксид ( $NO^\bullet$ ).  $NO^\bullet$  също е свободен радикал, способен свободно да дифундира и неговата активност е ограничена от краткия му живот. Важно е, че най-токсичното производно на  $NO^\bullet$  е пероксинитритът  $ONOO^\bullet$ , който

се получава от комбинацията на  $\text{NO}^{\bullet}$  със супероксид. Пероксинитритът е мощен окислител за всички видове молекули и следователно е силно цитотоксичен. Пероксинитритът е нестабилен и може да бъде превърнат в нови активни видове, като хидроксилен радикал ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) и нитрилов радикал ( $^{\bullet}\text{NO}$ ), отговорни за хидроксилирането и нитрирането.  $\text{NO}^{\bullet}$  може също да реагира с  $\text{O}_2$ , за да генерира нитрит ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ) при подходящи условия.

#### *In Vivo производство на ROS*

In vivo, ROS се произвеждат по различни пътища и се освобождават от няколко типа клетки, със значителни разлики в количеството, произведено при стимулация [31, 32]. Фагоцитите (моноцити/макрофаги и полиморфонуклеарни неутрофили) са най-важните производители на ROS при остра състояния [33]. Като компонент на имунния отговор ROS са предназначени да неутрализират нахлуващите частици и микроорганизми. В клетките, оборудвани с активни митохондрии, има непрекъснато производство на ниски количества ROS, а ROS се произвеждат непрекъснато в много по-ниски количества и в дихателните вериги при генериране на енергия [34].

#### *Ензимни пътища*

*Ензими от семейството на NADPH оксидазата (NOX).* В условия на покой тези ензими не са активни, но бързо се активират от сглобяването на протеинните субединици след свързване с разтворими и рецепторносвързващи медиатори, при което  $\text{O}_2$  лесно се преобразува в  $\text{O}_2^{\bullet}$  (моноелектронна редукция).  $\text{NOX}_2$  е основен ензим на фагоцитите, но NOX ензимите присъстват в много видове клетки, като лимфоцити, фибробласти, ендотелни клетки, миоцити и хондроцити, където се произвеждат умерени количества ROS, служещи като регулатори на клетъчните отговори. Миелопероксидазата (MPO), ензим, присъстващ в азурофилните гранули на неутрофилите, и в по-лаки количества в моноцитите и еозинофилите, използва  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{Cl}^-$  за образуване на  $\text{HOCl}$ . Когато ензимът MPO се освободи от неутрофилите, концентрацията му в кръвта е маркер за активиране на неутрофилите.

*Митохондриални ензими.* В митохондриите  $\text{O}_2$  се редуцира в  $\text{H}_2\text{O}$  от комплексите на дихателната верига, чрез междинен етап на производство на  $\text{O}_2^{\bullet}$  с „изтичане“ на електрони на различни нива на веригата за транспортиране на електрони (комплекс I,

пресечната точка за ubiquinone/cytochrome c и цитохромоксидазата). Митохондрията е оборудвана с бързо индуцируем SOD (Mn-SOD), но също и с NOS, което предполага, че е възможно интрамитохондриално производство на ONOO<sup>-</sup>.

*Ксантин-оксидазата* е цитозолен нехемов ензим, който превръща ксантина или хипоксантина в пикочна киселина. В този процес O<sub>2</sub> служи като акцептор на електрони, образувайки O<sub>2</sub><sup>•</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Неговата дейност вероятно се регулира от NO<sup>•</sup>.

*NO синтазите (NOS)* произвеждат NO<sup>•</sup> от O<sub>2</sub> и L-аргинин, в присъствието на NADPH, калций и/или биоптерин като кофактори [34]. При определени условия, свързани с концентрациите на субстрата и кофактора, NOS произвежда O<sub>2</sub><sup>•</sup> заедно с NO<sup>•</sup>, и увеличава риска от *in situ* генериране на ONOO<sup>-</sup>. Ендотелните и нервните клетки съдържат конститутивен ензим (съответно eNOS и nNOS), произвеждащ физиологични нива на NO<sup>•</sup>, необходими за съдовия тонус и за регулацията на невротрансмисията. По време на възпаление, индуцируема изоформа на ензима NOS (iNOS) се активира в много клетки (макрофаги, неутрофили, ендотелни клетки, гладкомускулни клетки, хепатоцити) и освобождава големи количества NO<sup>•</sup>. Самите митохондрии също съдържат ензим iNOS.

*Множество „свободнорадикални“ ензими* присъстват в много видове клетки и тъкани, като оксидазите със смесена функция на ендоплазмения ретикулум, цитозолните ензими (липоксигенази, простагландин H-синтази или циклооксигенази), пероксизомните ензими (гликолат-оксидаза, D-аминокиселинна оксидаза, урат-оксидаза, мастна ацил Co-A оксидаза) и дори ДНК-метиляращи ензими и ензими, участващи в синтеза на хормони и невротрансмитери. При нормални условия производството на ROS от тези ензими е ниско. Някои метални йони (желязо, мед), освободени при клетъчен лизис, усилват оксидативния стрес, тъй като служат като кофактори на превръщането на водородния пероксид в хидроксил.

#### **1.1.4. Физиологични роли на оксидативния стрес**

Производството и освобождаването на ROS са включени в няколко физиологични пътя и вътреклетъчните концентрации на ROS се контролират строго от антиоксидантните защитни механизми. Интересното е, че ефективността на антиоксидантните механизми не е стабилна във времето, което предполага естествено увеличаване на оксидативния стрес в екстремните етапи от живота.

ROS включват многобройни физиологични функции, които са обстойно прегледани [31, 35]. Вътреклетъчната концентрация на ROS е временно повишена в отговор на стимул, като цитокин, растежен фактор или хормон. Този модел е много типичен във физиологични ситуации, където освобождаването на ROS се контролира бързо от антиоксидантните регулаторни механизми. Когато е поддържан или не е балансиран, повишеният оксидативен стрес вероятно е надвил антиоксидантните способности и ROS може да предизвика увреждане.

Освобождаването на ROS е включено в основните пътища на клетъчно сигнализиране, позволявайки трансдукцията на извънклетъчни стимули в промени в клетъчната физиология чрез модулиране на транскрипцията на някои гени или чрез посттранскрипционна модулация. „Редокс-реагиращите“ сигнални пътища участват във важни функции, като производството на NO<sup>•</sup> и регулиране на съдовия тонус и невротрансмисията, клетъчната адхезия, имунния отговор при хипоксия и апоптоза [31, 35].

Въпреки това ROS често се разглеждат като предимно токсични молекули, тъй като намаляването на оксидативния стрес е свързано с удължаване на продължителността на живота при различни видове. Например, „теорията за стареенето и свободните радикали“ гласи, че всеки организъм остарява, защото клетките натрупват промени, свързани с окислително увреждане, предизвикано от ROS с течение на времето [36]. Дисбаланс между антиоксидантните защитни механизми и количеството ROS, произведени от митохондриите, е предложено по-късно и допълнително подкрепят тази теория [37]. Успехът на този модел води до ръст на потреблението на хранителни добавки с антиоксиданти за които се предполага, че повлияват благоприятно признаците на стареене. Ефектите от манипулирането на оксидативния стрес върху продължителността на живота на различни организми се различават значително, което предполага, че инхибирането на оксидативния стрес с антиоксиданти може да бъде вредно при някои видове и/или определени обстоятелства. Мета-анализ на ефектите върху някои антиоксиданти (бета-каротен, витамини А и Е) при здрави хора (повече от 180 000 участници) показва повишен риск от смъртност в лекуваната група (относителен риск, 1,02) [38]. Тези данните са в съответствие с някои констатации при някои подгрупи пациенти със специфичен риск [39, 40, 41]. Здравословният начин на живот, включително консумацията на храни, богати на антиоксиданти, е очевидно полезен [42].

По същия начин ефектите на антиоксидантите върху признаците на стареене не означават непременно по-дълъг живот.

Друго често срещано физиологично състояние, свързано с повишен оксидативен стрес, са физическите упражнения. Наистина, повишената митохондриална активност в мускулите довежда до повишено производство на ROS. Успоредно с това, исхемичната реперфузия и активирането на неутрофилите по време на тренировка допълнително повишават производството на ROS от ксантин-оксидазата и съответно NOX ензимите. Интензивните упражнения или упражненията при нетренирани индивиди е по-вероятно да бъдат свързани с повишен оксидативен стрес в сравнение с редовната и умерено интензивна аеробна физическа активност. Не е изненадващо, че ползната роля на добавките с антиоксиданти преди тренировка не е потвърдена, въпреки че добавките с антиоксиданти намаляват измеримите нива на биомаркери на оксидативен стрес [43]. Всъщност, дългосрочната редовна физическа активност може наистина да подобри някои антиоксидантни защитни механизми и по този начин може също така да ограничи окислителното увреждане на митохондриите („митохормеза“) [44, 45]. Подобен механизъм се предполага, че обяснява увеличаването на продължителността на живота на при пациенти, подложени на ограничаване на калориите. Ефектите от ограничаването на калориите (което не е свързано с недोхранване) при хората наистина биха могли да удължат живота, както се предполага от големия брой столетници в Окинава, Япония, където ограничаването на калориите е неизбежно, докато недостигът на некалорични хранителни вещества е ефективно предотвратен. Скорошни доказателства показват, че ограничаването на калориите намалява оксидативния стрес [46, 47, 48, 49]. Този проблем в момента се изследва при хора.

### **1.1.5. Патогенна роля на оксидативния стрес**

Участието на прекомерен оксидативен стрес се предполага за редица патологични състояния и повишени нива на биомаркери на оксидативно увреждане се откриват при много хронични заболявания, както и свързани с рискови фактори за развитието на тези заболявания. Балансът между ROS и антиоксидантите е критичен фактор. По-конкретно, редица антиоксиданти (напр. витамини С и Е) сами по себе си са показали мощен прооксидантен ефект при липса на достатъчно количество свободни радикали, които да неутрализират. Следователно, физиологичният излишък на антиоксидантна

концентрация в даден момент, или чрез добавки, или от други фактори, може също да усложни клиничните резултати.

Повишен оксидативен стрес се установява в случаи на хроничен висок прием на алкохол, затлъстяване, тютюнопушене и хронично излагане на замърсители на въздуха. Установяването на по-високи нива на оксидативен стрес при диабет или стресова хипергликемия, хронична обструктивна белодробна болест, хронично и остро възпаление, рак и исхемия-реперфузия допълнително подкрепя хипотезата за патогенетична роля на оксидативния стрес. Обратно, повишената консумация на плодове и зеленчуци оказва синергичен ефект върху антиоксидантните дейности и намалява риска от хронични заболявания, напр. рак и сърдечни заболявания. Въпреки това, първичната и вторичната превенция с диетични добавки от антиоксидантни витамини и микроелементи в общата популация е предимно неефективна [41, 42]. Контрастни констатации също са докладвани от широкомащабни проучвания на добавките, подчертавайки сложността на ролите и регулирането на компонентите на оксидативния стрес *in vivo*. [50] Очевидно видът на използвания антиоксидант и дозата, времето и продължителността на приложение са важни въпроси, които биха могли частично да обяснят неуспехите на някои превантивни стратегии. Следователно, участието на оксидативен стрес може да се счита само за установено, вероятно или правдоподобно, в зависимост от надеждността на подкрепящите доказателства.

#### *Установена роля*

В много ранен етап от живота, особено при недоносени бебета, високите концентрации на кислород са очевидно вредни за ретината („ретролентална фиброплазия“, описана от Ashton et al. [51] през 1954 г.) и за белите дробове (дифузно алвеоларно увреждане-бронхопулмонална дисплазия) [52, 53]. Следователно избягването на високи концентрации на кислород по време на реанимация на новородени е стандарт на грижа.

По подобен начин, някои остри и хронични интоксикации са свързани с оксидативно увреждане, както се вижда от успеха на антиоксидантните стратегии за обръщане на вредните ефекти на отровата. Например, токсичните ефекти на някои метали (желязо, хром, кадмий, арсен), химикали (паракват, менадион, доксорубицин), лекарства (ацетаминофен, троглитазон) и частици и влакна във въздуха са ясно свързани с окислителното увреждане [54].

### *Вероятна роля*

Туморогенните ефекти на ROS са установени и подкрепят хипотезата за патогенетичната роля на оксидативния стрес в онкогенезата. Наистина, ROS може да увеличи клетъчната пролиферация, миграцията и оцеляването и може също така да предизвика увреждане на ДНК. Обратно, някои онкогени могат да модулират вътреклетъчния редокс статус и неговата регулация. Важно е, че в някои случаи приемът на антиоксиданти е увеличил риска от развитие на рак [55]. Невродегенеративните заболявания, като болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон и амиотрофичната латерална склероза, са свързани с маркери на повишен оксидативен стрес. В експериментални модели има доказателства, че инхибирането на оксидативния стрес инхибира прогресията на тези заболявания.

### *Възможна роля*

Сърдечно-съдовите заболявания и атеросклерозата могат да бъдат частично предизвикани от оксидативен стрес, тъй като пътищата на производство на ROS са активирани и окислителното увреждане на фосфолипидите и протеините е докладвано. Въпреки това, широкомащабни проучвания на антиоксиданти не успяват да демонстрират никакъв защитен ефект при рискови индивиди [56].

Въпреки че оксидативният стрес допринася за развитието на диабет тип 2 и свързаните с него усложнения, високата глюкоза също увеличава производството на ROS и оксидативния стрес [57, 58]. Към днешна дата няма доказателства, че инхибирането на производството на ROS предотвратява диабета.

Острите възпалителни състояния са свързани с повишен оксидативен стрес [59]. Някои защитни ефекти могат да бъдат осигурени от превантивната употреба на антиоксиданти при критично болни пациенти [60, 61], особено след травма [62, 63], въпреки че най-адекватният състав, дозата и времето за „антиоксидантни коктейли“ все още не са определени. При някои състояния ранното прилагане на антиоксиданти може да представлява логичен подход за предотвратяване на увреждане и дисфункция на тъканите. Наистина, след травма, изгаряне или по време на сепсис се съобщава за недостиг на кофактори за ендогенните антиоксидантни механизми. Обратно, продължителното приложение на антиоксиданти носи риск от намеса във физиологичните роли на ROS.

Оксидативният стрес е физиологичен път, тясно регулиран от антиоксидантни механизми. Дисрегулацията на оксидативния стрес е свързана с много чести патологични или физиологични състояния. При някои обстоятелства прекалено ентусиазираната употреба на допълнителни или диетични антиоксиданти за предотвратяване или лечение на тези заболявания е била пагубна, във връзка с инхибирането на физиологичните роли, изпълнявани от ROS. Строгата научна оценка при добре дефинирани условия е задължителна, за да се определи подходящото място за манипулации на окислителните пътища в хуманната медицина.

## **1.2. Биомаркери за оценка на нивата на оксидативен стрес**

Реактивните кислородни видове са съединения, които са трудни за измерване при оценка на оксидативния стрес, главно поради много краткия полуживот, така че те едва ли играят ролята на биомаркери. Въпреки това, ако ROS се комбинира с определена биологична молекула, тя оставя уникален химичен „отпечатък“. Получените по този начин биомаркери могат да се използват за оценка на окислителното увреждане или ефектите на антиоксиданти, включително терапевтични агенти. Основният критерий за биомаркера е неговата роля в прогнозирането на по-късното развитие на заболяването. Нещо повече, важни технически критерии за биомаркера са, че той трябва да открива голяма част от общото продължаващо окислително увреждане *in vivo*, трябва да осигурява съгласувани лабораторни анализи, резултатите не трябва да варират при едни и същи условия, трябва да е стабилен по време на съхранение, трябва да използва химически стабилна технология за измерване, и не трябва да се влияе от диета [24]. Няма идеален биомаркер, но много от тях осигуряват достатъчна точност. ROS, като силно реактивни вещества, взаимодействат с околната среда *in vivo*, като включват и стимулират различни ендогенни механизми, както и реагират с многобройни молекули, оставяйки отпечатък, който се превръща в точка на интерес при конкретни оценки.

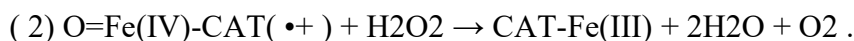
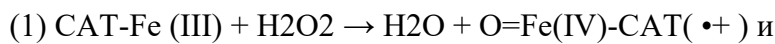
### **1.2.1. Ендогенни антиоксиданти**

Производството на АТР в клетките е присъщо свързано с окисление, редукция и генериране на ROS. Външните фактори включват микробни инфекции, ксенобиотици, хранителни токсини, радиация, замърсяване на околната среда и други. Живите

организми са развили специфични защитни системи срещу вредното действие на свободните радикали. Най-важните механизми са вътреклетъчните. Те действат както с извънклетъчни, така и с диетични екзогенни антиоксиданти. Ендогенните антиоксиданти се разделят на две групи: протеинови (с ензимна активност) и непротеинови. Протеиновите са първата линия на защита, като три са най-важните: CAT (каталаза), SOD (супероксид дисмутаза) и GPx (глутатион пероксидаза).

#### 1.2.1.1. Каталаза (CAT)

Каталазата (CAT), тетрамерен порфирин - съдържащ ензим, открит в почти всички живи организми, изложени на кислород, се намира главно в пероксизомите. Превръщането на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> във вода и молекулярен кислород се извършва в два етапа:



Най-високата активност на CAT изглежда е в черния дроб и еритроцитите [64]. Той може също така да катализира окисляването чрез водороден пероксид на различни метаболити и токсини, включително формалдехид, мравчена киселина, феноли, ацеталдехид и алкохоли. CAT във връзка с оксидативния стрес е широко представена в изследванията през последните двадесет години. В продължение на няколко десетилетия е установено, че ниските нива на CAT са свързани с множество патологични състояния. Има забележим интерес към CAT в областта на трансплантацията през последното десетилетие, с подобни пикове като други биомаркери.

#### 1.2.1.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) е група от ензими, функциониращи като решаваща част от антиоксидантната защита срещу силно реактивни супероксидни радикали, разделяйки ги (дисмутация) на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub>. Тези металопротеини могат да използват като кофактори мед и цинк, манган, желязо или никел. Те работят заедно с глутатион пероксидазата и каталазата и тяхната активност е силно чувствителна към оксидативния стрес. Супероксидът (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) се произвежда като страничен продукт от метаболизма на кислорода. SOD катализира дисмутацията (или разделянето) на този радикал в обикновен молекулярен кислород (O<sub>2</sub>) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Серия от реакции включва метални катиони с промяна на степента им на окисление до +3 за прехвърляне и сдвояване на

електрон в супероксида. Има три форми при хората: SOD<sub>1</sub> се намира в цитоплазмата, SOD<sub>2</sub> в митохондриите и SOD<sub>3</sub> е извънклетъчна. Въпреки факта, че супероксидният анионен радикал (O<sub>2</sub> •) спонтанно се дисмутира, SOD значително ускоряват споменатата реакция и изпреварват увреждащите реакции на супероксида, предпазвайки клетката от токсичност.

### **1.2.1.3. Глутатион пероксидаза (GPx)**

Глутатион пероксидаза (GPx) е общото наименование на семейство ензими с пероксидазна активност. Съществува в две форми: селен-зависима и селен-независима и катализира редукцията на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или органичен пероксид (ROOH) до вода или алкохол [65]. Процесът протича в присъствието на GSH, който се превръща в GSSG (окислен глутатион) по време на тази реакция. От решаващо значение е да се защитят полиненаситените мастни киселини, намиращи се в клетъчните мембрани от оксидативен стрес. По този начин GPx функционира като част от многокомпонентна антиоксидантна защитна система в клетката [66]. Представена е главно в бъбреците и черния дроб; но ниските му нива имат връзка с патологични процеси и в други органи. GPx е първият ензим, който се активира при високи нива на ROS. Обикновено се измерва спектрофотометрично или чрез директен анализ чрез свързване на пероксидазната реакция с глутатион редуктаза с измерване на превръщането на NADPH в NADP.

### **1.2.1.4. Глутатион S-трансферазите (GSTs) и Глутатион редуктаза (GR)**

Глутатион S-трансферазите (GSTs) са семейство метаболитни изозими, най-известни със способността си да катализират конюгацията на редуцирана форма на глутатион (GSH) към ксенобиотични субстрати за детоксикация. Описани са три форми: цитозолна, митохондриална и микрозомална. Конюгирането на GSH чрез сулфхидрилна група към електрофилни центрове на различни субстрати се катализира от GST и такива съединения стават по-разтворими във вода. В допълнение, нуклеофилният GSH реагира с електрофилни въглеродни, серни или азотни атоми на неполярни ксенобиотични субстрати, предотвратявайки взаимодействието на клетъчни протеини, липиди и нуклеинови киселини с токсични реактивоспособни вещества.

Глутатион-редуктазата (GR) катализира редукцията на глутатион-дисулфид (GSSG) до сулфхидрилната форма глутатион (GSH). По този начин се предотвратява

оксидативния стрес, като се поддържа оптимално клетъчно съотношение GSSG/GSH. За клетката е от решаващо значение да поддържа високи нива на GSH. Неговата активност като биомаркер може да се наблюдава чрез реакцията му с NADPH, с абсорбция при 340 nm.

#### **1.2.1.6. Други ендогенни антиоксиданти**

Хемоксигеназа 1 (HO-1) катализира разграждането на хема до биливердин/билирубин, железен йон и въглероден оксид (CO). HO-1 е член на семейството на протеина на топлинния шок (HSP), идентифициран като HSP32, с най-високи концентрации в далака, черния дроб и бъбреците, а на клетъчно ниво се намира предимно в ендоплазмения ретикулум. HO-1 е обект на задълбочено изследване на неговите регулаторни сигнални, имуномодулаторни и криопротективни [70]. HO-1 привлича интерес поради своите антиоксидантни свойства и роля при редица заболявания, включително атеросклероза, Алцхаймер и отхвърляне на трансплантирани органи. Изследва се ролята му в съдовото ремоделиране и атерогенезата [71]. Билирубинът, получен от хема, има свойството да свързва свободни радикали. HO-1 регулира голямо разнообразие от противовъзпалителни, антиоксидантни и антиапоптотични пътища. Той ограничава наличността на хема за съзряване на Nox2 субединицата на NADPH оксидазата и предотвратява сглобяването на функционален ензим и намалява клетъчното генериране на ROS [72]. CO, генериран от HO-1, има антипролиферативни, противовъзпалителни и вазодилаторни свойства, които се появяват чрез активиране на пътя на митоген-активирана протеин киназа (MAPK) [73]. Има забележим, относително постоянен интерес към HO-1 в областта на трансплантациите през последните 20 години.

NADPH-хинон-оксидоредуктаза-1 (NQO1) извършва редукция на хинони до хидрохинони. NQO1 премахва хинона от биологичните системи в реакцията на детоксикация, включваща NADPH, което осигурява пълно окисляване на субстрата без образуване на семихинони и ROS. NQO1 играе роля в метаболизма на убихинон и витамин Е хинон. Той предпазва клетъчните мембрани от пероксидативно увреждане в редуцираното им състояние. Индукцията на NQO1 се медира чрез Keap1/Nrf2/ARE сигнален път, който насърчава експресията на цитопротективни гени и индиректно

регулира p53 и p73 туморни супресорни протеини [75]. Различните механизми и широкото влияние на NQO1 придобива голям изследователски интерес напоследък, особено след 2020 г.

В групата на непротеиновите антиоксиданти един от най-важните е глутатионът (GSH). Той може да предотврати увреждане на важни клетъчни компоненти, причинено от различни ROS, ксенобиотици и тежки метали. GSH е най-разпространеният тиол-съдържащ трипептид в животинските клетки. Първичната редокс двойка в животинските клетки е редуцирано (GSH) и окислено (GSSG) състояние. Повишеното съотношение GSSG към GSH е мярка за по-голям клетъчен оксидативен стрес. GSH се регенерира от GSSG от GR. Глутатионът се свързва и активира йонотропните глутаматни рецептори, което потенциално го прави невротрансмитер [76]. Директното добавяне на глутатион като антиоксидант не е успешно. Въпреки това, добавяне на сурови хранителни материали като цистеин и глицин са използвани за генериране на GSH.

Коензим Q (CoQ10, убихинон, 1,4-бензохинон) се отнася до хиноновата химична група, а 10 се отнася до броя на изопренилните химични субединици в нейната опашка. Наподобява витамините и е мастноразтворим. Той участва в аеробното клетъчно дишане и генерирането на АТФ като компонент на веригата за пренос на електрони. CoQ10 се открива главно в органите с най-високи енергийни изисквания: сърце, черен дроб и бъбреци. Счита се за ендегенно синтезиран липоразтворим антиоксидант, присъстващ във всички мембрани. По време на транспортирането на електрони през клъстерите желязо-сяра, той може да приема само един електрон наведнъж, този, който е от решаващо значение за улавянето на свободните радикали. Биосинтезата му изисква най-малко 12 гена. CoQ 10 може да се измери в кръвна плазма; по-точни измервания обаче могат да бъдат направени в култивирани кожни фибробласти, мускулни биопсии и кръвни мононуклеарни клетки [77].

Алфа-липоевата киселина (ALA) е органично сяра-съдържащо съединение, която се свързва с протеини и работи като кофактор за най-малко пет ензимни системи, включително междинни продукти от цикъла на лимонената киселина, катаболитен път на аминокиселините с разклонена верига и система за разцепване на глицин. ALA е директен антиоксидант, като освен това може да задейства антиоксидантна защита, да подобри усвояването на клетъчната глюкоза и да модулира активността на различни

клетъчно-сигнални молекули и транскрипционни фактори. Антиоксидантните ефекти включват:

- (1) директно отстраняване на ROS и NOS;
- (2) регенериране на други антиоксиданти, напр. CoQ 10, витамин С и GSH;
- (3) хелаиране на метали и инхибиране на медирано от мед и желязо окислително увреждане;
- (4) активиране на антиоксидантни сигнални пътища чрез активиране на ядрен фактор E2-свързан фактор 2 (Nrf2) чрез активиране на експресията на  $\gamma$ -GCL и други антиоксидантни ензими [78];
- (5) регулиране на инсулин-фосфатидилинозитид-3 киназа (PI3K)-протеин киназа В (PKB/Akt) сигналния път чрез инхибиране на никотинамид-аденин динуклеотидфосфат (NADPH) оксидаза (NOX) [79].

ALA се използва като интравенозно средство за лечение на диабетна периферна невропатия [80]; обаче, такава добавка не е от полза за пациенти с болестта на Алцхаймер [81].

Билирубинът (BR) се появява в катаболитния път на разграждането на хема, възникващ от стари или аномални червени кръвни клетки. Производството на биливердин от хема е първата стъпка, след което ензимът биливердин редуктаза (BVR) произвежда билирубин от биливердин. BR има способността да улавя свободните радикали. Когато билирубинът действа като антиоксидант, той се окислява до биливердин, който веднага се редуцира до билирубин от BVR. Този цикъл работи аналогично на GSH и GSSG [82]. Липсата на клетъчен билирубин води до оксидативен стрес [83]. Съобщава се, че BR защитава бъбреците, черния дроб, сърцето и червата от исхемично-реперфузионно увреждане [84, 85].

Феритинът е универсален вътреклетъчен глобуларен протеинов комплекс, който съхранява и освобождава желязото по контролиран начин. Това е основният вътреклетъчен протеин за съхранение на желязо във всички живи организми, поддържащ желязото в разтворима и нетоксична форма. Свободното желязо е токсично за клетките, тъй като действа като катализатор при образуването на свободни радикали от реактивни кислородни видове чрез реакцията на Fenton, произвеждайки силно увреждащ хидроксилен радикал [87]. Свързването на желязото в различни тъканни отделения е от решаващо значение за оцеляването на клетките. При стационарни условия нивото на

феритин в кръвния серум корелира с общите телесни запаси от желязо. Концентрациите на феритин се повишават драстично при наличие на инфекция, рак и оксидативен стрес [88]. Запасите от желязо в заразено тяло са отказани на инфекциозния агент, възпрепятствайки неговия метаболизъм [89].

### 1.2.2. Липидна пероксидация (LPO)

Липидите могат да бъдат окислени, хлорирани и нитрирани чрез набор от ROS, с изключение на  $H_2O_2$ ,  $NO^\bullet$  или  $O_2^{\bullet-}$ , които не реагират с липидите. Липидната пероксидация е сложен процес и широка гама от продукти се образува в променливи количества. LPO е най-широко известната биологична верижна реакция на свободни радикали (FRC). Окисляването на ненаситени мастни киселини или други липиди води до продукти, които са пероксиди на тези съединения. ROS не инициира пероксидация. Тяхното присъствие само засилва процеса. Реакцията на пероксидация, както всяка FRC, може да бъде разделена на три етапа:

1. Инициране: Създаване на радикал на мастна киселина. ROS, които иницират тази реакция в живите клетки, са хидроксил ( $HO^\bullet$ ), перокси ( $LOO^\bullet$ ), алкокси ( $LO^\bullet$ ) и алкил ( $L^\bullet$ ), както и  $O_3$ ,  $SO_2$  и  $NO_2$ . Отделянето на водорода води до образуването на алкилов радикал.  $LH \rightarrow L^\bullet + H_2O$ .

2. Удължаване: Нестабилните мастнокиселинни радикали лесно реагират с молекулярен кислород ( $O_2$ ), образувайки пероксиди, които също са нестабилни и реагират с повече мастни киселинни молекули, създавайки повече радикали. Реакцията протича в цикъл:  $L^\bullet + O_2 \rightarrow LOO^\bullet$ ,  $LOO^\bullet + LH \rightarrow LOOH + L^\bullet$ .

3. Прекратяване: Нарастването на броя на свободните радикали увеличава вероятността от сблъсък между тях, което завършва процеса:  $L^\bullet + L^\bullet \rightarrow L-L$ ,  $LOO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow L=O + LOH + O_2$ ,  $LOO^\bullet + L^\bullet \rightarrow L=O + LOH$ . Реакцията на прекратяване води до продукти като димери на мастни киселини, хидрокси-киселини и оксо-киселини.

Продуктите на липидната пероксидация често реагират с протеини, присъстващи в клетъчните мембрани, създавайки протеин-липидни продукти. По-нататъшните реакции на продуктите на липидната пероксидация водят до синтез на алдехиди, като MDA или 4-хидроксиноненал. Те лесно дифундират през биологичните мембрани и могат да бъдат косвена причина за увреждане на ДНК от ROS. Тези вещества са цитотоксични, мутагенни и канцерогенни и могат да причинят разкъсване на ДНК

вериги. Липидната пероксидация засяга всички клетъчни мембрани, което води до тяхното увреждане и загуба на функция. Процесът може да наруши йонните помпи или транспорта на електрони в дихателните пътища с последващо намалено производство на АТФ [90].

Основните вещества за оценка на липидната пероксидация са веществата, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) и малондиалдеhid (MDA). TBARS се поставят под въпрос в съвременната оценка, тъй като се съобщава, че повечето от тях в човешките телесни течности не са свързани с липидната пероксидация. Въпреки това високоефективната течна хроматография (HPLC) може да осигури точни измервания на MDA-TBA хромоген за директно изследване на MDA. MDA е по-специфичен за липидната пероксидация, но е само един от многото алдехиди, образувани по време на такава реакция, а MDA може да възникне и от атаката на свободните радикали върху сиалова киселина и дезоксирибоза [24]. MDA също така е и биомаркер, който далеч не е перфектен, тъй като някои комплекси на MDA с аминокиселини, които могат да се абсорбират през червата, могат да бъдат повлияни от диета [91]. ДНК-комплексите се образуват от реакцията на MDA с дезоксиаденозин и деоксигуанозин в ДНК. Основният мутагенен е M1G, който добавя окислително увреждане на клетката [92]. Оценката на увреждането на мембраната в сперматозоидите и оценката на функцията на сперматозоидите чрез промяна на течливостта на мембраната, пропускливостта и нарушаване на функционалната компетентност на спермата може да се направи с помощта на нивата на MDA [93]. Съобщава се за по-съвременни маркери, като 4-хидроксиноненал и акролеин, но веществата, които отговарят най-добре на критериите за биомаркери за липидна пероксидация, са изопростаните, специфични крайни продукти от пероксидацията на полиненаситени мастни киселини, с най-представената група — F2-изопростани, които възникват от арахидонова киселина [94]. Изопростаните могат да бъдат получени от ейкозапентаенова киселина или докозахексаенова киселина, образувайки F4- изопростани, наричани още невропростани, поради техния принос към невродегенеративните заболявания [95]. Наличните в търговската мрежа комплекти за имуноанализ могат лесно да ги измерват в плазмата, както и в урината, въпреки че те също не отговарят на критериите за идеални биомаркери, тъй като тяхната концентрация може да бъде повлияна от концентрацията на O<sub>2</sub> и от скоростта на метаболизма.. Изопростаните са специално изследвани в цереброспиналната течност при болестта на

Алцхаймер [96]. Съобщава се, че изопростаните се влияят от перорални антиоксиданти като витамин С или Е [97, 98], като пример за много по-широка дискусия относно възможните терапии на оксидативния стрес; въпреки това, има твърдения, че нивата на изопростан варират според времето на деня и от ден на ден като самия оксидативен стрес [99].

ACR, CRA и 4-HNE са  $\alpha,\beta$ -ненаситени алдехиди, най-реактивните и токсични. По този начин, тези продукти на липидна пероксидация могат да модифицират нуклеофилните странични вериги на аминокиселини: сулфхидрилни групи на цистеин, имидазолони групи на хистидин и аминокиселинни групи на лизин [100]. Образоването на съединения с тези алдехиди е свързано с нарушаване на клетъчното сигнализиране и митохондриална дисфункция [101]. Съобщава се, че токсичността, индуцирана от  $\alpha,\beta$ -ненаситените алдехиди, възниква поради изчерпване на клетъчния GSH, което впоследствие индуцира производството на ROS и води до неправилно функциониране на клетката [102]. Активирането на NF- $\kappa$ B става директно чрез свързване с реактивния цистеин на субединицата на I $\kappa$ B киназа (IKK) или индиректно чрез намаляване на клетъчния GSH [103].

ACR има силна електрофилна реактивност спрямо нуклеофилите; следователно, той нарушава редокс-контрола на протеиновата функция и причинява цитотоксичност чрез необратимо свързване. Той е важен биомаркер за оксидативен стрес за LPO. Нивата на ACR се повишават със стареенето и при някои заболявания, включващи оксидативен стрес и възпаление, като атеросклероза и болестта на Алцхаймер [104, 105], атеросклероза [106], хипертония [107], дислипидемия [108] и инфаркт [109].

CRA се произвежда по време на изгарянето на въглерод-съдържащи съединения, включително цигарен дим. Въпреки това, вътреклетъчно, той се образува като продукт на LPO. CRA намалява нивата на GSH поради ензимно конюгиране и е мутагенен [110]. CRA модулира биологичните реакции чрез различни свързани сигнални пътища, увеличавайки клетъчния оксидативен стрес [111].

4-HNE е мощен алкилиращ агент, който реагира с ДНК и протеини, генерирайки различни съединения, които могат да индуцират сигнални пътища за стрес и апоптоза. Следователно, 4-HNE се свързва с няколко патологични състояния, като ХОББ [112], синдром на остър респираторен дистрес (ARDS) [113] и атеросклероза [114].

7-кетохолестеролът (7КС) е токсичен продукт от реакцията между холестерола и ROS. Натрупването на 7КС може да причини значително увреждане на мембраните, сигналните пътища и цялостната клетъчна функция. 7КС е най-разпространеният неензимно произведен оксистерол *in vivo* [115]. В допълнение, 7КС увеличава производството на ROS чрез активиране на NADPH оксидазата (NOX) и предизвиква апоптотичен стрес-отговор [116]. 7КС е свързан с образуването на поли-ADP-рибоза (PARP), което има последици при много заболявания, свързани с възрастта, включително рак, атеросклероза и болестта на Алцхаймер [117, 118]. Окончателната 7КС-индуцирана клетъчна смърт е причинена от намеса в биологични процеси, включително ензимни реакции, функции на мембраните, окисление на молекули и индуциране на апоптоза.

### **1.2.3. Окисляване на протеини**

Окислителното увреждане на протеините носи тежки последици, тъй като засяга функцията на рецепторите, ензимите и транспортните протеини и допринася за непряко увреждане на други биомолекули, например ензими за възстановяване на ДНК или полимерази в репликацията на ДНК. Окисляването на аминокиселинни остатъци, като тирозин, води до образуването на дитирозин, протеинова агрегация, омрежване и фрагментация. Атаката на свободните радикали върху протеините генерира аминокиселинни радикали, които могат да се свържат или да реагират с O<sub>2</sub>, което води до генериране на пероксилни радикали. Крайните продукти на напредналото гликиране (AGE) са протеинови карбонилни съединения, произведени чрез взаимодействие протеин-ROS. Те могат да бъдат открити в плазмата на пациенти с хронични дегенеративни заболявания, като диабет, атеросклероза, болест на Alzheimer, хронични бъбречни заболявания, както и при диализирани пациенти [119].

Тирозинът е една от основните мишени на протеиновото окисление. Дитирозинът, образуван от атаката на свободните радикали върху широк спектър от протеини, се открива лесно в урината и повишената му екскреция се съобщава при сепсис и квашиоркор [120]. Може да се открие чрез имунохистохимичен метод с използване на ацетилтирамин-флуоресцеинова сонда за откриване на образуването на тирозинови радикали в протеини в клетки, подложени на оксидативен стрес. Силно реактивният хидроксилен радикал окислява фенилаланиновите остатъци до о-тирозин и m-тирозин [121]. Протеините също могат да бъдат атакувани от реактивни хлорни, бромни и азотни

видове, което води до образуването на 3-хлоротирозин, параксидроксифенилацеталдехид, 3,5-дихлоротирозин, 3-бромотирозин и 3-нитротирозин. Тези продукти обикновено се измерват чрез имунооцветяване, HPLC и MS. Базираните на MS анализи могат да открият нитро-, хлоро- и орто-тирозини. Съществуват протеомни методи, които могат да отделят протеини за разпознаване на модифицирани. Съществува също възможност за оценка на протеиновото нитрозилиране, което е обратима модификация, включваща прикрепването на NO<sup>•</sup> към метално място или цистеинов остатък.

Най-често използваният метод за оценка на увреждането на протеините е карбонилният анализ. Карбонилите възникват поради гликиране на протеини от захари, чрез свързване на алдехиди (включително тези, образувани от LPO) към протеини и чрез директно окисляване на странични вериги на аминокиселини и генериране на продукти, като глутамат или аминокиселини полуалдехиди. Карбонилните групи (CO) се измерват чрез дериватизация на карбонилната група с 2,4-динитрофенилхидразин (DNPH), което води до образуването на стабилен динитрофенил (DNP) хидразонен продукт. Продуктът може да бъде открит с помощта на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), спектрофотометричен анализ и едноизмерна или двуизмерна електрофореза, последвана от Western blot имуноанализ [122]. Могат да се вземат проби от кръвна плазма, както и от други телесни течности и тъкани. Карбонилите не са специфични маркери за оксидативно увреждане, тъй като споменатите методи също измерват свързаните алдехиди и гликираните протеини. Карбонилният анализ е количествен метод, който позволява да се оцени средната степен на протеинова модификация.

#### **1.2.4. Окисление на нуклеинова киселина**

Окислителното увреждане на ДНК, най-вече поради хидроксилния радикал, генерира огромна гама от основни и захарни модифицирани продукти [123]. Те могат да бъдат измервани чрез HPLC, газова хроматография-масспектрометрия (GC-MS), течна хроматография-масспектрометрия (LC-MS) и техники, базирани на антитела, но нито една от тях не е установена като златен стандарт. Изчислено е, че всяка клетка при нормални условия е мишена на няколко хиляди атаки срещу нейната ДНК всеки ден. Свободните радикали, атакуващи ДНК-пурины и дезоксирибоза, създават първоначални

продукти, които претърпяват по-нататъшни трансформации. Увреждането на ДНК от свободните радикали се случва много по-рядко от кислородното увреждане на протеините и липидите. Последствията обаче са по-сериозни поради мутагенни или имуногенни промени. Един от основните продукти на окислението на ДНК е 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (8-OHdG) и 8-оксогуанин (8-оксо-Gua) [124].

Гуанинът, ароматно хетероциклично съединение и пурин (систематичното наименование е 2-амино-6-хидроксипурин), е основен градивен елемент на ДНК и РНК, образувайки комплементарна двойка с цитозин, както в свободно състояние, така и като нуклеозид, и е особено податлив на въздействието на свободните радикали в позиция С8[92]. Съотношението 8-OHdG/dG (дезоксигуанозин, една хидроксилна група, отстранена от позиция 2' на рибозната захар) се определя като надежден маркер за оксидативен стрес [125]. Макар че могат да бъдат измервани чрез газова хроматография-маспектрометрия (GC/MS), типичните методи за оценка на 8-oxodG и 8-oxoGua са високоефективна течна хроматография (HPLC), включително електрохимично (EC) и ултравиолетово (UV) откриване на абсорбция за тимидин-гликол (dTg) и тимин-гликол (Tg). Нито един от тези методи обаче не са приети за стандарт, поради следните проблеми: артефактно окисляване на 8OHdG по време на изолиране на ДНК, разлики в окисляването на ядрена и митохондриална ДНК, външна антиоксидантна активност, включително диета, или локализиране на увреждане - активни или неактивни гени, теломери или ДНК без никакво значение, тип клетки или тъкани, използвани за вземане на проби. Възможно е да се оцени 8OHdG в урината, но и този метод е предразположен към артефакти: 8OHdG може да възникне от разграждането на окисления dGTP в ДНК прекурсорния пул и ДНК в храните може да се окисли по време на съхранение и готвене, така че влиянието на диетата не може да бъде изключено. Освен това, проблемът с всички тези анализи е отделянето на много малки количества аналити от урината [126].

### **1.3. Ефект на оксидативния стрес върху човешкото здраве**

Известно е, че оксидативният стрес насърчава индукцията на няколко остри и хронични заболявания, някои от които могат да бъдат дегенеративни или фатални, като:

- онкологични заболявания - Колоректален, гърда, простата [127, 128]
- сърдечно – съдови - Атеросклеротични лезии [129, 130]

- диабет - По-ниска или неефективна инсулинова активност [131, 132]
- Възпаление - Ендотелна дисфункция и тъканно увреждане, ревматоиден артрит [133, 134]
- Невродегенеративни разстройства - Хънтингтън, Алцхаймер, Паркинсон, загуба на паметта, депресия, множествена склероза [135]
- Затлъстяване - Метаболитен синдром, свързан със затлъстяването [136, 137]
- Респираторни заболявания - Астма [138]

#### *Онкологични заболявания*

Оксидативният стрес може да причини директно увреждане на различни биомолекули. Вече е установено, че окислителното увреждане на ДНК е предпоставка за хромозомни аномалии и онкогенно активиране, като по този начин причинява туморогенеза и/или канцерогенеза [127]. ДНК-протеинови кръстосани връзки, деформация в захарта и основната структура са част от структурните промени, предизвикани от ROS. Непрекъснатият оксидативен стрес може да повлияе на протеома и да причини промяна в протеиновата структура [128]. и функцията на протеините, като фосфатази и кинази. Загубата, печалбата или превключването във функцията на тези ензими води до неконтролиран клетъчен растеж [139]. Оксидативният стрес е свързан с рак главно на гърдата, дебелото черво и простатата [140].

#### *Сърдечно-съдови заболявания*

Оксидативният стрес действа като пусков механизъм за образуването на холестеролни плаки по стените на артериите. Това състояние се нарича атеросклероза и причинява обструкция на кръвния поток [129]. Освен това се съобщава, че повишените нива на супероксидните аниони имат пряк ефект върху патогенезата на атеросклерозата. Една от теориите предполага, че тези супероксидни аниони причиняват окислителни модификации в липопротеините с ниска плътност (LDL), водещи до атеросклеротични лезии и натрупване на липиди [130].

#### *Диабет*

Известно е, че високото ниво на захар в кръвта или хипергликемията повишава нивата на ROS, което води до несъответствия в нормалното функциониране на

метаболитните пътища. Един такъв пример е намаляването на активността на глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназата, участваща при въглехидратния катаболизъм, т.е. гликолиза, чрез модифицирането му с ADP-рибозни полимери [131]. Островните бета-клетки на панкреаса се повлияват неблагоприятно, когато взаимодействат с водороден пероксид и супероксидни аниони, които причиняват по-ниска или неефективна инсулинова активност [132].

### *Възпаление*

Активирането на транскрипционни фактори, като NF- $\kappa$ B, причинява възпаление, когато се стимулира от оксиданти. Възпалението и оксидативният стрес са тясно свързани патологични процеси, при които единият може да действа като индуциращ фактор за другия [133]. Ендотелна дисфункция и увреждане на тъканите могат да възникнат на мястото на възпалението с повишен оксидативен стрес [134]. Това може да се илюстрира с патогенезата на ревматоидния артрит, хроничното възпаление на ставите и околните тъкани, което се причинява от образуването на ROS и RNS на мястото на възпаление [135].

### *Невродегенеративни заболявания*

Високото съдържание на липиди, както и високото ниво на консумация на кислород от централната нервна система (ЦНС), повишават нейната чувствителност към оксидативен стрес. Намаляването на течливостта на мембраната чрез липидната пероксидация повишава пропускливостта за  $Ca^{2+}$ , което влияе върху освобождаването на невротрансмитери [134]. Болестта на Хънтингтън, Алцхаймер, болестта на Паркинсон, амиотрофичната латерална склероза (ALS), загубата на паметта, депресията и множествената склероза са примери за заболявания, в чиято патогенеза участва оксидативният стрес [141, 131].

### *Затлъстяване*

При пациенти със затлъстяване се наблюдава намаляване на вазодилаторния отговор към ацетилхолин в резултат на индуцирането на оксидативен стрес [136]. Наднорменото тегло води до нарушения във функцията на мастната тъкан, което от своя страна улеснява хипергликемията, действаща като фактор, допринасящ за захарен диабет

тип2 [137]. Предполага се, че рискът да се развие метаболитен синдром, свързан със затлъстяването, е пропорционален на повишаването на нивото на оксидативния стрес [138].

#### *Респираторни заболявания*

Възпалението на дихателните пътища се свързва с периодично влошаване на астмата. Наблюдавано е повишаване на нивата на водороден пероксид и изопростани в храчките и издишания въздух по време на алергична реакция [139].

### **1.4. Затлъстяване и оксидативен стрес**

Затлъстяването е сериозен здравен проблем, който влошава качеството на живот, и е свързано с редица усложнения, като диабет, сърдечно-съдови заболявания, астма, нарушения в съня, чернодробна или бъбречна дисфункция и др. Затлъстяването е сложно метаболитно разстройство с многофакторен произход. Излишната или небалансирана секреция на адипокини, често срещана при затлъстяване, предизвиква нискостепенно възпаление, което от своя страна усилва периферната инсулинова резистентност и има множество ефекти върху функцията на ендотелните клетки. Има няколко хипотези, които се опитват да обяснят инфилтрацията на мастната тъкан с провъзпалителни клетки, но най-широко приета е хипотезата за хипоксията [142]. Нарастващите данни показват, че оксидативният стрес играе роля като критичен фактор, подпомагащ развитието на усложненията на затлъстяването. Само по себе си то може да предизвика системен оксидативен стрес чрез различни биохимични механизми, като генериране на супероксид от NADPH-оксидази, окислително фосфорилиране, автоокисление на глицералдехид, активиране на протеин киназа C.

Оксидативният стрес играе важна роля в развитието на съпътстващи заболявания при затлъстяване. През последните години в литературата са докладвани доказателства за предизвикан от затлъстяване оксидативен стрес при хора [143]. Възможните фактори, допринасящи за оксидативния стрес при затлъстяване, включват хипергликемия [144], повишени нива на тъканни липиди [145], дефицит на витамини и минерали [146, 147], хронично възпаление [148], хиперлептинемия [149], повишена мускулна активност за носене на прекомерно тегло [150], ендотелна дисфункция [151], нарушена митохондриална функция [152]. Малондиалдехид (MDA), F-2 изопростани (F2-IsoP), 8-

isoPGF 2 $\alpha$  и протеинова карбониляция са добре известни биомаркери за оксидативен стрес в плазмата, серума или урината при затлъстяване. Наблюдавана е значителна положителна корелация между ИТМ и биомаркерите за оксидативен стрес [143]. Установено е, че активността на антиоксидантните ензими Cu-Zn супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) е по-ниска в еритроцитите на пациенти със затлъстяване в сравнение с тези на контролите без затлъстяване [153, 154]. Редуциращата желязо антиоксидантна сила (FRAP) и общият антиоксидантен статус (TAS) са използвани като цялостни мерки за способността за инактивирането на радикалите от антиоксидантите в плазмата. Няколко проучвания съобщават за по-ниски плазмени нива на FRAP и TAS при пациенти със затлъстяване в сравнение с тези, наблюдавани при контроли без затлъстяване [143, 155, 156]. Оксидативният стрес, предизвикан от затлъстяването, причинява развитието на различни патологични събития, включително инсулинова резистентност и диабет, сърдечно-съдови усложнения, нарушения на съня, астма, онкологични проблеми, репродуктивни проблеми, ревматологични проблеми и чернодробна недостатъчност [157, 158, 159].

Висцералното затлъстяване често е придружено от хронична хипергликемия, оксидативен стрес и нискостепенно хронично възпаление. Оксидативен стрес настъпва, когато производството на реактивни кислородни видове (ROS) надвишава ендегенната антиоксидантна активност [160, 161]. Комбинацията от свръхпроизводство на ROS и RNS и недостатъчно ефективен клетъчен антиоксидантен капацитет генерира оксидативен стрес, който от своя страна е един от най-важните молекулярни механизми, лежащи в основата на развитието на метаболитни усложнения, предизвикани от затлъстяването [162, 163]. Потенциалните щети са наречени „окислително увреждане“.

Много ендегенни и екзогенни процеси могат да генерират свободни радикали в биологичните системи. Те могат да се образуват като част от ензимните каталитични цикли и могат да имат полезни свойства, т.е. защитни механизми и сигнални молекули. Външните радикали са другият основен източник на оксидантен стрес за биологичните системи. Те включват различни видове високоенергийна радиация, атмосферни замърсители, разтворители, наред с други химически свободни радикали в биологията и медицината [161, 164].

Според механизма, отговорен за появата на ROS, вътреклетъчните триглицериди инхибират движението на аденозиновите нуклеотиди и водят до натрупване на аденозин

трифосфат (АТФ), както и до намаляване на аденозин дифосфата в митохондриите (ADP). Това води до намаление на скоростта на окислително фосфорилиране и освобождаването на електрони и свободни радикали, което от своя страна води до производството на реактивни кислородни видове (ROS), които увреждат тъканите и клетките [165, 142]. Маснатият тъкан вече не се разглежда като пасивен източник на свободни мастни киселини (FFA), а като активен ендокринен и паракринен орган, секретирал все по-голям брой медиатори, наречени адипокини. Клетъчните съставки на маснатият тъкан отделят голям брой биоактивни адипокини, сред които, но не само лептин и адипонектин, които имат ендокринни, паракринни и автокринни ефекти [142, 166]. Адипоцитите и макрофагите, получени от маснатият тъкан, са източник на циркулиращи медиатори на възпалението. Излишната или небалансирана секреция на адипокини, често срещана при затлъстяване, предизвиква нискостепенно възпаление, което от своя страна усилва периферната инсулинова резистентност и има множество ефекти върху функцията на ендотелните клетки. Има няколко хипотези, които се опитват да обяснят инфилтрацията на маснатият тъкан с провъзпалителни клетки. Най-широко приета е хипотезата за хипоксията [166, 167].

Хиперлептинемията е друг механизъм, който увеличава производството на ROS при затлъстяване. Лептинът е протеин, синтезиран главно в маснатият тъкан. Основната му роля е контролът на апетита. Мутациите в лептиновия ген или в лептиновия рецепторен ген се асоциират със затлъстяване. Няколко проучвания показват пряка роля на лептина в метаболизма на липидите [168]. Хиперлептинемията предизвиква оксидативен стрес, който се съпътства от възпалителен процес [165].

Други фактори, които също допринасят за оксидативния стрес при затлъстяване, включват ниска антиоксидантна защита, хронично възпаление и генериране на постпрандиални реактивни кислородни радикали [160, 169]. Образуването на продукти на липидната пероксидация (LPO) е едно от последствията на оксидативния стрес. Това може да доведе до повишена мембранна пропускливост, до тежка цитотоксичност и предиспозиция към различни заболявания, включително ускорено стареене. С намаляване на нивата на оксидативен стрес тези рискове пропорционално намаляват [170].

Установена е значителна положителна корелация между ИТМ и биомаркерите за оксидативен стрес. Активността на антиоксидантните ензими Cu-Zn

супероксиддисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) е по-ниска в еритроцитите на затлъстелите лица в сравнение с тези с нормално телесно тегло [171]. Оксидативният стрес, предизвикан от затлъстяване, отключва различни патологични прояви, включително инсулинова резистентност и диабет, сърдечно-съдови усложнения, нарушения на съня, астма, онкологични проблеми, ревматологични проблеми и чернодробна недостатъчност [169].

Изследванията на клетъчни култури на животни показват, че оксидативният стрес може да доведе до увеличаване на диференциацията и пролиферацията на адипоцитите, както и на техните размери [169, 170, 172]. След като капацитетът на мастната тъкан бъде надвишен, засиленото освобождаване на про-възпалителни цитокини увеличава риска от развитие на съпътстващи заболявания. Нискостепенното възпаление, метаболизмът и оксидативният стрес са основните механизми на патогенезата при затлъстяването. Установено е, че ROS участват в контрола на телесното тегло, като оказват различни ефекти върху хипоталамусните неврони, контролиращи чувството за ситост и глад [173]. Затлъстяването само по себе си също може да предизвика системен оксидативен стрес чрез множество биохимични механизми, като например генериране на супероксид от NADPH оксидази (NOX), окислително фосфорилиране, глицералдехидно автоокисление, активиране на протеин киназа C и полиол- и хексозаминови пътища [162, 167, 174]. Има съобщения, че жените имат по-голяма устойчивост срещу окислителни и възпалителни събития, отколкото мъжете [170].

Оксидативният стрес играе важна роля в развитието на сърдечно-съдови рискови фактори сред пациентите със затлъстяване. Ниските нива на циркулиращи липопротеини с висока плътност (HDL), повишен клирънс на HDL, по-високи нива на постпрандиални триглицериди и повишени нива на LDL водят до генериране на ROS в ендотела [169]. Повишеният оксидативен стрес, причинен от прекомерното производство на ROS и компрометираната естествена антиоксидантна защита, допринасят за промени в кръвно-мозъчната бариера чрез няколко механизма, включително окислително увреждане на клетъчните органели, реорганизация на цитоскелета и отделяне на медиатори на възпалението [170, 175]. През последните години множество проучвания определят оксидативния стрес и възпалението като централни медиатори на артериалната фибрилация в сърдечния мускул, подложен на метаболитен стрес. Митохондриите,

изолирани от предсърдни тъкани на пациенти с диабет и животински модели, показват повишена емисия на реактивни кислородни форми (ROS), отчасти поради нарушен електронен транспорт и хипергликемия [176].

През последните десетилетия хранителните навици се промениха и броят на храненията се увеличи. По този начин по-голямата част от хората прекарват по-голямата част от деня в постпрандиално състояние. Постпрандиалният отговор на гликемията, инсулинемията и връзката му с постпрандиалните маркери за оксидативен стрес при субекти с коремно затлъстяване не са добре известни [177].

Свързаните със застаряването промени като намалена мускулна маса и повишена висцерална мастна тъкан, се наричат саркопенично затлъстяване и водят до повишен сърдечно-съдов риск. Като цяло, намалената мускулна маса води до по-нисък общ разход на енергия, което води до развитие на висцерално затлъстяване. Междувременно натрупването на висцерална мастна тъкан, придружено от инфилтрация на макрофаги, предизвиква леко хронично възпаление, което води до дисбаланс на адипоцитокините. Нарастващите нива на възпалителни цитокини въздействат отрицателно върху скелетните мускули чрез катаболни ефекти [178].

Тъй като естественото стареене на животните не протича във вакуум, важно е също така да се вземе предвид ролята, която външните фактори играят върху развитието на свързаните с възрастта заболявания, както и върху самото стареене. Животът на Земята е постоянно изложен на многобройни генератори на ROS, както естествени (т.е. ултравиолетова светлина и т.н.), така и създадени от човека (т.е. пестициди, електромагнитни полета и др.) в допълнение към оксидативния стрес, генериран от митохондриалното окислително фосфорилиране. Външните източници могат значително да променят резултата от изучаването на дълголетието чрез механизми, медиранни от оксидативен стрес [179, 180].

#### **1.4.1. Условия, генериращи оксидативен стрес при затлъстяване**

##### **1.4.1.1. Хипергликемия и оксидативен стрес при затлъстяване**

Затлъстяването е пряко свързано с инсулинова резистентност и хипергликемия. Вътреклетъчното глюкозно претоварване увеличава гликолитичния път и цикъла на трикарбоновите киселини, което води до свръхпроизводство на NADH и FADH<sub>2</sub>.

Полученото увеличение на протонния градиент през митохондриалната мембрана причинява изтичане на електрони, което води до производство на супероксид. Получените свободни радикали инхибират глицералдеhid-3-фосфат-дехидрогеназата и пренасочват метаболитите към четири алтернативни пътя [183]: (1) глюкозата се отклонява към полиолния път; (2) фруктозо-6-фосфатът се измества към хексозаминовия път; (3) триозните фосфати произвеждат метилглиоксал - основният прекурсор на крайни продукти на гликиране (AGE); и (4) дихидроксиацетон фосфатът се превръща в диацилглицерол, който активира протеин-киназа C (PKC) пътя.

Активирането на полиолния път причинява изчерпване на NADPH и увеличава превръщането на глюкозата в сорбитол, което активира няколко гена на стрес и причинява оксидативен стрес, както е доказано в няколко проучвания върху животни [184]. Образуването на глюкозамин-6-фосфат в хексозаминовия път инхибира активността на тиоредоксина и индуцира оксидативен стрес с увреждане на функцията на ендоплазмения ретикулум (ER). AGE и PKC стимулират производството на ROS/RNS чрез активиране на NOX и NF- $\kappa$ B [185, 186]. Активирането на NOX ензимите увеличава производството на супероксидни радикали ( $O_2^{\cdot-}$ ) чрез катализиране на редукцията на кислород, използвайки NADPH като вътрешен донор на електрони [187]. Автоокислението на глюкозата също произвежда реактивни оксиданти, подобни на хидроксилните и супероксидните радикали. AGE се свързва със специфични рецептори на клетъчната повърхност, причинявайки модификация на пострецепторното сигнализиране и насърчава по-нататъшното генериране на ROS [188]. Активирането на NF- $\kappa$ B задвижва транскрипция на адхезионни молекули (E-селектин, междуклетъчна адхезионна молекула-1 и ендотелин-1), провъзпалителни цитокини [фактор на туморна некроза- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлевкин (IL)-6], iNOS и микроРНК, участващи в адипогенезата, възпалението и оксидативния стрес [189].

#### **1.4.1.2. Повишени нива на липиди и оксидативен стрес при затлъстяване**

Затлъстяването е свързано с увеличаване на плазмените свободни мастни киселини (FFA), както и с прекомерно натрупване на мазнини в бялата мастна тъкан. Повишените плазмени FFA насърчават генерирането на  $O_2^{\cdot-}$  в митохондриалната електротранспортна верига чрез инхибиране на транслокацията на аденинови нуклеотиди [190]. FFA стимулират производството на реактивни междинни продукти

чрез РКС-зависимо активиране на NOX в култивирани съдови клетки [191]. Конюгираните мастни киселини са податливи на окисление, стимулират образуването на радикали и засилват натрупването на окислителни странични продукти. Чувствителността на липидите към окислителна модификация се доказва с по-високите концентрации на 4-хидроксиноненал (4-HNE) на единица интрамускулни триглицериди при пациенти със затлъстяване [192]. По-високите концентрации на липидни молекули при затлъстелите също могат да представляват разширена цел за окислителна модификация от ROS [193]. В проучване с няколко животински модела на затлъстяванесе установява, че натрупването на прекомерна мазнина в бялата мастна тъкан причинява увеличаване на липидната пероксидация [194]. При проучвания върху животни се наблюдава, че затлъстяването повишава активността на NOX и намалява експресията на иРНК и активността на антиоксидантни ензими, като SOD, каталаза (CAT) и GPx в бялата мастна тъкан [194]. Диетичният прием на специфични липиди също предизвиква систематичен оксидативен стрес. Консумацията на конюгирана линоленова киселина повишава концентрацията в урината на 8-epi PGF 2 $\alpha$  при мъже на средна възраст с абдоминално затлъстяване [195].

#### **1.4.1.3. Дефицит на витамини и минерали и оксидативен стрес при затлъстяване**

Необходима е адекватна вътреклетъчна антиоксидантна защита за поддържане на баланса антиоксидант-прооксидант в тъканите. Недостигът на витамини и минерали също може да допринесе за развитието на нарушена антиоксидантна защита в патогенезата на затлъстяването [146, 147]. Плазмените нива на  $\alpha$ -токоферол или  $\beta$ -каротен, изразени на единица плазмен липопротеин с ниска плътност (LDL), са добре известни биомаркери за оценка на антиоксидантната защита в циркулиращите липиди. Установено е, че повишаването на ИТМ е свързано с ниски нива на каротеноиди, витамин С и витамин Е [196, 197]. Проучването на риска от развитие на атеросклероза на коронарните артерии при млади възрастни (CARDIA) съобщава за обратна връзка между ИТМ и общата серумна концентрация каротеноиди ( $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин,  $\alpha$ -криптоксантин и зеаксантин/лутеин) [198]. В проучването National Health and Examination затлъстелите деца показват нива на серумен  $\beta$ -каротен по-ниски от тези, наблюдавани при деца с нормално тегло [146]. В друго проучване се наблюдава, че

затлъстелите момичета имат по-ниски плазмени нива на  $\alpha$ -токоферол/LDL и  $\beta$ -каротен/LDL от тези, наблюдавани при момичета без затлъстяване [199]. Повечето пациенти със затлъстяване имат силно понижени нива на витамини, особено витамини А, В6, С, D и Е [200].

Плазмените нива на витамин С са обратно пропорционално свързани с централното разпределение на мазнините [201]. Възрастни със затлъстяване (ИТМ >50) също показват по-ниски плазмени нива на витамин Е/триглицериди в сравнение с възрастни без затлъстяване (ИТМ <30) [202]. По-ниски нива на селен и цинк (микроелементи – кофактори на антиоксидантни ензими) са наблюдавани при деца с централно затлъстяване [203]. Освен това пациентите с болестно затлъстяване също показват дефицит на магнезий, селен, желязо и цинк [204]. Тези резултати предполагат, че в популацията със затлъстяване неадекватните концентрации на витамини и минерали причиняват наблюдаваната нарушена антиоксидантна защита.

#### **1.4.1.4. Други условия**

##### *Роля на типа диета за предизвикване на оксидативен стрес при затлъстяване*

Диетата е друг възможен фактор, допринасящ за генерирането на ROS при затлъстяване и свързаните с него рискови фактори. Наблюдавано е, че консумацията на диета с високо съдържание на мазнини и въглехидрати предизвиква значителен оксидативен стрес и възпаление при хора със затлъстяване [205, 208]. По-ниският хранителен прием на антиоксиданти ( $\beta$ -каротен, витамин Е и С и др.), може да причини неадекватна антиоксидантна защита [206]. Диетичният прием на антиоксиданти е обратно пропорционално свързан със степента на затлъстяване [207], ИТМ и липидната пероксидация [206, 209].

##### *Повишена мускулна активност и оксидативен стрес при затлъстяване*

При затлъстяване повишената мускулна активност може да генерира прекомерни свободни радикали чрез активиране на метаболитни пътища, включително повишена активност на веригата за транспортиране на електрони и превръщане на хипоксантин в урат [210]. Освен това бързият трансфер на електрони по време на усилено дишане може да доведе до изтичане на някои електрони от веригата за транспортиране на електрони

[211]. Поради тази причина сред затлъстелите индивиди скоростта на клетъчното дишане и консумацията на кислород в мускулната тъкан може да се влоши по време на физически дейности. Наблюдавано е, че по време на една и съща активност при ходене хората със затлъстяване имат 38% по-висока консумация на кислород, отколкото индивидите без затлъстяване и че тези стойности корелират със стойностите на липиден хидропероксид след тренировка [155].

Затлъстелите индивиди са механично по-малко ефективни по време на тренировка и тази недостатъчност допринася за увеличаване на разход на енергия за дадено физическо натоварване [143]. Увеличаването на митохондриалното дишане за производство на енергия е свързано с по-високи нива на липиден хидропероксид при хора със затлъстяване [155].

#### **1.4.2. Метаболитен синдром и затлъстяване**

Затлъстяването е заболяване, което се дължи на прекомерно натрупване на мастна тъкан в организма. То е резултат от дисбаланс на енергийния прием и енергоразхода – т.е. хората наддават на тегло, когато приемат повече калории, отколкото изгарят [172]. Затлъстяването се приема като сериозен здравен проблем, който влошава качеството на живот поради свързаните с него усложнения, включително диабет, сърдечно-съдови заболявания, рак, астма, нарушения на съня, чернодробна и бъбречна дисфункция и безплодие. Това е сложно метаболитно разстройство с многофакторен произход.

В резултат на всичко това затлъстяването е свързано с увеличаване както на разходите за здравеопазване, така и на риска от преждевременна смърт [176, 169, 164].

Затлъстяването, като резултат от взаимодействието на гени, околна среда, начин на живот и емоционални фактори, е достигнало епидемични размери в световен мащаб. [165]. С глобалната популация на затлъстели индивиди ( $ИТМ \geq 30$ ), оценена на приблизително 400 милиона, рискът от метаболитен синдром, диабет и сърдечно-съдова смъртност са все по-тревожно високи [161]. Затлъстяването се смята за втората най-честа предотвратима причина за смърт след тютюнопушенето, като обществените здравни разходи, които генерира, заемат първо място. Затлъстяването е свързано с 36% увеличение на болничните и амбулаторни разходи и 77% увеличение на разходите за лекарства, в сравнение с 21% увеличение на болничните и извънболнични разходи при пушачи, за които увеличените разходи за медикаментозно лечение са 28% [168].

Захарният диабет е сред най-често срещаните усложнения на затлъстяването. Неговото разпространение също нараства застрашително в световен мащаб. Според Международната диабетна федерация (IDF) през 2017 г. 451 милиона възрастни страдат от диабет (възраст 18 - 99), а до 2045 г. броят им ще нарасне до 693 милиона. Почти половината от хората с диабет са недиагностицирани. 327 милиона от страдащите от ЗД са в трудоспособна възраст. През 2017 г. около 5 милиона смъртни случая по целия свят се дължат на болестта във възрастовия диапазон 20-99 години [162, 175].

СЗО дефинира наднорменото тегло като индекс на телесна маса (ИТМ) от 25 до 29.9 kg/m<sup>2</sup> и затлъстяването като ИТМ >30 kg/m<sup>2</sup>. Този показател не би могъл да бъде дефиниращ параметър, защото не дава информация за разпределението на мазнините. Последните проучвания показват, че свързаните със затлъстяването рискови фактори зависят не толкова от излишното телесно тегло само по себе си, а по-скоро от регионалното разпределение на телесните мазнини. Коремните мазнини са съществен рисков фактор за заболявания, свързани със затлъстяването; натрупването на висцерална мастна тъкан стимулира прооксидантните и възпалителните процеси [169].

За да можем да се определят категориите на наднормено тегло и затлъстяване, трябва да се вземе предвид нормалното количество мастна тъкан в организма. Изразено като процент, то е между 25-30% при жените и 18-23% при мъжете. Жени с телесна мастна тъкан > 30% и мъже с телесна мастна тъкан > 25% се определят като затлъстели. Затлъстяването и метаболитният синдром са социално-значими заболявания, чиято честота се е увеличила близо 3 пъти през последните 40 години. През последните десетилетия стандартът и начинът на живот, както и изобилието от хранителни продукти, съдържащи преработена захар и въглехидрати, са сериозни предпоставки за това явление. Метаболитните фенотипи на затлъстялото и на диабетното сърце имат редица сходства [160]. Затлъстяването е свързано с повишена предразположеност към депресия, и съответно към фактори, като хронична болка, намалена подвижност и проблеми, свързани със социалното възприемане и стигмата [170]. Затлъстяването е свързано с повишено натоварване върху ставите и увеличава провъзпалителните цитокини, които насърчават допълнително разрушаване на ставите и развитието на артрит - една от най-честите причини за хронична болка и намалена подвижност при възрастни. От своя страна депресията увеличава риска от затлъстяване, като се има

предвид, че намалената активност, умората и промените в апетита са основните симптоми [170, 210].

Саркопенията е качествена и количествена промяна в скелетните мускули, определяна като загуба на мускулна маса и сила, и водеща до физиологични нарушения. С наблюдаващото се застаряване на обществото, причинената от саркопения, инвалидността при възрастните хора се превръща в сериозен здравен проблем. Тъй като скелетната мускулатура е тясно свързана с процеса на усвояване на глюкозата, саркопенията често се съпътства от инсулинова резистентност, което води до развитие на диабет тип 2 [211].

### **1.5. Отслабване на тегло и оксидативен стрес**

Отслабването на тегло е свързано с подобряване на рисковите фактори за сърдечно-съдови заболявания и намаляване на риска от диабет тип 2 и заедно с физическата активност се препоръчва като първа линия на лечение на метаболитен синдром.

Оксидативният стрес и възстановяването на ДНК са процеси, свързани със стареенето, както и с множество хронични заболявания. Те имат пряка връзка със затлъстяването. В проучвания върху животни е доказано, че ограничаването на калориите е ефективно за намаляване на оксидативния стрес и увеличаване на способността за възстановяване на ДНК. Данните от животински модели и клетъчни линии подкрепят ролята на оксидативния стрес и ROS в онкогенезата чрез инактивиране на туморни супресори, увеличаване на експресията на провъзпалителни цитокини и индуциране на сигнални пътища [212].

През последните 40 години изследванията на стареенето се фокусират върху механизмите, лежащи в основата на благотворното въздействие върху здравето от трайно намаляване на приема на калории под обичайните нива, като същевременно се поддържа достатъчен прием на основни хранителни вещества. Наблюденията при различни лабораторни животни показват, че ограничаването на калориите, започващо рано или в средата на живота и поддържано през значителна част от времето, увеличава дълголетието [213]. Повечето терапевтични ръководства препоръчват умерена редукция на тегло от 5% -10% като оптимално за подобряване на метаболитната функция и здравните резултати. [214].

Значението на намаляването на мастната тъкан и системното възпаление за полезните метаболитни ефекти от загубата на тегло е неясна поради противоречиви резултати от различни проучвания, показващи увеличение, снижение или липса на промяна на маркерите на възпалението след иницирана от диета редукция на тегло [214, 215]. Промените в начина на живот като превенция на хронични заболявания са част от холистичния подход и могат да намалят медицинските разходи. Правилно хранене и физическа активност активират множество метаболитни пътища, намалявайки продукцията на медиатори на възпалението и производството на свободни радикали [216, 217]. Бързото отслабване на тегло е свързано потенциално с по-големи промени в обиколката на талията и стойностите на кръвното налягане. Въпреки това, за дълготрайното подобряване на метаболитните показатели по-голямо значение има абсолютната стойност на намаляване на теглото и продължителното задържане на постигнатия резултат.

### **1.5.1. Механизми за отслабване на тегло**

Диетичното ограничаване на калориите (като същевременно се поддържа адекватно хранене) има потенциал да удължи живота, като същевременно предпазва от спад на биологичната функция и намалява риска от заболявания, свързани със стареенето. Биологичните механизми, лежащи в основата на благоприятните ефекти на ограничаването на калориите върху здравните резултати, са интензивно изследвани и включват промени в енергийния метаболизъм, инсулинова чувствителност, оксидативен стрес, възстановяване на ДНК, възпаление и невроендокринни процеси [181].

Понастоящем се изследват ефектите на различни диети за повлияване на метаболитните процеси, свързани със затлъстяването, диабета, сърдечно-съдовите заболявания и други хронични незаразни заболявания. Основните компоненти на метаболитния синдром – затлъстяване, повишени нива на глюкозата в кръвта на гладно, високи триглицериди, нисък HDL холестерол и повишено артериално налягане, се повлияват благоприятно при намаляване на вноса на въглехидрати с храната. Ограничаването на калорийния прием намалява или забавя появата на заболявания, свързани със затлъстяването, предизвиквайки значителна загуба на тегло и благоприятни противовъзпалителни ефекти, като намалява производството на свободни радикали, увеличава устойчивостта към стрес и удължава живота. Разнопосочни данни са

съобщавани относно състава на идеалната диета. За редукция на тегло често се прилага повече от един диетичен режим.

През последните 50 години широко се възприема фактът, че наситените мастни киселини са вредни за здравето и общият холестерол е свързан със смъртността. Единодушно е мнението, че транс-мазнините са вредни за здравето и те следва да бъдат изключени от храните. Въпреки наличието на съвременни ефикасни терапевтични методи за снижаване нивата на холестерола, в последните години честотата на затлъстяване, диабет и сърдечно съдови заболявания нараства и добива епидемични размери. Следвайки препоръките за здравословно хранене и намалявайки наситените мазнини в диетата, се наблюдава относително повишаване на приема на въглехидрати и храни с висок гликемичен индекс. Изследвания сочат, че нисковъглехидратни диети, богати на мазнини, могат да повлияят хода на захарен диабет тип 2.

Кетогенната диета (КД) е с ниско съдържание на въглехидрати и високо съдържание на мазнини, индуцираща синтеза на кетони [218, 219]. Тя е диетичен режим, създаден през двадесетте години на XX век за лечение на резистентна епилепсия и е добила популярност като метод за редуциране на теглото през 70-те години на XX век. Ниският прием на глюкоза стимулира катаболизма на мазнините за получаване на енергия, което води до натрупване на ацетил-КоА и синтез на кетонни тела в черния дроб, които се изпращат в периферните тъкани, където те се окисляват, за да произведат енергия.

Редукцията на тегло чрез диета често е последвана от неговото възстановяване. Клетъчният стрес се увеличава в мастната тъкан на пациенти със затлъстяване. Връзката между клетъчния стрес и възстановяването на теглото обаче е неясна. Описано е обратно покачване на клетъчния стрес при възстановяване на редуцираното тегло [220]. Както в научната литература, така и в популярните издания, зеленчуците без нишесте са приети за здравословна храна, бедна на въглехидрати, тъй като заболяванията, свързани с възпаление и оксидативен стрес, могат да екзацербират при високи нива на глюкоза в кръвта.

Интермитентното гладуване - практиката на редуване на периоди на хранене и гладуване - се очертава като ефективна терапевтична стратегия за подобряване на множество кардиометаболитни ефекти. Циркадната система или вътрешният биологичен часовник може да обясни защо ефектите на интермитентно гладуване изглеждат зависят

от времето на деня. Глюкозният, липидният и енергийният метаболизъм се регулират от циркадната система, която ги повишава в някои периоди от деня и понижава в други. При хората инсулиновата чувствителност е по-висока сутрин, отколкото следобед или вечер, което предполага, че човешкият метаболизъм е оптимизиран за прием на храна сутрин. Всъщност проучванията при хора показват, че храненето в съответствие с циркадните ритми в метаболизма чрез увеличаване на приема на храна по време на закуска и чрез намаляване по време на вечеря подобрява гликемичния контрол, редуцията на тегло и нивата на липидите, а също така намалява и чувството за глад [221].

Упражненията са важна интервенция за подпомагане и ускоряване на процеса на отслабване в допълнение към ефективен хранителен план. Физическата активност стимулира метаболизма в човешкия организъм, като влияе на окислителните и невроендокринните процеси и възпалението [222]. Интензивните физически упражнения обаче могат да повлияят неблагоприятно върху баланса между оксидативните и антиоксидантните фактори и по този начин да причинят повишени нива на оксидативен стрес [181, 215, 222]. Интензивните силови упражнения, натоварващи сърдечно-съдовата система и дишането, са свързани с краткотрайно увеличаване на нивата на оксидативен стрес [222]. Активното спортуване е част от мерките за контрол на теглото, но капацитетът за физическа активност е намален при пациентите със затлъстяване, както и тяхното желание да се занимават със спорт [216].

Бариатричната хирургия е най-ефективното лечение за болестно затлъстяване. Лечението обръща хода на заболявания, свързани със затлъстяването, като диабет тип 2, хипертония, дислипидемии и синдром на овариална поликистоза. Доказано е, че бариатричната хирургия засяга биологични механизми като възпаление и оксидативен стрес в мастната тъкан [181, 215].

Съзнателната редуция на тегло, чрез диета, физическа активност или бариатрична хирургия, намалява оксидативния стрес при пациенти със затлъстяване, и повишена активност на антиоксидантните ензими и способността за възстановяване на ДНК.

## **1.6. Роля на витамин D при отслабване и върху показатели на метаболитния синдром**

### **1.6.1. Роля на витамин D при отслабване и ефекти върху оксидативен стрес**

Витамин D е мастноразтворим витамин. Малко храни естествено съдържат витамин D (мазни риби, като сардини, херинга, риба тон, скумрия, съомга и масло от черен дроб на треска, яйчни жълтъци, гъби шийтаке, черен дроб). Тежкият дефицит на витамин D може да причини рахит при кърмачета или деца и остеомаляция при възрастни, въпреки че в днешно време това са необичайни заболявания в повечето развити страни. Субклиничният дефицит на витамин D е по-разпространен и може да бъде свързан с остеопороза и по-висока честота на фрактури [222, 223, 224]. Освен в скелетната минерализация, понастоящем е известно, че витамин D участва в проапоптотични, антиангиогенни, антипролиферативни, пролиферативни, антиинвазивни и антиметастатични биологични процеси. Освен това има и нови доказателства, че витамин D може да има антиоксидантни и противовъзпалителни функции [60].

Както витамин D<sub>2</sub>, така и витамин D<sub>3</sub>, получени от дермален синтез и чрез храната, могат да се транспортират чрез протеин, свързващ витамин D (VDBP) с кръвта или да се съхраняват в адипоцити и след това да навлизат в кръвообращението. Следващата стъпка на метаболизма на витамин D включва две последователни реакции на ензимно хидроксилиране, водещи до активиране на витамин D. Първата стъпка е образуването на 25 (ОН) D в черния дроб от витамин D-25-хидроксилаза, цитохром P450. 1,25 (ОН)-D (калцитриол, биоактивният метаболит на витамин D) се образува в резултат на 25 (ОН) D хидроксилиране, извършено от 25 (ОН) D-1 $\alpha$ -хидроксилаза (CYP27B1) [226, 182, 227].

Индикатор за нивото на витамин D е концентрацията на циркулиращия му метаболит, а именно 25 (ОН) D, чийто полуживот е 10–19 дни. Нивото от 25 (ОН) D отразява нивото на витамин D, което идва от синтеза в кожата и хранителния прием. Няколко институции, включително Американското общество по ендокринология, са разработили насоки относно нивата на витамин D, които определят състоянието на дефицит, недостатъчност и нормално ниво на витамин D [227].

Обсервационни проучвания демонстрират връзката между дефицита на витамин D и риска от хипертония или сърдечно-съдови инциденти, по-висока честота на ракови заболявания, изразен болков синдром или мигрена и невропсихиатрични разстройства като шизофрения, деменция или депресия [225].

Дефицит на витамин D се среща по-често при вегетарианци и хора с хранителни разстройства, поради небалансираната диета. Хроничните заболявания, включващи чревна малабсорбция или чернодробна и бъбречна недостатъчност, също могат да намалят производството на витамин D [225]. Витамин D има противовъзпалителни, антиоксидантни и невропротективни свойства в допълнение към класическата си функция в калциево-фосфорната хомеостаза. Наскоро Витамин D е признат за невроактивен и неговият рецептор - витамин D-рецептор (VDR) е широко разпространен в централната нервна система [228].

Лечението с витамин D обаче може да крие и рискове. [229] Характеристиките на токсичността на витамин D се медиатират чрез хиперкалциемия и симптомите варират от леки, като жажда и полиурия, до тежки, включително припадъци, кома и смърт.

Правилното дозиране на витамин D е трудно, особено при суплементиране с нелицензирани хранителни добавки. Предозирането с добавки без рецепта крие рискове и режимите на суплементиране трябва да следват строго дозиране и затова е важно повишаването на осведомеността сред лекарите и пациентите за потенциалните рискове от токсичност на витамин D.

Скорошни обсервационни проучвания насочват към връзка между възпалението и дефицита на витамин D; следователно, предполагайки, че витамин D може да играе роля в патогенезата на болестите [223].

Затлъстяването е основен глобален здравен проблем и се свързва с дефицит на витамин D. Умишлената загуба на тегло може да промени състоянието на витамин D и обратно, добавките с витамин D се предполага, че помагат при редукция на тегло. Дефицит на витамин D и последващ хиперпаратиреоидизъм са открити постоперативно и има доказателства, че добавянето на витамин D намалява риска от постоперативни усложнения [230].

Недостигът на витамин D е свързан с ефектите на оксидативен стрес и възпалението и по този начин с намалена протекция при състояния, като диабет и чернодробна исхемия. Суплементирането с витамин D може да предотврати нивата на

чернодробен оксидативен стрес и да подобри възпалението чрез намаляване на липидната пероксидация и производството на цитокини [223].

Обсервационни проучвания разкриват сезонни вариации в гликемичния контрол при пациенти с диабет, с влошаване през студените сезони, което предполага роля на дефицита на витамин D за развитието на диабет. Проучвания *in vitro* демонстрират свойствата за витамин D като мембранен антиоксидант. Установява се и способността на витамин D да регулира някои ендогенни антиоксидантни ефектори, като супероксид-дисмутаза и глутатион. Данните, получени от две скорошни клинични проучвания върху пациенти с диабет тип 2, показват подобрене на антиоксидантната защита след 12 седмици прием на витамин D [224].

Докато всички проучвания за ефекта от индуцирана от диетата редукция на телго върху нивата на витамин D отчитат относително покачване при 5-10% редукция, то добавянето на витамин D само по себе си не води до повишена загуба на телго, но може да повлияе на загубата на телесни мазнини [230]. Чрез намаляване на хомоцистеина и нивата на оксидативен стрес и подобряване на ендотелната дисфункция, суплементирнето с витамин D3 може да намали риска от сърдечно-съдови заболявания, свързани със захарен диабет тип 2 [226].

### **1.6.2. Влияние на витамин D върху показатели на метаболитния синдром**

Освен участие в регулацията на калциево-фосфорната хомеостаза в организма, витамин D притежава и много роли в клетъчната диференциация, инхибиране на клетъчния растеж и имуномодулацията. Адекватното ниво на витамин D намалява оксидативния стрес, подобрява митохондриалните и ендокринните функции като по този начин редуцира риска от някои нарушения в организма като автоимунитет, метаболитни заболявания, нарушения в поправката на ДНК [230]. Наскоро е установено, че витамин D участва в регулацията на ДНК метилирането, а също и в други епигенетични механизми, което представлява допълнителен начин за модулиране на генната експресия. От друга страна, дефицитът на витамин D води до промяна в инсулиновите синтез и секреция при животински модели и при хора. Той може да предразположи към нарушение в глюкозния толеранс, нарушена инсулинова секреция и ЗД тип 2. Възстановяването на нивото на витамин D подобрява гликемията и инсулиновата

секреция при пациенти със 3Д тип 2 с установена хиповитаминоза D, като това предполага ролята му в патогенезата на заболяването.

Дефицитът на витамин D е глобален здравен проблем. През 2008 г. е установено, че 1 милиард души страдат от витамин D дефицит ( $25\text{OH}D < 20 \text{ ng/ml}$ ) [231]. Широкото разпространение на хиповитаминоза D в световен мащаб от своя страна е свързано със значими клинични проблеми. Витамин D има отношение към сърдечно-съдовата система, автоимунните и раковите заболявания, захарния диабет [232-235]. Надежден индикатор за нивото на витамин D в организма е  $25\text{OH}D$  [236]. Серумно ниво на  $25(\text{OH})D < 50 \text{ nmol/l}$  показва дефицит на витамин D в широк смисъл. Дефицит на витамин D се приема при праг  $< 25 \text{ nmol/l}$ , недостатъчност - при серумно ниво в границите  $25 - 49,99 \text{ nmol/l}$ , а достатъчност - над  $50 \text{ nmol/l}$  [237]. В България през 2012 г. е проведено мултицентрово проучване, целящо да установи честотата на дефицит на витамин D. Резултатите сочат 21,3% дефицит, 54,5% недостатъчност и едва 24,2% достатъчност на витамин D. 75,8% имат ниво под оптималната стойност от  $50 \text{ nmol/l}$ , което означава, че повечето хора в страната имат недостатъчност или дефицит на витамин D [238].

Витамин D<sub>2</sub> е ергокалциферол, който се извлича от растителни продукти. Витамин D<sub>3</sub> е секостероид, който основно се синтезира в кожата от 7-дехидрохолестерол под влияние на слънчевите лъчи - UVB -  $290 - 310 \text{ nm}$  [239]. Само малко количество (30%) се набавя с храната, тъй като не много храни го съдържат естествено. Витамин D<sub>3</sub> трябва да се хидроксилира двукратно, за да стане биологично активен - в черния дроб и в бъбрека. 25-хидроксилазата в черния дроб го превръща в  $25\text{OH}D$  [240]. След това той се свързва с витамин D свързващ протеин и така се транспортира в кръвообращението. В проксималните бъбречни тубули настъпва втора хидроксилация под влиянието на 1 $\alpha$ -хидроксилаза и така  $25\text{OH}D$  се превръща в  $1,25$  дихидроксивитамин D<sub>3</sub> -  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , който е активната форма на витамина. Витамин D действа върху таргетните си органи чрез своя рецептор - VDR, който е нуклеарен транскрипционен фактор [241].

Витамин D е в състояние да взаимодейства с епигенома на различни нива. Важни гени в системата за сигнализация на витамин D като тези, които кодират рецептора за витамин D и ензимите 25-хидроксилаза (CYP2R1), 1 $\alpha$ -хидроксилаза (CYP27B1) и 24-хидроксилаза (CYP24A1), имат големи CpG острови в своите промоторни региони, които могат да бъдат потиснати чрез метилиране на ДНК. От друга страна, VDR взаимодейства

с коактиваторни и корепресорни протеини, които от своя страна са в контакт с хроматинови модификатори, като хистонови ацетилтрансферази (HATs), хистон-деацетилази (HDACs), хистонови метилтрансферази (HMTs) и с ремоделатори на хроматина. Съществуват също доказателства, че някои VDR лиганди имат ДНК деметилиращи ефекти [242]. Ефектът на лиганд-свързания VDR зависи от епигенетичния фон на таргетния ген. VDR се свързва основно с локуси с достъпен хроматин. След прилагане на неговия лиганд витамин D достъпността до хроматина в тези локуси се увеличава с над 30% [243]. Механизмът на действие на свързания с лиганд VDR зависи от активността на HATs и HMTs. Провеждането на лечение върху клетъчни линии с витамин D и инхибитори на DNMT или хистонови деацетилази има синергичен ефект [244]. Има доказателства, че витамин D може да индуцира ДНК деметилиране, но механизмите не са ясни. В повечето случаи вероятно се касае за пасивно деметилиране, което протича в рамките на няколко цикъла на ДНК репликацията [242]. В някои случаи обаче деметилирането протича за 1-4ч, което е индикатор за активен процес [245]. Установено е, че системата на витамин D има плеiotропни функции и регулира около 3% от човешкия геном [246].

Известно е, че витамин D повлиява панкреасната бета--клетъчна функция по различни начини. Активирането му настъпва в Р-клетките от вътреклетъчната 1 $\alpha$ -хидроксилаза. Антиапоптотичното му действие се медира чрез down-регулация на Fas-свързани метаболитни пътища (Fas/Fas-L) [247].

Витамин D повлиява основно инсулиновия отговор към глюкозна стимулация, но не и базалната инсулинемия [248]. Неговият директен ефект може би се осъществява от свързването на циркулиращата му активна форма 1,25(OH) $_2$ D към VDR върху Р-клетката. Витамин D води до увеличаване на инсулиновата секреция чрез модулиране на гени, кодиращи някои проинфламаторни цитокини, които участват в развитието на инсулинова резистентност [249]. От друга страна, секрецията на инсулин от р-клетките на панкреаса е калций-зависим процес и се повлиява от навлизането на калций през клетъчната мембрана [247]. Витамин D регулира калбиндин - цитозолен калций-свързващ протеин, който се намира и в р-клетките. Той играе ролята на модулатор на стимулираното от деполяризацията освобождаване на инсулин чрез регулиране на вътреклетъчния калций. По този начин витамин D може индиректно да повлияе инсулиновата секреция допълнително чрез регулиране на калбиндин [247]. Наблюдавано

е, че неадекватният прием на калций или недостатъчността на витамин D могат да променят баланса между извън- и вътреклетъчните му нива в Р-клетките, което да повлияе нормалното освобождаване на инсулин особено в отговор на глюкозно натоварване. Индиректният ефект на витамин D се осъществява чрез регулиране на калциевото навлизане през клетъчната мембрана и вътреклетъчния калций чрез бързи отговори. Промени във вътреклетъчния калций в чувствителните на инсулин тъкани може да доведе до периферна инсулинова резистентност чрез нарушаване в пътищата на инсулиновата сигнализация, което да доведе до намалена активност на глюкозните транспортери. В норма витамин D намалява експресията на калциевите канали, а при дефицит се повишава броят им [250]. Витамин D увеличава инсулиновата чувствителност като стимулира експресията на инсулинови рецептори и/или чрез активиране на PPAR- $\gamma$ [251, 252]. Дефицит на витамин D ще доведе до намаляване на инсулиновите рецептори и развитие на инсулинова резистентност [253]. Витамин D увеличава преживяемостта на  $\beta$ -клетките чрез инактивиране на NF- $\kappa$ B, който от своя страна също има участие в развитието и задълбочаването на инсулиновата резистентност [254]. Той също така може индиректно да повлияе инсулиновата чувствителност чрез РААС. Ангиотензин II инхибира инсулиновото действие в съдовете и в скелетните мускули което води до нарушено усвояване на глюкоза. Витамин D потиска образуването на ренин и локалната панкреасна РААС. По този начин той се явява негативен ендокринен регулатор на РААС [254].

Биоактивната форма на витамин D е в състояние да индуцира секреция на инсулин чрез директно свързване на VDR-RXR комплекс с VDRE (витамин D респондентни елементи), идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните ( $\beta$ -клетки [255]. 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  $\beta$ -клетките на панкреаса [256]. Установено е, че мишки с мутация на VDR имат нарушена инсулинова секреция в сравнение със здрави [248]. Суплементацията с витамин D увеличава нивата на инсулина чрез регулиране на променната експресия на рецепторите IP3 и АМРА 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-медираната инсулинова секреция [257]. Bornstedt et al. доказват, че метаболити на витамин D повлияват панкреасните Р-клетки и глюкозо-стимулираната инсулинова секреция чрез промяна в експресията на гени, които участват във функционирането и жизнеспособността на р- клетките [258]. От друга страна е доказано, че витамин D регулира експресията на гена за инсулиновия рецептор [259]. Като цяло данните сочат, че суплементацията с витамин D предизвиква редукция на тегло при дефицит.

## **1.7. Роля на кетодиетата за отслабване и оксидативен стрес**

Проучвания [260] сочат, че КД, богата на полиненаситени мастни киселини е ефективна за намаляване на теглото и редуциране на рисковите фактори, свързани със затлъстяването. КД е въведена първоначално през 1920 г. При КД съотношението мазнини / въглехидрати е 5:1. Лека кетоза е естествен феномен по време на гладуване и кърмене.

### **1.7.1. Хранителна кетоза**

Хранителната кетоза може да се определи като съзнателно намаляване на вноса на въглехидрати за ускоряване на производството на кетони и индуциране на метаболитен ефект, който стабилизира кръвната глюкоза, свежда до минимум отделянето на инсулин и по този начин намалява анаболните и туморогенни ефекти на продължителната инсулинова резистентност. КД се състои от 5-10% въглехидрати (под 20-50г/д), адекватен протеин (1-1.5г/кг/д) и мазнини до насищане. Оптималните нива на кетони в кръвта са от 0,5 до 3 мг/дл. Това състояние е много различно от патологичната диабетната кетоацидоза, при която нивата на кетоните в кръвта са 5-10 пъти по-високи от посочените.

Много ниско калоричните диети (<800 ккал/д) и кетогенната диета се използват като част от интегриран подход, включващ медицински мониторинг и програма за промяна на начина на живот, за подобряване на редица клинични състояния [261]. Намаляване на въглехидратите за предизвикване на хранителна кетоза може да доведе до значително подобрене в кръвния липиден профил, дори при повишен прием на

наситени мастни киселини. Това подобрение включва намаляване на нивата на триглицеридите, намаляване на общия холестерол, повишаване на HDL и изместване на LDL.

За КД е важна пропорцията на основни хранителни групи, адекватен прием на минерали и подходящ избор на мазнини. Консумацията на евентуални малки количества въглехидрати или излишък от протеини, може бързо да потисне кетозата. Нежеланите ефекти от КД се наблюдават най-често при екстремно гладуване, изключващо зеленчуци. Освен, че внасят разнообразие, зеленчуците са източник на ценни вещества, пребиотици и фибри [262]. Понякога придържането към КД може да се окаже трудно, затова може да са необходими допълнителни терапии за намаляване на нивата на глюкоза в кръвта.

### **1.7.2. Кетогенна диета – биохимични процеси**

КД е въведена първоначално през 1920 г. и се прилага широко в лечението на епилепсия и други невродегенеративни заболявания. При следване на КД се увеличават кръвните нива на свободни мастни киселини под въздействие на ензима липаза. Те се транспортират до митохондриите, където се разграждат до кетонни тела чрез бета оксигенация. Така организмът преминава в състояние на кетоза, което променя метаболизма [210].

Хормоналната активация на липолизата и кетогенезата се медира от епинефрин и глюкагон и се потиска от инсулин. При нисък внос на въглехидрати, нивото на инсулин е ниско и глюкагонът се покачва. Освен стимулиране на гликогенолизата в черния дроб, глюкагонът стимулира липолизата и освобождаване на мастни киселини от мастните депа. Чрез този процес в черния дроб се генерира енергия, извлечена от мазнини, и след това се доставя до цялото тяло - мозъка, бъбречната кора, сърцето, скелетните мускули. Кетоните могат да доставят до 60% от АТФ, необходим на организма, останалата част се извлича чрез ендогенна гликонеогенеза, която използва триглицериди и глюкогенни аминокиселини от протеини за продукцията на глюкоза.

Кетонните тела включват бета-хидроксibuтират, ацетоацетат и ацетон. Те са малки, водноразтворими молекули, преминават кръвно-мозъчната бариера и изместват глюкозата като основен източник на енергия за мозъка. Бета-хидроксibuтират е най-разпространен и се използва за мониториране на степента на кетоза по време на КД. Дъхът на пациента може да мирише на ацетон.

Проведени са множество проучвания за проследяване на механизмите на невропротекция при КД, но много по-малко се знае за системните ефекти на кетонните тела, циркулиращи в кръвния ток. Гликогенът се изчерпва и нивата на кетоните се покачват при гладуване, нисък въглехидратен прием, интензивна физическа активност или при пълна липса на инсулинова секреция при нелекуван диабет тип 1.

Нежеланите ефекти на КД върху сърдечно-съдовата система не са добре документирани и са все още противоречиви. Например, в някои проучвания на пациенти, след КД за лечение на епилепсия, са наблюдавани повишени серумни нива на холестерол, триглицериди и LDL, докладвани са също промени в съдовите структура и функция. От друга страна, КД при неепилептични пациенти, най-често се асоциира с подобряване на някои сърдечно-съдови рискови фактори, въпреки, че ефектът от продължително приложение на КД върху липидния профил все още не е напълно оценен. Данните в литературата са противоречиви относно производството на ROS при КД. [219] сочи, че КД първоначално индуцира умерен оксидативен стрес, който активира транскрипцията на Nrf2, който от своя страна активира транскрипцията на таргетни гени, вкл HO-1. Впоследствие метаболитният отговор, причинен от експозицията на кетонни тела, прави клетките по-устойчиви на вторични атаки и води до намаляване на ДНК окислителното увреждане.

### **1.7.3. Кетогенна диета – наблюдавани ефекти**

Поради добрите резултати при лечение на епилепсия, напоследък се изследва възможността за прилагане на КД при лечението на други неврологични заболявания. Раковите клетки са по-малко устойчиви към усвояването на кетонни тела като алтернативни източници на енергия.

Проучвания показват, че КД може да повлиява оксидативния стрес, въздействайки на митохондриалното количество и/или качество и вероятно да спомага за удължаване на живота [263]. КД предизвиква начално покачване на продукцията на ROS, които могат да играят роля на редокс-сигнализация, активирайки детоксикационните механизми на клетката. Три седмици след началото на диетата се наблюдава обратният ефект [264].

Всички клетки в човешкото тяло се нуждаят от АТФ като основен източник на енергия за осъществяване на жизнените функции. АТФ се произвежда основно в

митохондриите, нарушенията в тяхната функция са свързани множество социално значими хронични и дегеративни заболявания, включващи затлъстяване, сърдечно-съдови заболявания, рак, диабет, невродегенеративни заболявания. Митохондриалните ROS като цяло се приемат за вредни и това е така в големи концентрации, но в ниски дози те стимулират важни биологични процеси като пролиферация, диференциация и имунен отговор. Адаптация, която повишава устойчивостта към оксидативен стрес – митохормеза [262] КД намалява производството на реактивни кислородни радикали (ROS) чрез повишаване на експресията и активността на митохондриалните протеини [261].

Наблюдаван е повишен капацитет за упражнения за издръжливост без съществено мускулно увреждане при мишки [170], въпреки намаляването на абсолютния мускулен обем. Въпреки сравнително по-високия калориен прием, при мишките на КД е наблюдавана връзка редуция на тегло. Този ефект в дългосрочен план все още не е категоричен, тъй като няколко проучвания отчитат разочароващи резултати.

Наблюдавано е покачване на концентрациите на апоВ съдържащи липопротеини. Пациенти без диабет или метаболитен синдром трябва внимателно да помислят преди КД [265].

## **1.8. Оксидативен стрес: ролята на физическите упражнения и антиоксидантните хранителни добавки**

Физическата активност се определя като всяко телесно движение, произведено от скелетните мускули, което води до изразходване на енергия, което може да е неструктурирано, може да бъде ежедневна дейност, упражнение, което включва предварително организирана, умишлена и повтаряща се дейност, масови и състезателни спортове и редовна физическа активност с умерена интензивност като ходене, колоездене или спорт, който носи значителни ползи за здравето [266]. Терминът „физическа активност“ не трябва да се бърка с термина „упражнение“, което е подкатегория на физическата активност и се характеризира с това, че е планирана, структурирана, постоянна и е насочена към подобряване или поддържане на един или повече аспекти на физическата годност. Както умерената, така и интензивната физическа активност носят ползи за здравето. Физическите усилия и умения могат да бъдат

включени в общия термин на „спорт“, човешка дейност, способна да постигне резултат, изискващ физическо усилие и/или физически умения, която по своето естество и организация може да бъде състезателна и е общоприета като спорт.

Клетките са развили стратегии за използване на реактивни видове като биологични стимули. Те действат като субклетъчни пратеници във важни молекулярни сигнални процеси и модулират ензимната и генна активация. ROS участват в имунния отговор на клетките и детоксикацията на лекарствата, те са необходимост за вазодилатация, оптимална мускулна контракция и започване на апоптоза [267]. Освен това, натрупването на доказателства предполага, че ROS се генерират по време на тренировка и модулират нивото на мускулна контракция. Скъпното добавяне на ROS води до увеличаване на силата. Въпреки това, съответното повишаване на производството на ROS, което се случва по време на усилените упражнения, допринася за развитието на остра мускулна умора [268].

Физическата активност подобрява антиоксидантната защита и понижава нивата на липидна пероксидация при възрастни индивиди [269]. Физически активните индивиди в напреднала възраст показват антиоксидантна активност и нива на липидна пероксидация, подобни на младите заседнали субекти, което подчертава значението на редовната физическа активност за забавяне на процеса на увреждане, свързан със стареенето.

Доказано е, че умерените упражнения и активният начин на живот са полезни не само за превенцията на оксидативен стрес, но и за първична и вторична защита от сърдечно-съдови заболявания, диабет тип II, метаболитен синдром и невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер [270]. Благоприятните ефекти от упражненията се отразяват и в освобождаването на миокини. Тези молекули упражняват авто-, пара- и/или ендокринни ефекти и включват цитокини, интерлевкини като IL-6 и други пептиди, които се произвеждат, експресират и освобождават от мускулните влакна и имат роля в защитата срещу заболявания, свързани с ниска степен на възпаление като атеросклероза [271, 272].

Степента, до която реактивните видове са полезни или вредни, зависи от продължителността на упражнението, интензивността, фитнес състоянието и хранителния статус на индивида [273].

Антиоксидантните защитни средства на тялото се състоят от антиоксидантни ензими (супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза и др.) и неензимни антиоксиданти (коензим Q10, глутатион, пикочна киселина, липоева киселина, билирубин и др.). Индуцираното от упражнения генериране на ROS води до повишена активност на ензимни антиоксиданти, които след това водят до повишена устойчивост на оксидативни предизвикателства, включително голямо разнообразие от заболявания, свързани с оксидативен стрес, включително сърдечно-съдови заболявания, придобити невродегенеративни разстройства (болестта на Алцхаймер и Паркинсон), астма, диабет и митохондриални миопатии. CoQ10, известен също като убихинон, е мастноразтворима молекула, присъстваща в повечето еукариотни клетки, предимно в митохондриите. Той е компонент на веригата за пренос на електрони и играе роля в производството на клетъчна енергия. Неговата редуцирана форма, убиквинол, действа като важен антиоксидант в тялото. CoQ10 се синтезира ендегенно и усвояването му с храната е ограничено [274].

Прекомерното физическо натоварване е вредно за нетренирани индивиди, но прогресивното обучение позволява на клетките по-лесно да детоксикират по-голямо количество ROS. Прекомерната физическа активност може да бъде вредна, когато предизвиква променена хормонална активност, промени в ритъма сън-събуждане, на апетита, промени в артериалното налягане и сърдечната честота. Наистина, тези, които са претренирани, често установяват учестяване на сърдечния си ритъм дори в покой, мъчат се да заспят, нервни са и/или депресирани, могат да бъдат хипотензивни и имат по-малко ефективна имунна система.

Субекти, участващи в редовни упражнения, поради адаптивен отговор, демонстрират по-високи нива на митохондриално съдържание и натрупват по-ниски нива на ROS при дадения интензитет, отколкото тези, които не са тренирани, обосновката е, че както по-младите, така и по-възрастните население може да се възползва от постоянна физическа активност, за да благоприятства по-бързото възстановяване на окислението, генерирано от напрегнати тренировки, често наричани максимален аеробен тест, и по този начин да защити тялото от оксидативно увреждане.

Освен ендегенните ензимни и неензимни антиоксидантни защити, които човешкото тяло развива, за да се справи с излишъка от свободни радикали, произведени при оксидативен стрес, и освен защитните механизми за изчистване или детоксикация

на ROS, блокиране на производството на ROS или изолиране на преходни метали, тялото експлоатира също и други антиоксиданти, които обикновено се доставят с диетата и представляват екзогенни антиоксиданти.

Хранителните антиоксиданти действат в различни механизми и отделения, но са главно ловци на свободни радикали: 1) неутрализират свободните радикали, 2) възстановяват окислените мембрани, 3) намаляват производството на реактивни кислородни видове, 4) чрез липидния метаболизъм, късверижни свободни мазнини киселини и холестерил естери неутрализират реактивните кислородни видове [275].

Екзогенните антиоксиданти са генерирани нарастващ интерес към предотвратяването или намаляването на оксидативния стрес, към намаляването на мускулната болка и физическия стрес и към подобряването на спортните постижения [276]. Екзогенните антиоксиданти действат в допълнение към ендогенните, като най-известните са токофероли (витамин Е), аскорбинова киселина (витамин С), каротеноиди ( $\beta$ -каротин), убихинон и полифеноли [277, 278].

Витамин Е се отнася към група мастноразтворими съединения, които включват токофероли и токотриеноли.  $\alpha$ -Токоферолът е най-биологично активната форма, доказано е, че защитава клетките от липидна пероксидация [279] и е доказано, че играе роля в превенцията на хронични заболявания, свързани с оксидативен стрес.

Витамин С или L-аскорбинова киселина е кофактор в редица основни метаболитни реакции при хората (напр. синтез на колаген). Този водоразтворим витамин се произвежда ендогенно от почти всички организми, някои видове птици и няколко бозайници, с изключение на хората. L-аскорбатът, йонна форма на аскорбиновата киселина, е силен редуциращ агент и неговата окислена форма се редуцира обратно от ензими и глутатион [280].  $\beta$ -каротинът принадлежи към група червени, оранжеви и жълти пигменти, наречени каротеноиди [281]. Други включват  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -криптоксантин, ликопен, лутеин и зеаксантин. Тези мастноразтворими вещества се намират в растенията и играят роля във фотосинтезата.  $\beta$ -каротинът е най-активният каротеноид. След консумация се превръща в ретинол, лесно използвана форма на витамин А.  $\beta$ -каротинът притежава антиоксидантни свойства, антиканцерогенни ефекти и има положителен ефект върху имунната система. CoQ10 се синтезира ендогенно, но може да се приема и като екзогенен антиоксидант [282, 283] и се понася добре в широк диапазон на дозиране, с минимални странични ефекти [284]. Някои автори съобщават,

че CoQ10 може да има благоприятен ефект при лечението на нарушения на оксидативното фосфорилиране [285] и може да намали оксидативния стрес при пациенти с глаукома [286].

Сред антиоксидантите е доказано, че флавоноидите, полифенолен клас пигменти, осигуряват много ползи за здравето и влияят върху изпълнението на упражненията за спортисти и за субекти, които не са непременно в постоянна тренировка, като например като възрастни хора [287]. Флавоноидите включват флавоноли (кверцетин), флаволи (лутеолин), флаванони (нарингенин), антоцианидини (цианидин) и изофлаволи (генистеин). Другите класове нефлавоноидни съединения включват фенолни киселини с ниско молекулно тегло, стилбени, халкони, лигнани и кумарини [288].

*Ресвератролът* е полифенол, химически характеризирани като 3,5,4'-трихидроксистилбен, който се среща в семената и люспите на грозде, червено вино, черници, боровинки, червени боровинки, фъстъци и по-специално в корените на култивирания плетиво (*Polygonum cuspidatum*) [289]. Червеното вино и плетивът са най-разпространеният естествен източник на ресвератрол. Много *in vivo* и *in vitro* проучвания съобщават за различни важни свойства на това естествено съединение. Ресвератролът е нетоксичен, лесно се усвоява и се понася добре от хората. Метаболизмът на ресвератрол е висок, което води до производството на конюгирани сулфати и глюкурониди, които запазват известна биологична активност и се натрупват в чревните клетки и в черния дроб [290, 291].

Ресвератролът показва антиоксидантна активност в плазмени и серумни проби от пациенти и животински модели, засегнати от белодробна/сърдечна тъкан на белодробна хипертония (PH) [292, 293]. Също така се съобщава, че NADPH оксидазата, ензим, отговорен за производството на ROS във васкулатурата, се потиска от този полифенол [294].

Подобно на други полифеноли, освен антиоксидантното свойство, е известно, че ресвератролът има невропротективни, цитопротективни, антитромботични, ДНК защитни, противовъзпалителни и противоракови ефекти [295-298]. Интересното е, че ресвератролът има също анти-стареене, дълголетие и препрограмиране на клетките, документирани главно в миши модели [296].

*Куркуминът*, известен също химически като диферулоилметан, е ярко жълт полифенол, открит в коренището на *Curcuma longa* (куркума) и обикновено се използва

в Близкия изток и азиатските страни [299]. Доказано е, че този полифенол е насочен към множество сигнални молекули. Сред тях, фосфоорилаза киназа (PhK), участваща в насърчаването на фотокарциногенезата чрез активиране на NF-κB-зависими сигнални пътища [300] и IFN-γ сигнализиране [301].

Липозомното капсулиране се счита за един от най-ефективните лекарствени носители, поради способността му да разтваря хидрофобни съединения и фармакокинетичните свойства [302]. Повечето от куркумин се метаболизира в черния дроб и червата, но малко количество остава откриваемо в други органи [303].

Куркуминът е естествено съединение, което упражнява антиоксидантни ефекти [304, 305]. Поради особената си химическа структура, куркуминът наистина е чистач на реактивни кислородни и азотни видове [306]. В допълнение, куркуминът е липофилно съединение, което го прави ефективен колектор на пероксилни радикали. Куркуминът може да модулира активността на ензимите GSH, каталаза и SOD, активни в неутрализирането на свободните радикали и може да инхибира ROS-генериращи ензими като липоксигеназа/циклооксигеназа и ксантин хидрогеназа/оксидаза [299].

Доказано е също, че куркуминът може да бъде от полза при възпалителни състояния, като блокира активирането на NF-κB, медира противораковите ефекти чрез модулиране на множество клетъчни сигнални пътища, като пътя PI3K/Akt/mTOR, и има невропротективни ефекти, като предотвратява агрегацията на сенилни плаки (β-амилоид, A $\beta$ ) *in vitro* и в клетъчни култури [288, 304, 307].

Освен ендогенните антиоксидантни системи, няколко естествени съединения, които обикновено се доставят с диетата, могат да действат като екзогенни антиоксиданти и се рекламират като важни ергогенни фактори при физически упражнения, както в млада възраст, така и в напреднала възраст.

## 1.9. Заключение

Изследването на влиянието на оксидативния стрес върху биологичните процеси е застъпено в научната литература. Все още не са достатъчно изяснени механизмите, чрез които оксидативният стрес въздейства върху метаболизма и здравното състояние на пациентите със затлъстяване. Съществуват противоречиви и непълни данни относно ефектите на диетичните режими, физическата активност и приема на хранителни

добавки. Пандемията COVID-19 промени значително начина на живот на пациентите, достъпа до здравна информация, лекарствени средства и добавки.

Необходими са по-нататъчни задълбочени проучвания механизмите на въздействие върху оксидативния стрес, както и дългосрочното влияние на различни фактори.

## ГЛАВА ВТОРА

### НАУЧНА ХИПОТЕЗА, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

#### 2.1. Цел на проучването

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.

#### 2.2. Задачи на проучването

1. Оценка на маркерите на оксидативен стрес при опитни животни, подложени на нисковъглеводна 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 D 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”*: Оценка 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 стандартна 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.

### **2.3. Научна хипотеза**

Нашата хипотеза е, че нивата на оксидативен стрес се влияят от прилагането на различни двигателни и хранителни режими. Очакваме да установим връзка между нивата на витамин D и тези на антиоксидантните маркери. Очакваме 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

## ГЛАВА ТРЕТА

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### **3.1. Материали и методи, използвани при експерименти с животни**

##### **3.1.1. 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 транскрипция до кДНК (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen).

**Таблица 1. Макронутриенти и калориен състав на използваните диети**

	Nutricia KetoCAL 4:1	Стандартна храна за гризачи
<b>Нутриенти</b>	<b>Per 100 g</b>	<b>Per 100 g</b>
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<sup>2</sup> 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 µl с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условието 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 сек. Нивата на експресия на Ins 1 бяха нормализирани към GAPDH, използвайки  $\Delta\Delta Ct$  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.

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

80 броя опитни животни (мъжки ICR мишки) бяха разделени 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 циркуферентна обиколка на корема на опитните животни. Животните бяха отглеждани при стандартни 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 стандарти 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 активност и от нивото на витамин D.

## **3.2. Материали и методи, използвани при проучвания при хора**

### **3.2.1. 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. Изоляцията 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 [313, 314].

Голямото разпространение на интернет дава на потребителите достъп до огромни информационни ресурси и приложения, където се рекламират различни лекарствени продукти или добавки [314, 315]. 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 [313]. 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 анкетиращи:**

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

- Да, постигнах резултат
- Имаше ефект, но получих нежелана реакция
- Нямахме 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](http://www.dama.bg), [www.skafeto.com](http://www.skafeto.com), [www.dama.bg](http://www.dama.bg), [www.kliuki.bg](http://www.kliuki.bg); [www.receptitenababa.com](http://www.receptitenababa.com); [www.vijti.com](http://www.vijti.com); [www.vsyakajena.com](http://www.vsyakajena.com); [www.zajenata.bg](http://www.zajenata.bg)

2. News Websites – [www.actualno.com](http://www.actualno.com), [www.btvnovinite.bg](http://www.btvnovinite.bg); [www.dnes.bg](http://www.dnes.bg); [www.faktor.bg](http://www.faktor.bg); [www.investor.bg](http://www.investor.bg); [www.marica.bg](http://www.marica.bg); [www.money.bg](http://www.money.bg); [www.news.bg](http://www.news.bg); [www.offnews.bg](http://www.offnews.bg); [www.petel.bg](http://www.petel.bg); [www.plovdiv24.bg](http://www.plovdiv24.bg); [www.pogled.info](http://www.pogled.info); [www.standartnews.com](http://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

### **3.2.2. 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* пациент, 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-ОН) (електрохемилюминисцентен 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 T-тест или непараметричен Mann-Withey U-тест. Данните са анализирани със софтуер SigmaPlot 11.0.

**Финансиране:** Изследователят самофинансира научното изследване.

## ГЛАВА ЧЕТВЪРТА

### РЕЗУЛТАТИ

#### 4.1. Резултати от проведените експерименти с опитни животни

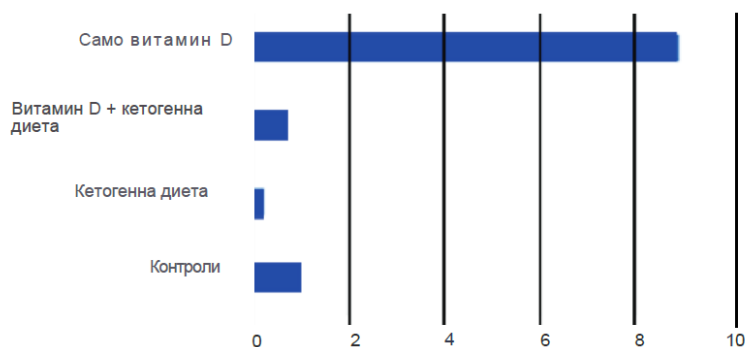
##### 4.1.1. Резултати от изследване на промените в експресията на инсулиновия ген след кетогенна диета и суплементация с витамин D

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**

##### 4.1.2. 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.

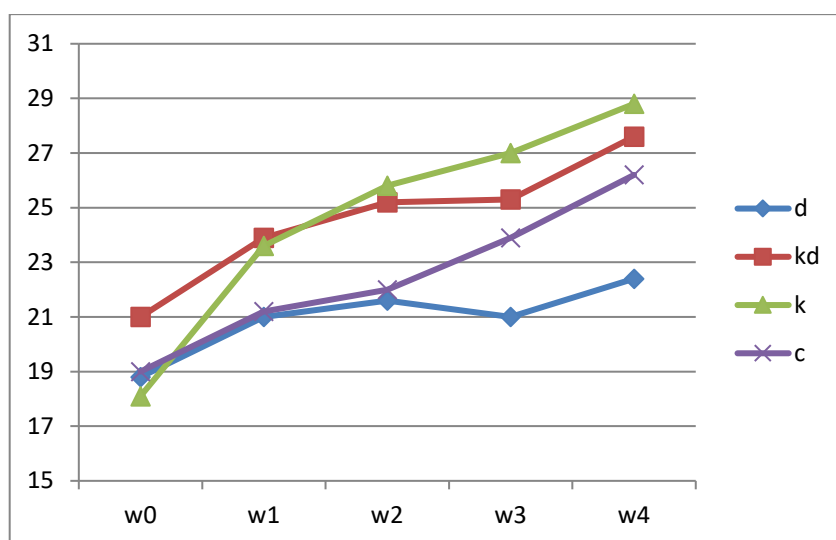
Динамиката на средното тегло е показана в таблица 2.

**Таблица 2. Промени в теглото при различните групи изследвани опитни животни.**

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  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 (%)
<b>Витамин D</b>	18,8 $\pm$ 3,2	21,0 $\pm$ 4,2	21,6 $\pm$ 4,4	21,0 $\pm$ 4,1	22,4 $\pm$ 4,3	19%
<b>Витамин D + Кетодиета</b>	21,0 $\pm$ 3,5	23,9 $\pm$ 3,6	25,2 $\pm$ 3,6	25,3 $\pm$ 4,4	27,6 $\pm$ 3,00	31%
<b>Кетодиета</b>	18,1 $\pm$ 4,2	23,6 $\pm$ 3,4	25,8 $\pm$ 4,0	27,0 $\pm$ 2,9	28,8 $\pm$ 3,1	59%
<b>Контролна група</b>	19,0 $\pm$ 2,4	21,2 $\pm$ 4,0	22,0 $\pm$ 3,8	23,9 $\pm$ 3,9	26,2 $\pm$ 3,1	38 %

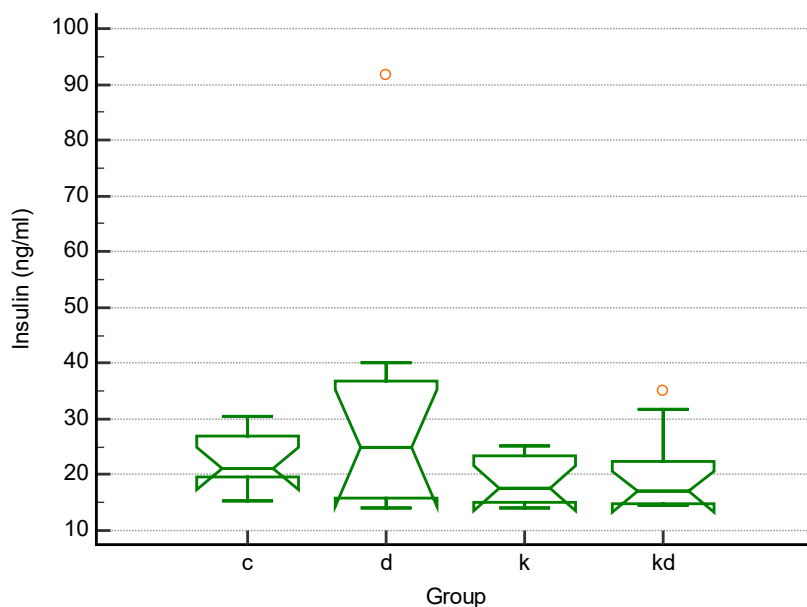
Общата динамика в теглото на опитните животни е показана на фигура 2.



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, k – на кето-диета, c – 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

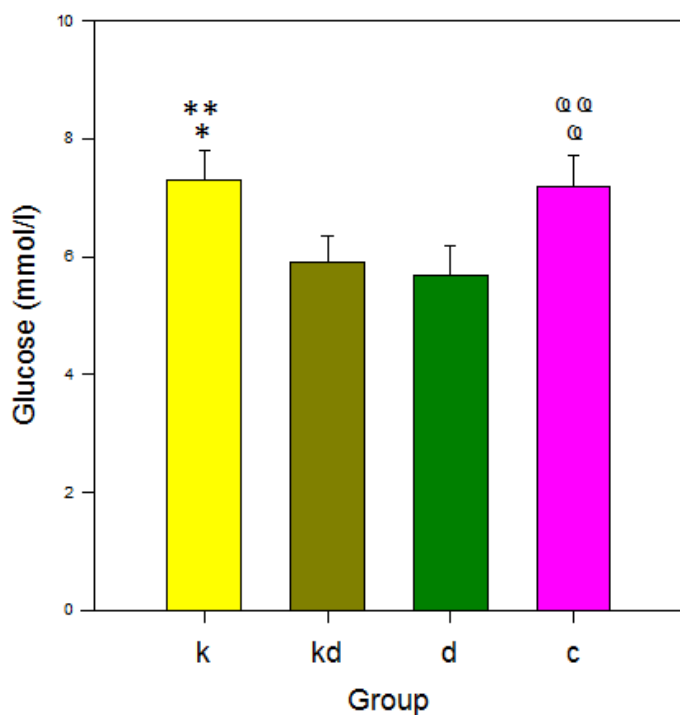
k – на кето-диета

kd – кето-диета +суплементиране с витамин Д

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

### 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 Д 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

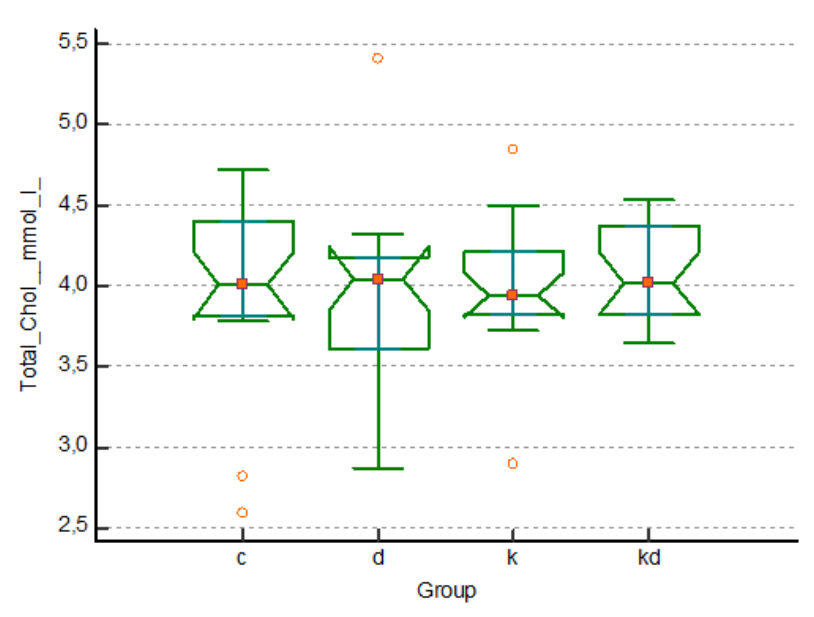
@ -  $p < 0.001$  c спрямо kd

@ @  $p < 0.001$  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

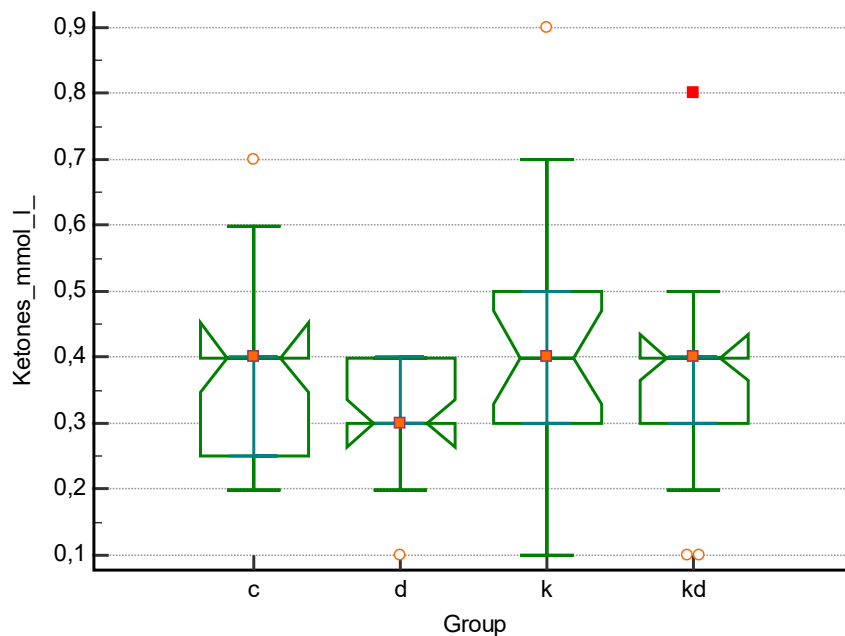
Не се установяват статистически значима разлика ( $p=0.813$ ) – Фигура 5.



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

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 перцентил**

Средните серумни нива на про-оксидантни, анти-оксидантни маркери и витамин D, измерени в края на експеримента, за показани в таблица 3.

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

група	Глутатион пероксидаза (u/l)	8-OHMG (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

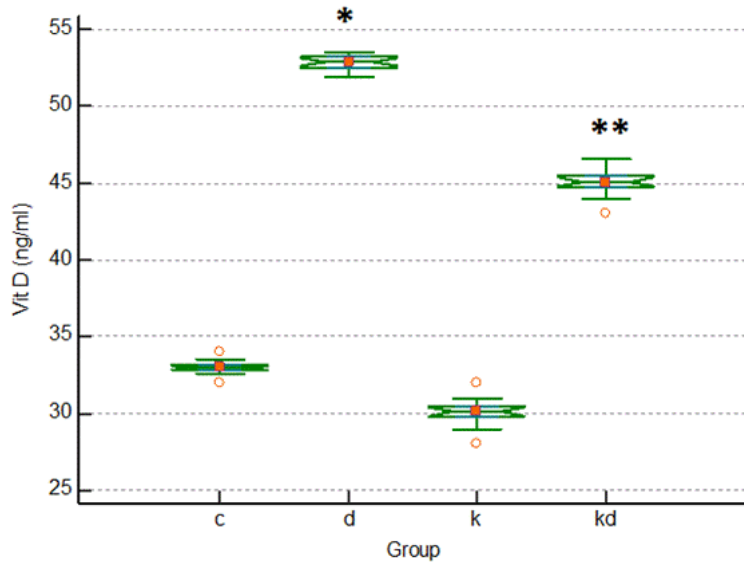
Най-високи нива на глутатион пероксидаза се наблюдават в групата на кетодиета + витамин D (146,65 u/l), а най-ниски – в контролната група (97,54 u/l). Серумните нива на глутатион-пероксидаза в групата с витамин D (130,95 u/l) са по-високи от тези в контролната група и малко по-ниски от тези в групата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

Най-високи серумни нива на 8-OHMG 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-OHMG 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:*

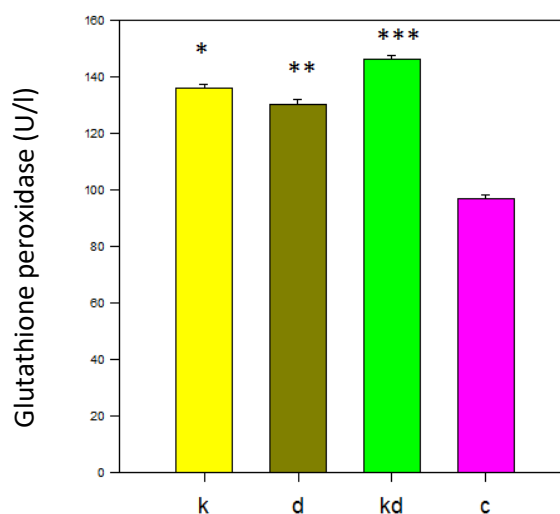
\* -  $p < 0.001$  между група d и всяка от трите останали групи

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

Между c и k не се установява статистически значима разлика. Данните са представени с медианна стойност и 25-75 перцентил.

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**

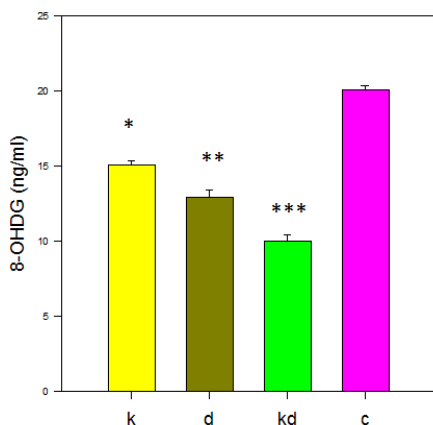
Легенда:

\*  $p < 0.001$  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:

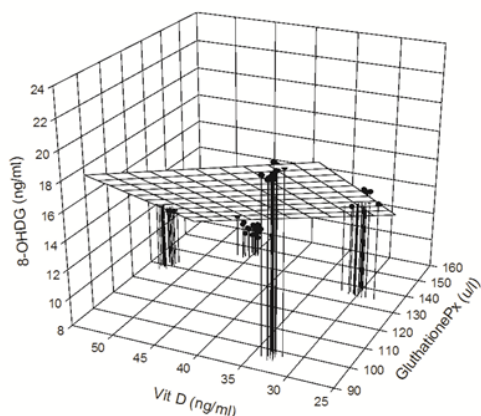
\*  $p < 0.001$  за к спрямо всяка една от другите групи

\*\*  $p < 0.001$  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 стана статистически значима зависимост от активността на глутатион-пероксидаза и от нивата на витамин D – фигура 10.

### 3D Scatter & Mesh



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

Зависимостта между 8-OHdG и глутатион-пероксидазата и витамин D за цялата изследвана популация е както следва:

$$8\text{-OHdG (ng/ml)} = 40,654 - (0,163 * \text{GlutathionePx (u/l)}) - (0,133 * \text{Vit D (ng/ml)})$$

$$N = 74, R = 0,979 \quad R_{\text{sqr}} = 0,958 \quad \text{Adj } R_{\text{sqr}} = 0,957, \text{ Standard Error of Estimate} = 0,732$$

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

## 4.2. Резултати от проведените проучвания с хора

### 4.2.1. 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

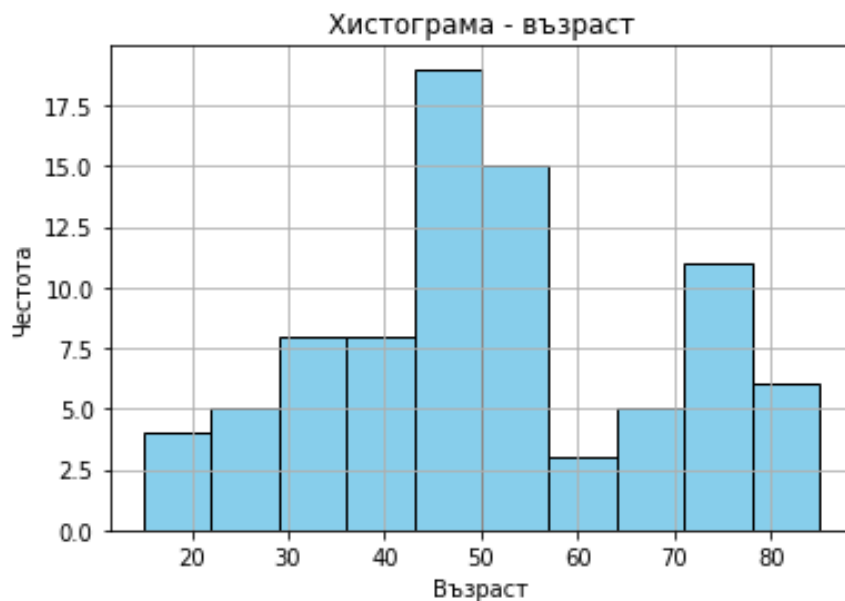
към съветите на лекаря се потвърждава от отговора на втория въпрос (група С) – 50% се консултират с медицински специалист преди поръчката на лекарства.

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.

#### **4.2.2 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.



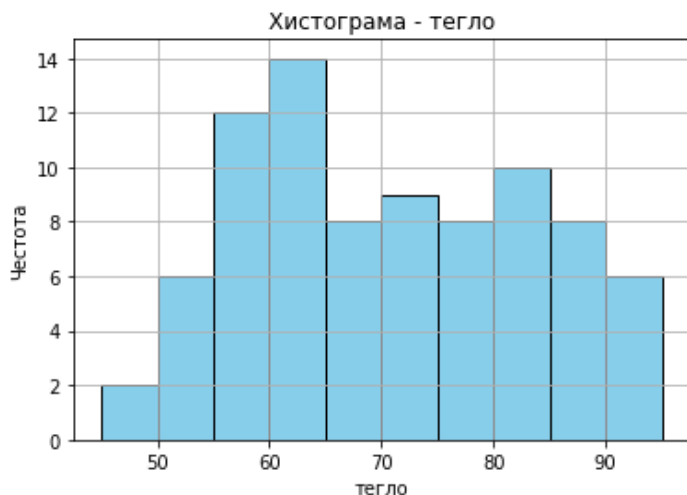
**Фигура 12. Разпределение на изследваните лица по възраст**

От тях жени бяха 61, а мъжете – 23.

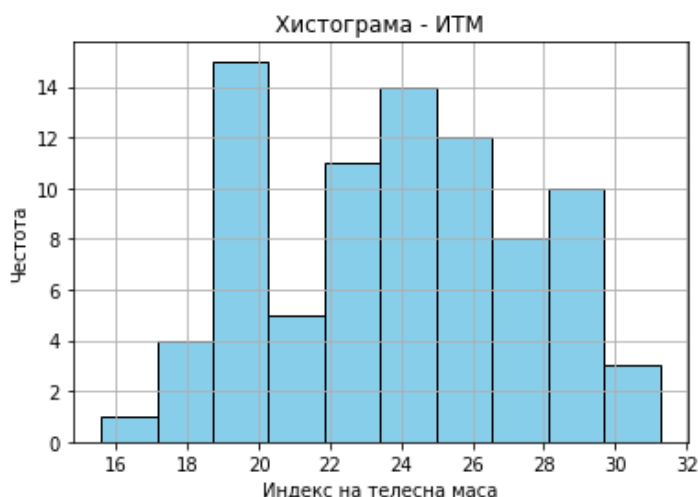
Стойностите на индекс на телесна маса (ИТМ) бяха между 17 и 29 (Средно за изследваните жени – 23; средно за изследваните мъже – 25,64). Разпределенията на изследваните лица по ИТМ и по тегло са визуализирани съответно на Фиг. 13 и Фиг. 14.

**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



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



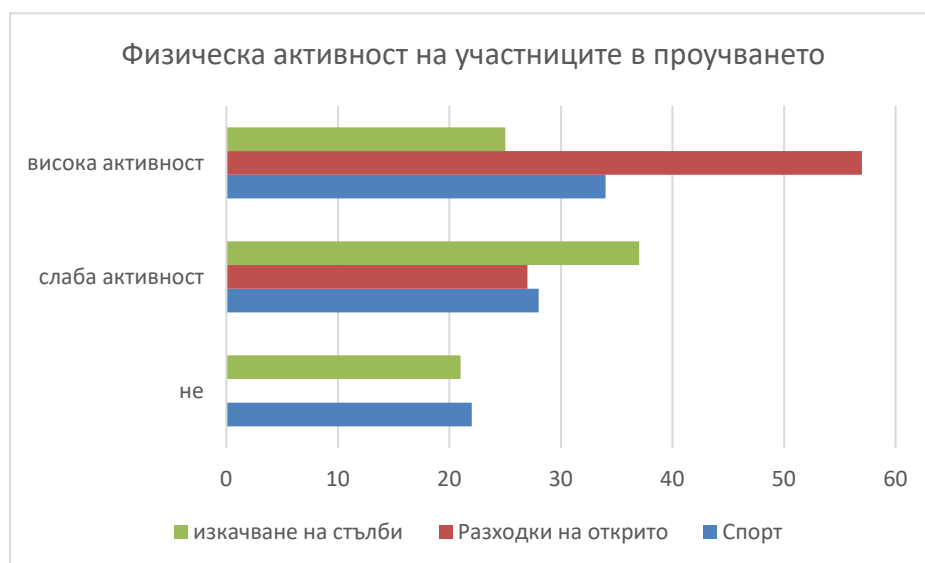
**Фигура 14.** Разпределение на изследваните лица по индекс на телесна маса.

**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 анкетираните 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

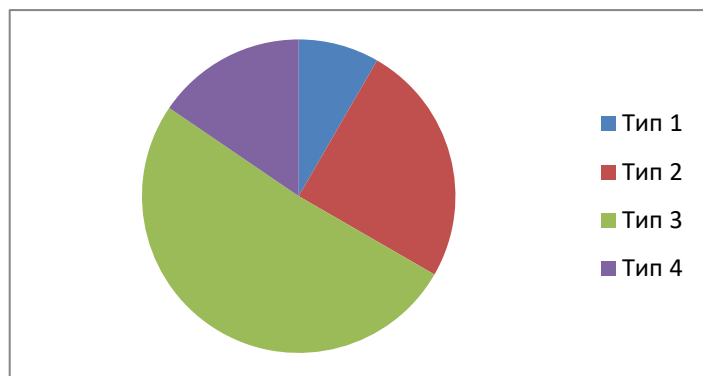
Най – обилно хранене при 45 (54%) участниците в проучването е вечерята, при 38 (45%) е обядът и при един анкетиран (1,2%) е закуската.

*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%) – 6-7 часа; 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**

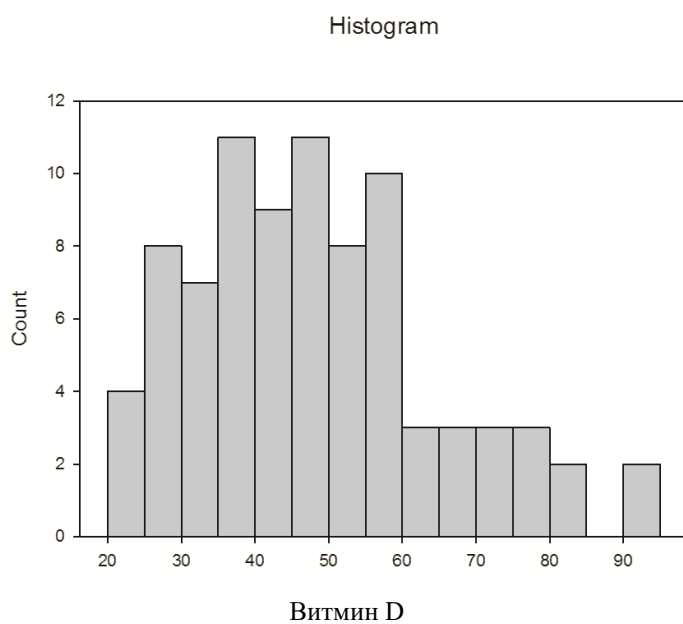
Показател	Мерни единици	Референтни стойности
Glutathion-Peroxidase	U/gHb	27.5 -73.5
25-ОН-Vitamin D	nmol/L	80 – 250

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

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

Средните стойности на витамин D са 43,4 nmol/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.

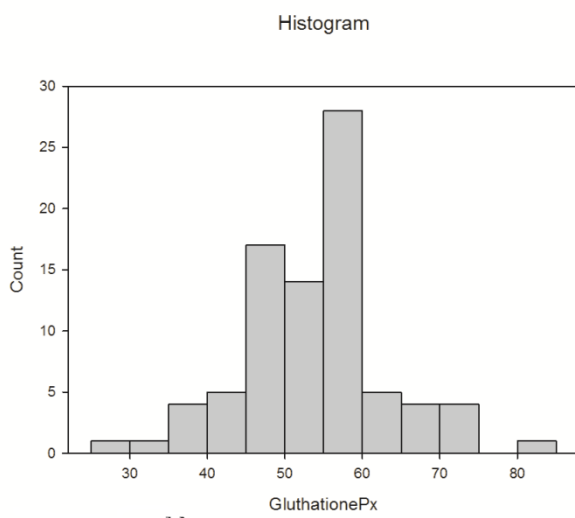


**Фигура 17. Разпределение на стойностите на Витамин D.**



**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.



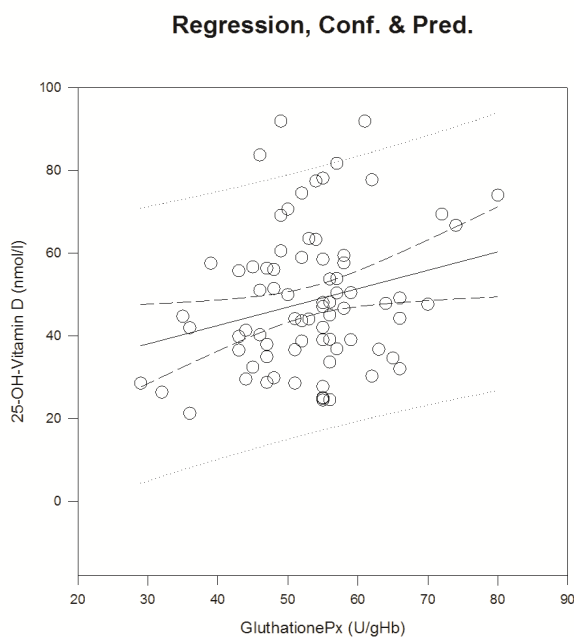
**Фигура 19. Разпределение на стойностите на глутатион пероксидаза**

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

**Връзка между стойностите на витамин D и глутатион пероксидаза:**

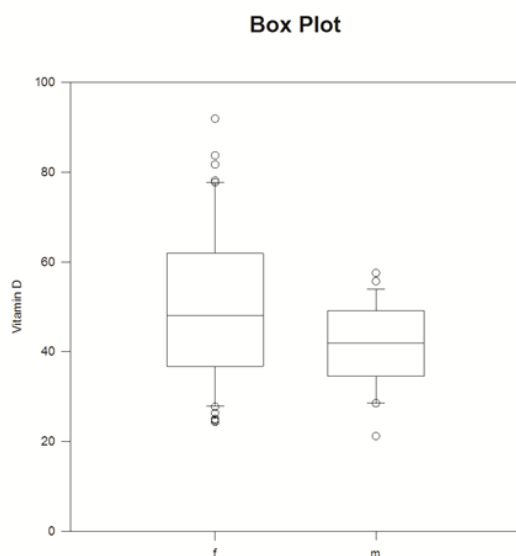
Линейният регресионен анализ открива статистически значима връзка между нивата на Витамин D и глутатион пероксидаза: Установи се слаба положителна корелация между стойностите на витамин D и активността на глутатион-пероксидазата със следната зависимост:  $25\text{-OH-Vitamin D (nmol/l)} = 24,642 + (0,445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

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



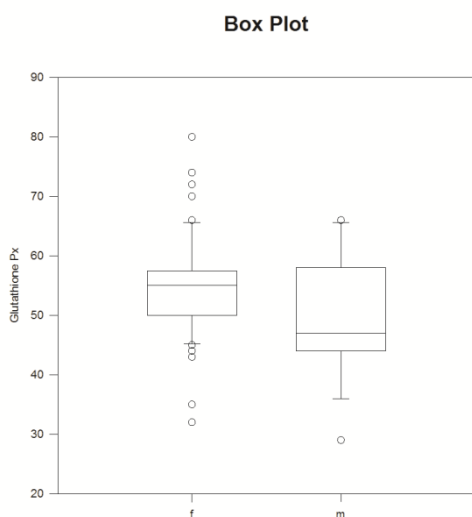
**Фигура 20. Връзка между нивата на витамин D и глутатион пероксидазата в изследваната популация**

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)**

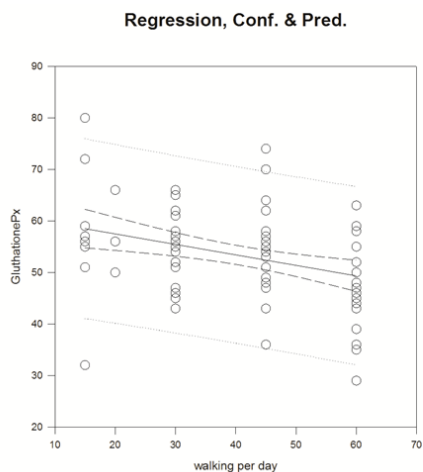
По отношение на глутатион-пероксидазната активност в изследваната популация също се установиха статистически значимо по-високи нива при жените в сравнение с мъжете. Mann-Whitney U Statistic= 448,000 T = 724,000 n(small)= 23 n(big)= 61 (P = 0,011) – фигура 22.



**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:

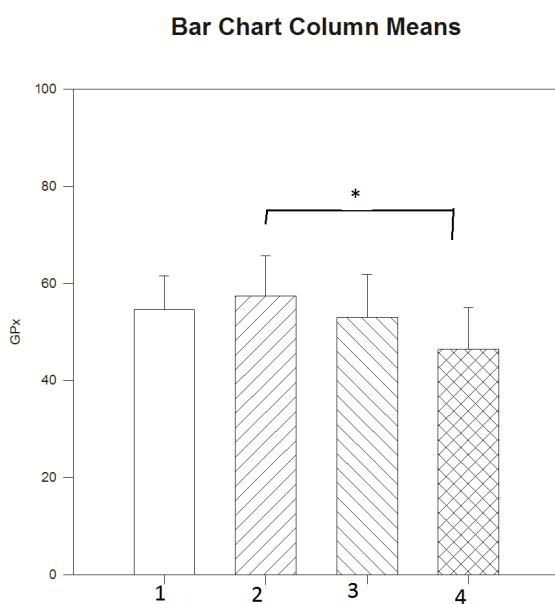
$\text{GlutathionePx} = 61,550 - (0,204 * \text{walking per day})$ ,  $N = 84$ ,  $R = 0,336$ ,  $\text{Rsqr} = 0,113$ ,  $\text{Adj Rsqr} = 0,102$ ,  $p=0.002$  – фигура 23.



**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 показва, 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.

## **ГЛАВА ПЕТА**

### **ОБСЪЖДАНЕ**

#### **5.1. Обсъждания по отношение на проведените експерименти с опитни животни**

##### **5.1.1 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 ѝ 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 А (LDHA), без данни за инсулиновата експресия. В друго проучване се съобщава за редуциране на  $\alpha$  и  $\beta$ -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  $\beta$ -клетъчна функция чрез директни и индиректни ефекти. Директният ефект се осъществява чрез свързването на витамин D към неговия рецептор върху  $\beta$ -клетката, а индиректният - чрез регулация върху калциевото навлизане в  $\beta$ -клетките. 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 глюкозомедираната секреция на инсулин в  $\beta$ -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-X-рецептор (VDR-RXR) с витамин D респондерни елементи (VDRE), идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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-медираните 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  $\beta$ -клетъчната секреторна функция. Витамин D увеличава инсулиновата чувствителност като стимулира експресията на инсулинови рецептори и/или чрез активиране на рецепторите, активирани от пероксисомни пролифератори- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). Промяна във вътреклетъчния калций в таргетните на инсулина тъкани може да доведе до периферна инсулинова резистентност чрез изменение на пътищата на сигнална трансдукция, което да предизвика намалена активност на глюкозните транспортери. Витамин D подобрява преживяемостта на  $\beta$ -клетките, като инактивира ядрения фактор- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Той може индиректно да повлияе инсулиновата резистентност 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 25(OH)D 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-медираната инсулинова секреция.

### **5.1.2. 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

кетодиета 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 кетодиета.

Множество научни изследвания показват връзка между прилагането на кетогенна диета и стимулирането 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.

## **5.2. Обсъждания по отношение на проведените проучвания при хора**

### **5.2.1. 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 анкетиранци 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 предизвикателства 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 коронавируса, 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.

### **5.2.2. 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 показва 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.

## 6. 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 проучване).
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.

## **7. 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 D 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.

## **8. ПУБЛИКАЦИИ**

### **Научни публикации на докторанта:**

- Строкова - Стоилова М, Андреева-Гатева П, Попова Д. Кетогенна диета и управление на телото. Летописи на БАНИ 2020, 1: 50-52
- Строкова-Стоилова М, Андреева-Гатева П. Оксидативен стрес, витамин Д и управление на телото 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, антиоксидантни 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

## **ГЛАВА СЕДМА**

### **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 D 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 последиствия върху здравето тепърва ще бъдат установявани.

### **Научни публикации на докторанта:**

- Строкова - Стоилова М, Андреева-Гатева П, Попова Д. Кетогенна диета и управление на телото. Летописи на БАНИ 2020, 1: 50-52
- Строкова-Стоилова М, Андреева-Гатева П. Оксидативен стрес, витамин Д и управление на телото 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, антиоксидантни 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

## **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!

## **БИБЛИОГРАФИЯ**

1. Jones D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1865–1879. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865
2. Burton G.J., Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obs. Gynaecol*. 2011;25:287–299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
3. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 2012;5:9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
4. Ogura S., Shimosawa T. Oxidative stress and organ damages. *Curr. Hypertens. Rep*. 2014;16:452. doi: 10.1007/s11906-014-0452-x.
5. Efe U., Dede S., Yüksek V., Çetin S. Apoptotic and Oxidative Mechanisms in Liver and Kidney Tissues of Sheep with Fluorosis. *Biol. Trace Elem. Res.* 2021;199:136–141. doi: 10.1007/s12011-020-02121-y.
6. La Russa D., Brunelli E., Pellegrino D. Oxidative imbalance and kidney damage in spontaneously hypertensive rats: Activation of extrinsic apoptotic pathways. *Clin. Sci*. 2017;131:1419–1428. doi: 10.1042/CS20170177.
7. Sangeetha Lakshmi B., Harini Devi N., Suchitra M.M., Srinivasa Rao P.V.L.N., Siva Kumar V. Changes in the inflammatory and oxidative stress markers during a single hemodialysis session in patients with chronic kidney disease. *Ren. Fail.* 2018;40:534–540. doi: 10.1080/0886022X.2018.1487857
8. Sasaki K., Shoji T., Kabata D., Shintani A., Okute Y., Tsuchikura S., Shimomura N., Tsujimoto Y., Nakatani S., Mori K., et al. Oxidative Stress and Inflammation as Predictors of Mortality and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients: The DREAM Cohort. *J. Atheroscler. Thromb.* 2021;28:249–260. doi: 10.5551/jat.56069
9. Yari Z., Tabibi H., Najafi I., Hedayati M., Movahedian M. Effects of soy isoflavones on serum systemic and vascular inflammation markers and oxidative stress in peritoneal dialysis patients: A randomized controlled trial. *Phytother. Res.* 2020;34:3011–3018. doi: 10.1002/ptr.6729
10. Russa DLa Pellegrino D., Montesanto A., Gigliotti P., Perri A., Russa A.L.a., Bonofiglio R. Oxidative Balance and Inflammation in Hemodialysis Patients: Biomarkers of Cardiovascular Risk? *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019;2019:8567275. doi: 10.1155/2019/8567275
11. Chen Z., Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 2014;30:271–281. doi: 10.1007/s12264-013-1423-y.

12. Kattoor A.J., Pothineni N.V.K., Palagiri D., Mehta J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2017;19:42. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6
13. Bisht S., Faiq M., Tolahunase M., Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 2017;14:470–485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69.
14. Kirkham P.A., Barnes P.J. Oxidative stress in COPD. *Chest.* 2013;144:266–273. doi: 10.1378/chest.12-2664
15. Kimura A., Namekata K., Guo X., Noro T., Harada C., Harada T. Targeting Oxidative Stress for Treatment of Glaucoma and Optic Neuritis. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017;2017:2817252. doi: 10.1155/2017/2817252
16. Orzechowski A., Cywińska A., Rostagno A.A., Rizzi F.M. Oxidative Stress, Chronic Inflammation, and Amyloidoses. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019;2019:6024975. doi: 10.1155/2019/6024975
17. Crotty G.F., Ascherio A., Schwarzschild M.A. Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 2017;298:210–224. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.017.
18. Chielle E.O., Trott A., da Silva R.B., Casarin J.N., Fortuna P.C., da Cruz I.B.M., Moretto M.B., Moresco R.N. Impact of the Ile105Val Polymorphism of the Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Gene on Obesity and Markers of Cardiometabolic Risk in Young Adult Population. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2017;125:335–341. doi: 10.1055/s-0042-105279.
19. Arfianti E., Larter C.Z., Lee S., Barn V., Haigh G., Yeh M.M., Ioannou G.N., Teoh N.C., Farrell G.C. Obesity and diabetes accelerate hepatocarcinogenesis via hepatocyte proliferation independent of NF- $\kappa$ B or Akt/mTORC1. *J. Clin. Transl. Res.* 2016;2:26–37
20. Nteeba J., Ganesan S., Keating A.F. Impact of obesity on ovotoxicity induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in mice. *Biol. Reprod.* 2014;90:68. doi: 10.1095/biolreprod.113.114215
21. Nteeba J., Ross J.W., Perfield J.W., 2nd, Keating A.F. High fat diet induced obesity alters ovarian phosphatidylinositol-3 kinase signaling gene expression. *Reprod. Toxicol.* 2013;42:68–77. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.07.026
22. Karam B.S., Chavez-Moreno A., Koh W., Akar J.G., Akar F.G. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 2017;16:120. doi: 10.1186/s12933-017-0604-9
23. Luo J., Mills K., le Cessie S., Noordam R., van Heemst D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res. Rev.* 2020;57:100982. doi: 10.1016/j.arr.2019.100982
24. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharm.* 2004;142:231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776

25. Mattila H., Khorobrykh S., Havurinne V., Tyystjärvi E. Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2015;152:176–214. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.001.
26. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 2015;30:11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
27. Searcy DG. Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res.* 2003;13: 229-238.
28. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* 2005;115:547-555.
29. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* 2006;10:208.
30. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001;53:135-159.
31. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.
32. Pire L, Deby-Dupont G, Lemineur T, Preiser JC. How to keep oxidative stress under control? *CurrNutrFoodSci.* 2007;3:222-235.
33. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 2006;368:157-169.
34. Searcy DG. Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res.* 2003;13:229-238.
35. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.
36. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300.
37. Harman D. A biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972;20: 145-147.
38. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2007;297:842-857.
39. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, et al. The SU.VI.MAX study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med.* 2004;164:2335-2342.

40. Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ, Bae WK. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol*. 2010;21:166-179.
41. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(2):CD007176.
42. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000;355:1179-1180.
43. McGinley C, Shafat A, Donnelly AE. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? *Sports Med*. 2009;39:1011-1032.
44. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol*. 2010;45:410-418.
45. Falone S, Mirabilio A, Pennelli A et al. Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. *Physiol Res*. 2010;59:953-961.
46. Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, et al. Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:E38-E43.
47. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010;12:662-667.
48. Hyun DH, Emerson SS, Jo DG, Mattson MP, de Cabo R. Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19908-19912.
49. Holloszy JO, Fontana L. Caloric restriction in humans. *Exp Gerontol*. 2007;42: 709-712.
50. Furst P. The role of antioxidants in nutritional support. *Proc Nutr Soc*. 1996;55:945-961.
51. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol*. 1954;38:397-432.
52. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage— the role of oxygen, shock, and related factors: a review. *Am J Pathol*. 1976;85:209-228.
53. Hayes D Jr, Feola DJ, Murphy BS, Shook LA, Ballard HO. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Respiration*. 2010;79:425-436.
54. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, et al. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci*. 2009;112:4-16.
55. Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011;306:1549-1556.

56. Czernichow S, Vergnaud AC, Galan P, et al. Effects of long-term antioxidant supplementation and association of serum antioxidant concentrations with risk of metabolic syndrome in adults. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:329-335.
57. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-820.
58. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mel-litus. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:1773-1782.
59. Ерменлиева Е.; Лалева К; Бояджиев В; Цанкова Г. Кетогенна диета – биохимични аспекти и механизъм на антиконвулсивната ефективност. Варненски медицински форум, т. 6, 2017, прил. 2
60. Andrews PJ, Avenell A, Noble DW, et al. Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients. *BMJ.* 2011;342:d1542.
61. Crimi E, Liguori A, Condorelli M, et al. The beneficial effects of antioxidant supplementation in enteral feeding in critically ill patients: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anesth Analg.* 2004;99:857-863.
62. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 2002;236(6):814-822.
63. Berger MM, Baines M, Raffoul W. Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1293-1300.
64. Young I.S., Woodside J.V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001;54:176–186. doi: 10.1136/jcp.54.3.176.
65. V Pitchaimani, S Arumugam, R Thandavarayan et al, Brain adaptations of insulin signaling kinases, GLUT 3, p-BADser155 and nitrotyrosine expression in various hypoglycemic models of mice, *Neurochemistry International*, Volume 137, 2020, 104745, ISSN 0197-0186, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104745>.
66. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Apr;1011:168-76. doi: 10.1007/978-3-662-41088-2\_17. PMID: 15126294
67. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18(4):302-308. doi:10.3748/wjg.v18.i4.302

68. Guo, C., Li, X., Wang, R. et al. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. *Sci Rep* 6, 32581 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep32581>
69. Korkmaz, K., Butuner, B., Roggenbuck, D., Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker, *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, (1), 2018, <http://jlp.amegroups.com/article/view/4605>
70. Campbell N.K., Fitzgerald H.K., Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat. Rev. Immunol.* 2021 doi: 10.1038/s41577-020-00491-x.
71. Stocker R., Perrella M.A. Heme oxygenase-1, A novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*. 2006;114:2178–2189. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.598698.
72. Taillé C., El-Benna J., Lanone S., Dang M.-C., Ogier-Denis E., Aubier M., Boczkowski J. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J. Biol. Chem.* 2004;279:28681–28688. doi: 10.1074/jbc.M310661200.
73. Ryter S.W., Xi S., Hartsfield C.L., Choi A.M.K. Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway regulates heme oxygenase-1 gene expression by hypoxia in vascular cells. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:587–592. doi: 10.1089/15230860260220085.
74. Morita T., Imai T., Sugiyama T., Katayama S., Yoshino G. Heme oxygenase-1 in vascular smooth muscle cells counteracts cardiovascular damage induced by angiotensin II. *Curr. Neurovasc. Res.* 2005;2:113–120. doi: 10.2174/1567202053586848.
75. Asher G., Tsvetkov P., Kahana C., Shaul Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 2005;19:316–321. doi: 10.1101/gad.319905.
76. Oja S.S., Janáky R., Varga V., Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem. Int.* 2000;37:299–306. doi: 10.1016/S0197-0186(00)00031-0
77. Trevisson E., DiMauro S., Navas P., Salviati L. Coenzyme Q deficiency in muscle. *Curr. Opin. Neurol.* 2011;24:449–456. doi: 10.1097/WCO.0b013e32834ab528.
78. Zhang J., Zhou X., Wu W., Wang J., Xie H., Wu Z. Regeneration of glutathione by  $\alpha$ -lipoic acid via Nrf2/ARE signaling pathway alleviates cadmium-induced HepG2 cell toxicity. *Environ. Toxicol. Pharm.* 2017;51:30–37. doi: 10.1016/j.etap.2017.02.022.
79. Dong Y., Wang H., Chen Z. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury via Insulin Receptor and PI3K/Akt-Dependent Inhibition of NADPH Oxidase. *Int. J. Endocrinol.* 2015;2015:903186. doi: 10.1155/2015/903186.
80. Han T., Bai J., Liu W., Hu Y. A systematic review and meta-analysis of  $\alpha$ -lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. *Eur. J. Endocrinol.* 2012;167:465–471. doi: 10.1530/EJE-12-0555.

81. Shinto L., Quinn J., Montine T., Dodge H.H., Woodward W., Baldauf-Wagner S., Waichunas D., Bumgarner L., Bourdette D., Silbert L., et al. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2014;38:111–120. doi: 10.3233/JAD-130722.
82. Sedlak T.W., Saleh M., Higginson D.S., Paul B.D., Juluri K.R., Snyder S.H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:5171–5176. doi: 10.1073/pnas.0813132106.
83. Chen W., Maghzal G.J., Ayer A., Suarna C., Dunn L.L., Stocker R. Absence of the biliverdin reductase-a gene is associated with increased endogenous oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* 2018;115:156–165. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.020.
84. Kim J.Y., Lee D.Y., Kang S., Miao W., Kim H., Lee Y., Jon S. Bilirubin nanoparticle preconditioning protects against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Biomaterial.* 2017;133:1–10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.011.
85. Bösch F., Thomas M., Kogler P., Oberhuber R., Sucher R., Aigner F., Semsroth S., Wiedemann D., Yamashita K., Troppmair J., et al. Bilirubin rinse of the graft ameliorates ischemia reperfusion injury in heart transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ. Transpl.* 2014;27:504–513. doi: 10.1111/tri.12278.
86. Sundararaghavan V.L., Binopal S., Stec D.E., Sindhwani P., Hinds T.D.J. Bilirubin, a new therapeutic for kidney transplant? *Transpl. Rev.* 2018;32:234–240. doi: 10.1016/j.trre.2018.06.003.
87. Blankenhaus B., Braza F., Martins R., Bastos-Amador P., González-García I., Carlos A.R., Mahu I., Faisca P., Nunes J.M., Ventura P., et al. Ferritin regulates organismal energy balance and thermogenesis. *Mol. Metab.* 2019;24:64–79. doi: 10.1016/j.molmet.2019.03.008.
88. Kell D.B., Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014;6:748–773. doi: 10.1039/C3MT00347G.
89. Ong D.S.T., Wang L., Zhu Y., Ho B., Ding J.L. The response of ferritin to LPS and acute phase of *Pseudomonas* infection. *J. Endotoxin Res.* 2005;11:267–280. doi: 10.1177/09680519050110050301.
90. Dąbrowska N., Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2017;26:155–166. doi: 10.17219/acem/43272.
91. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press; Oxford, England: 2015.
92. Marnett L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999;424:83–95. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00010-X.

93. Collodel G., Moretti E., Micheli L., Menchiari A., Moltoni L., Cerretani D. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology*. 2015;3:280–286. doi: 10.1111/andr.297.
94. Musiek E.S., Morrow J.D. F2-isoprostanes as markers of oxidant stress: An overview. *Curr. Protoc. Toxicol.* 2005;17:175. doi: 10.1002/0471140856.tx1705s24.
95. Ahmed O.S., Galano J.-M., Pavlickova T., Revol-Cavalier J., Vigor C., Lee J.C.-Y., Oger C., Durand T. Moving forward with isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: Where are we now? *Essays Biochem.* 2020;64:463–484. doi: 10.1042/EBC20190096.
96. Biringer R.G. The Role of Eicosanoids in Alzheimer’s Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019;16:2560. doi: 10.3390/ijerph16142560.
97. Meagher E.A., Barry O.P., Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA*. 2001;285:1178–1182. doi: 10.1001/jama.285.9.1178.
98. Levine M., Wang Y., Padayatty S.J., Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98:9842–9846. doi: 10.1073/pnas.171318198
99. Halliwell B., Long L.H., Yee T.P., Lim S., Kelly R. Establishing biomarkers of oxidative stress: The measurement of hydrogen peroxide in human urine. *Curr. Med. Chem.* 2004;11:1085–1092. doi: 10.2174/0929867043365404.
100. Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Investig.* 2003;111:583–593. doi: 10.1172/JCI200318022.
101. LoPachin R.M., Gavin T., Petersen D.R., Barber D.S. Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: Nucleophilic targets and adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 2009;22:1499–1508. doi: 10.1021/tx900147g.
102. Park Y.S., Taniguchi N. Acrolein induces inflammatory response underlying endothelial dysfunction: A risk factor for atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1126:185–189. doi: 10.1196/annals.1433.034.
103. Kehrer J.P., Biswal S.S. The molecular effects of acrolein. *Toxicol. Sci.* 2000;57:6–15. doi: 10.1093/toxsci/57.1.6.
104. Hamann K., Durkes A., Ouyang H., Uchida K., Pond A., Shi R. Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma. *J. Neurochem.* 2008;107:712–721. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05622.x.
105. Park Y.S., Kim J., Misonou Y., Takamiya R., Takahashi M., Freeman M.R., Taniguchi N. Acrolein induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human umbilical vein endothelial cells: Roles of p38 MAP kinase. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:1319–1325. doi: 10.1161/ATVBAHA.106.132837.

106. Lee S.E., Lee S.H., Ryu D.S., Park C.-S., Park K.-S., Park Y.S. Differentially-expressed genes related to atherosclerosis in acrolein-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *BioChip. J.* 2010;4:264–271. doi: 10.1007/s13206-010-4402-7.
107. Conklin D.J., Bhatnagar A., Cowley H.R., Johnson G.H., Wiechmann R.J., Sayre L.M., Trent M.B., Boor P.J. Acrolein generation stimulates hypercontraction in isolated human blood vessels. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2006;217:277–288. doi: 10.1016/j.taap.2006.09.009.
108. McCall M.R., Tang J.Y., Bielicki J.K., Forte T.M. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1599–1606. doi: 10.1161/01.ATV.15.10.1599.
109. Alfredsson L., Hammar N., Hogstedt C. Incidence of myocardial infarction and mortality from specific causes among bus drivers in Sweden. *Int. J. Epidemiol.* 1993;22:57–61. doi: 10.1093/ije/22.1.57.
110. van der Toorn M., Smit-de Vries M.P., Slebos D.-J., de Bruin H.G., Abello N., van Oosterhout A.J.M., Bischoff R., Kauffman H.F. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007;293:L1156–L1162. doi: 10.1152/ajplung.00081.2007.
111. Liu X., Yang Z., Pan X., Zhu M., Xie J. Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 2010;195:90–98. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.02.004.
112. Araya J., Tsubouchi K., Sato N., Ito S., Minagawa S., Hara H., Hosaka Y., Ichikawa A., Saito N., Kadota T., et al. PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis. *Autophagy.* 2019;15:510–526. doi: 10.1080/15548627.2018.1532259.
113. Wang L., Lingappan K., Jiang W., Couroucli X.I., Welty S.E., Shivanna B., Barrios R., Wang G., Khan M.F., Gonzalez F.J., et al. Disruption of cytochrome P4501A2 in mice leads to increased susceptibility to hyperoxic lung injury. *Free. Radic. Biol. Med.* 2015;82:147–159. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.019.
114. Nègre-Salvayre A., Garoby-Salom S., Swiader A., Rouahi M., Pucelle M., Salvayre R. Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free. Radic. Biol. Med.* 2017;111:127–139. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.038.
115. Helmschrodt C., Becker S., Schröter J., Hecht M., Aust G., Thiery J., Ceglarek U. Fast LC-MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. *Clin. Chim. Acta.* 2013;425:3–8. doi: 10.1016/j.cca.2013.06.022.
116. Zhou L., Shi M., Guo Z., Brisbon W., Hoover R., Yang H. Different cytotoxic injuries induced by lysophosphatidylcholine and 7-ketocholesterol in mouse endothelial cells. *Endothelium.* 2006;13:213–226. doi: 10.1080/10623320600780926.
117. Lehmann M., Pirinen E., Mirsaidi A., Kunze F.A., Richards P.J., Auwerx J., Hottiger M.O. ARTD1-induced poly-ADP-ribose formation enhances PPAR $\gamma$  ligand binding and co-factor exchange. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:129–142. doi: 10.1093/nar/gku1260.

118. Müller K.H., Hayward R., Rajan R., Whitehead M., Cobb A.M., Ahmad S., Sun M., Goldberga I., Li R., Bashtanova U., et al. Poly(ADP-Ribose) Links the DNA Damage Response and Biom mineralization. *Cell Rep.* 2019;27:3124–3138.e13. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.038.
119. Coskun C., Kural A., Döventas Y., Koldas M., Ozturk H., Inal B.B., Gümüs A. Hemodialysis and protein oxidation products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1100:404–408. doi: 10.1196/annals.1395.045.
120. Bhattacharjee S., Pennathur S., Byun J., Crowley J., Mueller D., Gischler J., Heinecke J.W. NADPH oxidase of neutrophils elevates o,o'-dityrosine cross-links in proteins and urine during inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;395:69–77. doi: 10.1006/abbi.2001.2557.
121. Leeuwenburgh C., Rasmussen J.E., Hsu F.F., Mueller D.M., Pennathur S., Heinecke J.W. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Biol. Chem.* 1997;272:3520–3526. doi: 10.1074/jbc.272.6.3520.
122. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 2003;329:23–38. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.
123. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free. Radic. Biol. Med.* 2002;32:1102–1115. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00826-2.
124. Chiorcea-Paquim A.-M., Oliveira-Brett A.M. Nanostructured material-based electrochemical sensing of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine: A comprehensive review. *Mikrochim. Acta.* 2021;188:58. doi: 10.1007/s00604-020-04689-7.
125. Karahan M., Yildirim M., Kucuk H.F., Turunc V., Demir H., Salturk C., Yavuz A., Demir T., Ari E. Oxidative DNA Damage Is Increased in Living Kidney Donors. *Transpl. Proc.* 2019;51:1049–1053. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.02.011.
126. Loft S., Poulsen H.E. Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and molecular damage. *Methods Enzym.* 1999;300:166–184. doi: 10.1016/s0076-6879(99)00124-x.
127. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37-56, 2004.
128. Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., Hiai, H., Imamura, S., Toyokuni, S., "S"-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure", *Journal of Investigative Dermatology*, 107(5):733-737, 1996.
129. Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O. I., "Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease", *Internet Journal of Medical Update* .1:1-17, 2006.

130. Duni, A., Liakopoulos, V., Rapsomanikis, K.P., Dounousi, E., "Chronic kidney disease and disproportionately increased cardiovascular damage: Does oxidative stress explain the burden?" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9036450, 2017.
131. Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengeller, Z., Szabo, C., Brownlee, M., "Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells", *Journal of Clinical Investigation*. 112(7), 1049-1057, 2003.
132. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M., "Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and P-cell dysfunction?" *Diabetes*, 52, 1-8, 2003.
133. Biswas, S.K., "Does the Interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5698931, 2016.
134. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B., "Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury". *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126-1167, 2014. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
135. Neher, E. Sakaba, T., "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release". *Neuron*, 59(6), 861-72, 2008. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.019.
136. Perticone, F., Ceravolo, R., Candigliota, M., Ventura, G., Iacopino, S., Sinopoli, F., Mattioli, P.L., "Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C", *Diabetes*. 50(1), 159-165, 2001.
137. Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., et al., "Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases", *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 378-400, 2015. <http://doi.org/10.3390/ijms16010378>
138. Caramori, G., Papi, A., "Oxidants and asthma", *Thorax*, 59(2), 170-173, 2004. <http://doi.org/10.1136/thorax.2002.002477>
139. Sesti, F., Tsitsilonis, O.E, Kotsinas, A., Trougakos, I.P., "Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis" *In Vivo*, 26, 395-402, 2012.
140. Chinwe, E., "Generation and reaction of free radicals in the human body: A major cause of aging and chronic degenerative diseases", *EC Nutrition*, 1(3) 132-136, 2015.
141. Mao, C., Yuan, JQ., Lv, YB. et al. Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: a community-based cohort study. *BMC Geriatr* 19, 104 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1109-z>
142. McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity* (Silver Spring). 2016 Nov;24(11):2301-2310. doi: 10.1002/oby.21654. PMID: 27804267.

143. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:400–418
144. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: Molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 2002;1:1.
145. Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, et al.. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:883–896.
146. Ortega RM, Rodriguez-Rodriguez E, Aparicio A, et al.. Young children with excess of weight show an impaired selenium status. *Int J Vitam Nutr Res* 2012;82:121–129.
147. Strauss RS. Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). *National Health and Nutrition Examination Survey. J Pediatr* 1999;134:160–165.
148. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, et al.. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117–3132.
149. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, et al.. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 1999;13:1231–1238.
150. Salvadori A, Fanari P, Fontana M, et al.. Oxygen uptake and cardiac performance in obese and normal subjects during exercise. *Respiration* 1999;66:25–33.
151. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, et al.. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 2003;20:255–268.
152. Martinez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: An slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem* 2006;62:303–306.
153. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1159–1164.
154. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, et al.. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 2002;35:627–631.
155. Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:772–779.
156. Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, et al.. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril* 2003;80:123–127.
157. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997;53:307–321.
158. Pi-Sunyer FX. Health implications of obesity. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1595S–1603S.
159. Sinha, N., Dabia P.K., "Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review", *Current hypertension review*, 11(2),132-42, 2015.

160. Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC. Oxidative Stress and cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul 11;70(2):230-251. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.043. PMID: 28683970; PMCID: PMC5568826.
161. Nawab A, Nichols A, Klug R, Shapiro JI, Sodhi K. Spin Trapping: A Review for the Study of Obesity Related Oxidative Stress and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Clin Cell Immunol*. 2017 Jun;8(3):505. doi: 10.4172/2155-9899.1000505. Epub 2017 May 17. PMID: 28815154; PMCID: PMC5555609.
162. Lechuga-Sancho AM, Gallego-Andujar D, Ruiz-Ocaña P, Visiedo FM, Saez-Benito A, Schwarz M, Segundo C, Mateos RM. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS One*. 2018 Jan 25;13(1):e0191547. doi: 10.1371/journal.pone.0191547. PMID: 29370267; PMCID: PMC5784965.
163. Na IJ, Park JS, Park SB. Association between Abdominal Obesity and Oxidative Stress in Korean Adults. *Korean J Fam Med*. 2019 Nov;40(6):395-398. doi: 10.4082/kjfm.18.0086. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31668052; PMCID: PMC6887768.
164. García-Sánchez A, Gámez-Nava JI, Díaz-de la Cruz EN, Cardona-Muñoz EG, Becerra-Alvarado IN, Aceves-Aceves JA, Sánchez-Rodríguez EN, Miranda-Díaz AG. The Effect of Visceral Abdominal Fat Volume on Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines in Subjects with Normal Weight, Overweight and Obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Apr 8;13:1077-1087. doi: 10.2147/DMSO.S245494. PMID: 32308457; PMCID: PMC7152535.
165. Horn RC, Gelatti GT, Mori NC, Tissiani AC, Mayer MS, Pereira EA, Ross M, Moreira PR, Bortolotto JW, Felippin T. Obesity, bariatric surgery and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2017 Mar;63(3):229-235. doi: 10.1590/1806-9282.63.03.229. PMID: 28489128.
166. Picu A, Petcu L, Ștefan S, Mitu M, Lixandru D, Ionescu-Tîrgoviște C, Pîrcălăbioru GG, Ciulu-Costinescu F, Bubulica MV, Chifiriuc MC. Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Molecules*. 2017 May 1;22(5):714. doi: 10.3390/molecules22050714. PMID: 28468307; PMCID: PMC6154306.
167. Frontiers Production Office. Erratum: The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Sep 27;10:693. doi:

10.3389/fendo.2019.00693. Erratum for: *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Aug 13;10:540. PMID: 31608015; PMCID: PMC6777438.

168. Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, Coppola M, Ferati K, Bexheti-Ferati A, Sciarra A, Nicoletti GF, Ferraro GA, Boccellino M. The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Aug 13;10:540. doi: 10.3389/fendo.2019.00540. Erratum in: *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Sep 27;10:693. PMID: 31456748; PMCID: PMC6701166.

169. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015 Dec;13(10):423-44. doi: 10.1089/met.2015.0095. PMID: 26569333; PMCID: PMC4808277.

170. Rigobon AV, Kanagasabai T, Taylor VH. Obesity moderates the complex relationships between inflammation, oxidative stress, sleep quality and depressive symptoms. *BMC Obes*. 2018 Dec 3;5:32. doi: 10.1186/s40608-018-0208-2. PMID: 30524737; PMCID: PMC6276225.

171. Demaison L. Oxidative Stress and Obesity- and Type 2 Diabetes-Induced Heart Failure. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 23;9(8):653. doi: 10.3390/antiox9080653. PMID: 32717814; PMCID: PMC7465016.

172. Valenzuela R, Das UN, Videla LA, Llorente CG. Nutrients and Diet: A Relationship between Oxidative Stress, Aging, Obesity, and Related Noncommunicable Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Jul 16;2018:7460453. doi: 10.1155/2018/7460453. PMID: 30116490; PMCID: PMC6079337.

173. Schiapaccassa A, Maranhão PA, de Souza MDGC, Panazzolo DG, Nogueira Neto JF, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. 30-days effects of vildagliptin on vascular function, plasma viscosity, inflammation, oxidative stress, and intestinal peptides on drug-naïve women with diabetes and obesity: a randomized head-to-head metformin-controlled study. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Aug 23;11:70. doi: 10.1186/s13098-019-0466-2. PMID: 31462933; PMCID: PMC6708186.

174. To M, Kono Y, Ogura N, Mikami S, Honda N, Hitani A, Kano I, Haruki K, To Y. Obesity-related systemic oxidative stress: An important factor of poor asthma control. *Allergol Int*. 2018 Jan;67(1):147-149. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.002. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28648979.

175. Infante-Menéndez J, López-Pastor AR, González-López P, Gómez-Hernández A, Escribano O. The Interplay between Oxidative Stress and miRNAs in Obesity-Associated Hepatic and Vascular Complications. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul; 10;9(7):607. doi: 10.3390/antiox9070607. PMID: 32664383; PMCID: PMC7402144.
176. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Sep 29;16(1):120. doi: 10.1186/s12933-017-0604-9. PMID: 28962617; PMCID: PMC5622555.
177. Martinez-Hervas S, Navarro I, Real JT, Artero A, Peiro M, Gonzalez-Navarro H, Carmena R, Ascaso JF. Unsaturated Oral Fat Load Test Improves Glycemia, Insulinemia and Oxidative Stress Status in Nondiabetic Subjects with Abdominal Obesity. *PLoS One*. 2016 Aug 18;11(8):e0161400. doi: 10.1371/journal.pone.0161400. PMID: 27537847; PMCID: PMC4990252.
178. Nakano R, Takebe N, Ono M, Hangai M, Nakagawa R, Yashiro S, Murai T, Nagasawa K, Takahashi Y, Satoh J, Ishigaki Y. Involvement of oxidative stress in atherosclerosis development in subjects with sarcopenic obesity. *Obes Sci Pract*. 2017 Jan 27;3(2):212-218. doi: 10.1002/osp4.97. PMID: 28702214; PMCID: PMC5478807.
179. Salmon AB. Beyond Diabetes: Does Obesity-Induced Oxidative Stress Drive the Aging Process? *Antioxidants (Basel)*. 2016 Jul 18;5(3):24. doi: 10.3390/antiox5030024. PMID: 27438860; PMCID: PMC5039573.
180. Găman MA, Epîngeac ME, Diaconu CC, Găman AM. Evaluation of oxidative stress levels in obesity and diabetes by the free oxygen radical test and free oxygen radical defence assays and correlations with anthropometric and laboratory parameters. *World J Diabetes*. 2020 May 15;11(5):193-201. doi: 10.4239/wjd.v11.i5.193. PMID: 32477455; PMCID: PMC7243484.
181. Himbert C, Thompson H, Ulrich CM. Effects of Intentional Weight Loss on Markers of Oxidative Stress, DNA Repair and Telomere Length - a Systematic Review. *Obes Facts*. 2017;10(6):648-665. doi: 10.1159/000479972. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29237161; PMCID: PMC5836214.
182. Pilar Codoñer-Franch, Sandra Tavárez-Alonso, Raquel Simó-Jordá, Paz Laporta-Martín, Arturo Carratalá-Calvo, Eulalia Alonso-Iglesias, Vitamin D Status is Linked to Biomarkers of

Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Activation in Obese Children, *The Journal of Pediatrics*, Volume 161, Issue 5, 2012, Pages 848-854, ISSN 0022-3476, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.04.046>.

183. Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms of oxidative stress in diabetes: Implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci* 2004;9:565–574.

184. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al.. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:599–622.

185. Diaz-Meco MT, Moscat J. The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunol Rev* 2012;246:154–167.

186. Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, et al.. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: Emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2231–2242.

187. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, et al.. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 1999;44:215–222.

188. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405–412.

189. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701–711.

190. Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, et al.. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: The missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 2000;148:17–21.

191. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al.. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C—dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939–1945.

192. Russell AP, Gastaldi G, Bobbioni-Harsch E, et al.. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: A case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett* 2003;551:104–106.

193. Vincent HK, Powers SK, Dirks AJ, et al.. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:378–388.

194. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al.. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–1761.

195. Basu S, Riserus U, Turpeinen A, et al.. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. *Clin Sci (Lond)* 2000;99:511–516.

196. Schleicher RL, Carroll MD, Ford ES, et al.. Serum vitamin C and the prevalence of vitamin C deficiency in the United States: 2003–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Clin Nutr* 2009;90:1252–1263.
197. Kaidar-Person O, Person B, Szomstein S, et al.. Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: A new form of malnutrition? Part A: Vitamins. *Obes Surg* 2008;18:870–876.
198. Andersen LF, Jacobs DR, Jr., Gross MD, et al.. Longitudinal associations between body mass index and serum carotenoids: The CARDIA study. *Br J Nutr* 2006;95:358–365.
199. Kuno T, Hozumi M, Morinobu T, et al.. Antioxidant vitamin levels in plasma and low density lipoprotein of obese girls. *Free Radic Res* 1998;28:81–86.
200. Aasheim ET, Bohmer T. Low preoperative vitamin levels in morbidly obese patients: A role of systemic inflammation? *Surg Obes Relat Dis* 2008;4:779–780.
201. Canoy D, Wareham N, Welch A, et al.. Plasma ascorbic acid concentrations and fat distribution in 19,068 British men and women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Norfolk cohort study. *Am J Clin Nutr* 2005;82:1203–1209.
202. Myara I, Alamowitch C, Michel O, et al.. Lipoprotein oxidation and plasma vitamin E in nondiabetic normotensive obese patients. *Obes Res* 2003;11:112–120.
203. Weisstaub G, Hertrampf E, Lopez de Romana D, et al.. Plasma zinc concentration, body composition and physical activity in obese preschool children. *Biol Trace Elem Res* 2007;118:167–174.
204. Kaidar-Person O, Person B, Szomstein S, et al.. Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: A new form of malnutrition? Part B: Minerals. *Obes Surg* 2008;18:1028–1034.
205. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al.. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4476–4479.
206. Vincent HK, Bourguignon CM, Taylor AG. Relationship of the dietary phytochemical index to weight gain, oxidative stress and inflammation in overweight young adults. *J Hum Nutr Diet* 2010;23:20–29.
207. Wallstrom P, Wirfalt E, Lahmann PH, et al.. Serum concentrations of beta-carotene and alpha-tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *Am J Clin Nutr* 2001;73:777–785.
208. Decsi T, Molnar D, Koletzko B. Reduced plasma concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in obese boys. *J Pediatr* 1997;130:653–655.
209. Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:649–663.

210. Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome; Victoria M. Gershuni, Stephanie L. Yan, Valentina Medici; *Curr Nutr Rep* . 2018 September; 7(3): 97–106. doi:10.1007/s13668-018-0235-0
211. Wang S, Gu J, Xu Z, Zhang Z, Bai T, Xu J, Cai J, Barnes G, Liu QJ, Freedman JH, Wang Y, Liu Q, Zheng Y, Cai L. Zinc rescues obesity-induced cardiac hypertrophy via stimulating metallothionein to suppress oxidative stress-activated BCL10/CARD9/p38 MAPK pathway. *J Cell Mol Med*. 2017 Jun;21(6):1182-1192. doi: 10.1111/jcmm.13050. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28158919; PMCID: PMC5431126.
212. Duggan C, Tapsoba JD, Wang CY, Campbell KL, Foster-Schubert K, Gross MD, McTiernan A. Dietary Weight Loss, Exercise, and Oxidative Stress in Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Nov;9(11):835-843. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0163. PMID: 27803047; PMCID: PMC5117666.
213. Redman LM, Smith SR, Burton JH, Martin CK, Il'yasova D, Ravussin E. Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab*. 2018 Apr 3;27(4):805-815.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.019. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29576535; PMCID: PMC5886711.
214. Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, de Las Fuentes L, He S, Okunade AL, Patterson BW, Klein S. Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab*. 2016 Apr 12;23(4):591-601. doi: 10.1016/j.cmet.2016.02.005. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26916363; PMCID: PMC4833627.
215. Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. *Metabolomics*. 2019 Jun 13;15(6):93. doi: 10.1007/s11306-019-1553-y. PMID: 31197497; PMCID: PMC6565659.
216. Ketogenic diet increases mitochondria volume in the liver and skeletal muscle without altering oxidative stress markers in rats; Parry HA, Kephart WC, Mumford PW, Romero MA, Mobley CB, Zhang Y, Roberts MD, Kavazis AN; *Heliyon*. 2018 Nov 24;4(11):e00975; doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00975.

217. Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice; Nakao R, Abe T, Yamamoto S, Oishi K.; *Sci Rep*. 2019 Dec 23;9(1):19652. doi: 10.1038/s41598-019-56166-8.
218. Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity; Tiffany Greco, Thomas C Glenn, David A Hovda, Mayumi L Prins; *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Sep; 36(9): 1603–1613. Published online 2015 Oct 13. doi: 10.1177/0271678X15610584 PMID: PMC5012517
219. Metabolic Responses in Endothelial Cells Following Exposure to Ketone Bodies; Meroni E, Papini N, Criscuoli F, Casiraghi MC, Massaccesi L, Basilico N, Erba D; *Nutrients*. 2018 Feb 22;10(2). pii: E250. doi: 10.3390/nu10020250.
220. Roumans NJT, Vink RG, Bouwman FG, Fazelzadeh P, van Baak MA, Mariman ECM. Weight loss-induced cellular stress in subcutaneous adipose tissue and the risk for weight regain in overweight and obese adults. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Jun;41(6):894-901. doi: 10.1038/ijo.2016.221. Epub 2016 Dec 5. PMID: 27916987.
221. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab*. 2018 Jun 5;27(6):1212-1221.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2018.04.010. Epub 2018 May 10. PMID: 29754952; PMID: PMC5990470.
222. Slattery K, Bentley D, Coutts AJ: The role of oxidative, inflammatory and neuroendocrinological systems during exercise stress in athletes: implications of antioxidant supplementation on physiological adaptation during intensified physical training. *Sports Med* 2015;45:453–471
223. I.B. Adelani, E.O. Ogadi, C. Onuzulu, O.A. Rotimi, E.N. Maduagwu, S.O. Rotimi, Dietary vitamin D ameliorates hepatic oxidative stress and inflammatory effects of diethylnitrosamine in rats, *Heliyon*, Volume 6, Issue 9, 2020, e04842, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04842>.
224. Tirang R. Neyestani, Chapter 11 - Vitamin D, Oxidative Stress and Diabetes: Is There A Link?, Editor(s): Victor R. Preedy, *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*,

Academic Press, 2014, Pages 111-120, ISBN 9780124058859, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405885-9.00011-5>.

225. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol*. 2019 Jun;60(3):237-244. doi: 10.1016/j.pedneo.2019.04.007. Epub 2019 Apr 17. PMID: 31101452.

226. Fatemeh Imanparast, Farideh Jalali Mashayekhi, Fatemeh Kamankesh, Fatemeh Rafiei, Pegah Mohaghegh, Abbas Alimoradian, Improving the endothelial dysfunction in type 2 diabetes with chromium and vitamin D3 by reducing homocysteine and oxidative stress: A randomized placebo-controlled trial, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Volume 62, 2020, 126639, ISSN 0946-672X, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126639>.

227. Szymczak-Pajor I, Śliwińska A. Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients*. 2019 Apr 6;11(4):794. doi: 10.3390/nu11040794. PMID: 30959886; PMCID: PMC6520736.

228. Changmeng Cui, Pengfei Xu, Gongying Li, Yi Qiao, Wenxiu Han, Chunmei Geng, Dehua Liao, Mengqi Yang, Dan Chen, Pei Jiang, Vitamin D receptor activation regulates microglia polarization and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-exposed microglial cells: Role of renin-angiotensin system, *Redox Biology*, Volume 26, 2019, 101295, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101295>.

229. Taylor PN, Davies JS. A review of the growing risk of vitamin D toxicity from inappropriate practice. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 Jun;84(6):1121-1127. doi: 10.1111/bcp.13573. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29498758; PMCID: PMC5980613

230. Caroline Himbert, Jennifer Ose, Mahmoud Delphan, Cornelia M. Ulrich, A systematic review of the interrelation between diet- and surgery-induced weight loss and vitamin D status, *Nutrition Research*, Volume 38, 2017, Pages 13-26, ISSN 0271-5317, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.12.004>.

230. Wimalawansa SJ. Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging. *Biology*. 2019;8(2).

231. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients*. 2012;4(1):52-67.

232. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Annals of internal medicine*. 2010;152(5):307-14.

233. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International journal of clinical practice*. 2003;57(4):258-61.
234. Holick MF. Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(21):2287-8; author reply -8.
235. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Widespread vitamin D insufficiency: A new challenge for primary prevention, with particular reference to multiple sclerosis. *Presse medicale*. 2011;40(4 Pt 1):349-56.
236. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(2):419-46, table of contents.
237. Препоръки за диагностика, профилактика и лечение на дефицит и недостатъчност на витамин D. Българско дружество по ендокринология. 2019.
238. Borissova AM, Shinkov A, Vlahov J, Dakovska L, Todorov T, Svinarov D, et al. Vitamin D status in Bulgaria—winter data. *Archives of osteoporosis*. 2013;8:133.
239. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Experimental dermatology*. 2007; 16(7):618-25.
240. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(12):664-73.
241. Pike JW, Meyer MB. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014; 144 Pt A:5-11.
242. Fetahu IS, Hobaus J, Kallay E. Vitamin D and the epigenome. *Frontiers in physiology*. 2014;5:164.
243. Seuter S, Pehkonen P, Heikkinen S, Carlberg C. Dynamics of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-dependent chromatin accessibility of early vitamin D receptor target genes. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(12):1266-75.
244. Pan L, Matloob AF, Du J, Pan H, Dong Z, Zhao J, et al. Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation. *The FEBS journal*. 2010;277(4):989-99.
245. Doig CL, Singh PK, Dhiman VK, Thome JL, Battaglia S, Sobolewski M, et al. Recruitment of NCOR1 to VDR target genes is enhanced in prostate cancer cells and associates with altered DNA methylation patterns. *Carcinogenesis*. 2013;34(2):248-56.
246. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine reviews*. 2008;29(6):726-76.
247. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006;147(12):5542-8.

248. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(3):509-11.
249. Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;165(Pt B):369-81.
250. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(1):98-108.
251. Maestro B, Molero S, Bajo S, Davila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell biochemistry and function*. 2002;20(3):227-32.
252. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *Journal of molecular biology*. 2005;349(2):248-60.
253. Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. *The Biochemical journal*. 2017;474(8):1321-32.
254. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(2):E345-51.
255. Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;84(2-3):223-30.
256. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Gysemans C, Brusgaard K, Naamane N, Van Lommel L, et al. Unraveling the effects of 1,25OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on global gene expression in pancreatic islets. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;136:68-79.
257. Jayanarayanan S, Anju TR, Smijin S, Paulose CS. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation increases insulin level by regulating altered IP<sub>3</sub> and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(10):1041-9.
258. Bornstedt ME, Gjerlaugsen N, Olstad OK, Berg JP, Bredahl MK, Thorsby PM. Vitamin D metabolites influence expression of genes concerning cellular viability and function in insulin producing beta-cells (INS1E). *Gene*. 2020;746:144649.
259. Safarpour P, Daneshi-Maskooni M, Vafa M, Nourbakhsh M, Janani L, Maddah M, et al. Vitamin D supplementation improves SIRT1, Irisin, and glucose indices in overweight or obese type 2 diabetic patients: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *BMC family practice*. 2020;21(1):26.

260. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients; HM Dashti, TC Mathew, T Hussein, et al. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients. *Exp Clin Cardiol* 2004;9(3):200-205.
261. Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: a randomized double-blind placebo-controlled trial; G. Merra, S. Gratteri, A. De Lorenzo, S. Barrucco, M.A. Perrone, et al.; *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Jan;21(2):329-345
262. Nutritional Ketosis and Mitohormesis: Potential Implications for Mitochondrial Function and Human Health; Miller VJ, Villamena FA, Volek JS; *J Nutr Metab*. 2018 Feb 11; 2018:5157645. doi: 10.1155/2018/5157645
263. Acute Oxidative Stress and Systemic Nrf2 Activation by the Ketogenic Diet; Milder J, Liang L, Patel M; *Neurobiol Dis* . 2010 October ; 40(1): 238–244. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.030
264. The 1-Week and 8-Month Effects of a Ketogenic Diet or Ketone Salt Supplementation on Multi-Organ Markers of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Rats; Wesley C. Kephart, Petey W. Mumford, Xuansong Mao, Matthew A. Romero, Hayden W. Hyatt, Yufeng Zhang, Christopher B. Mobley, John C. Quindry, Kaelin C. Young, Darren T. Beck, Jeffrey S. Martin, Danielle J. McCullough, Dominic P. D’Agostino, Ryan P. Lowery, Jacob M. Wilson, Andreas N. Kavazis, Michael D. Roberts; *Nutrients*. 2017 Sep; 9(9): 1019. Published online 2017 Sep 15. doi: 10.3390/nu9091019
265. The ketogenic diet: Pros and cons; Blair O’Neill. Paolo Raggi; *Atherosclerosis*, 2020 (1, 292): 119-126; doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.021
266. A. S. T. Planting, G. Catimel, P. H. M. De Mulder et al., “Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer,” *Annals of Oncology*, vol. 10, no. 6, pp. 693–700, 1999.
267. Peternej TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med*. 2011;41:1043–1069.
268. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* (1985) 2001;90:724–731.
269. Bouzid MA, Filaire E, Matran R, Robin S, Fabre C. Lifelong Voluntary Exercise Modulates Age-Related Changes in Oxidative Stress. *Int J Sport Med*. 2018;39:21–28.

270. Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Resveratrol and exercise. *Biomed Rep.* 2016;5:525–530.
271. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011;214:337–346.
272. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:941868.
273. Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, Kouretas D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:901–910.
274. Reid MB. Redox interventions to increase exercise performance. *J Physiol.* 2016;594:5125–5133.
275. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr.* 2005;24:172–183.
276. Wu C, Zhao W, Yu J, Li S, Lin L, Chen X. Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. *Sci Rep.* 2018;8:574.
277. Vassalle C, Pingitore A, De Giuseppe R, Vigna L, Bamonti F. Biomarkers Part II: Biomarkers to Estimate Bioefficacy of Dietary/Supplemental Antioxidants in Sport. In: Lamprecht M, editor. *Antioxidants in Sport Nutrition.* 2015.
278. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition.* 2015;31:916–922.
279. Azlina MFN, Kamisah Y, Qodriyah MS. Tocopherol And Tocotrienol: Therapeutic Potential In Animal Models of Stress. *Curr Drug Targets.* 2017.
280. Peternej TT, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Med.* 2011;41:1043–1069.
281. Lohan SB, Vitt K, Scholz P, Keck CM, Meinke MC. ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of beta-carotene and VIS/NIR irradiation. *Chem Biol Interact.* 2018;280:1–7.
282. Staicu ML, Muresan A, Tache S, Moldovan R. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy. *J Med Life.* 2011;4:163–167.
283. Takahashi K, Takahashi M. Exogenous administration of coenzyme Q10 restores mitochondrial oxygen consumption in the aged mouse brain. *Mech Ageing Dev.* 2013;134:580–586.
284. Spindler M, Beal MF, Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2009;5:597–610.

285. Miles MV, Patterson BJ, Chalfonte-Evans ML, Horn PS, Hickey FJ, Schapiro MB, Steele PE, Tang PH, Hotze SL. Coenzyme Q10 (ubiquinol-10) supplementation improves oxidative imbalance in children with trisomy 21. *Pediatr Neurol.* 2007;37:398–403.
286. Pinazo-Duran MD, Shoaie-Nia K, Zanon-Moreno V, Sanz-Gonzalez SM, Del Castillo JB, Garcia-Medina JJ. Strategies to reduce oxidative stress in glaucoma patients. *Curr Neuropharmacol.* 2017.
287. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging.* 2007;2:377–387.
288. Teixeira J, Chavarria D, Borges F, Wojtczak L, Wieckowski MR, Karkucinska-Wieckowska A, Oliveira PJ. Dietary Polyphenols and Mitochondrial Function: Role in Health and Disease. *Curr Med Chem.* 2017.
289. Nieman DC, Laupheimer MW, Ranchordas MK, Burke LM, Stear SJ, Castell LM. A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance--Part 33. *Br J Sport Med.* 2012;46:618–620.
290. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:1377–1382.
291. Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381:253–263.
292. Maarman GJ. Natural Antioxidants as Potential Therapy, and a Promising Role for Melatonin Against Pulmonary Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017;967:161–178.
293. Seyyedebrahimi S, Khodabandehloo H, Nasli Esfahani E, Meshkani R. The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetol.* 2018.
294. Gliemann L, Nyberg M, Hellsten Y. Effects of exercise training and resveratrol on vascular health in aging. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:165–176.
295. Bisht K, Wagner KH, Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicol.* 2010;278:88–100.
296. Kasiotis KM, Pratsinis H, Kletsas D, Haroutounian SA. Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food Chem Toxicol.* 2013;61:112–120.
297. Chin YT, Hsieh MT, Yang SH, Tsai PW, Wang SH, Wang CC, Lee YS, Cheng GY, HuangFu WC, London D, Tang HY, Fu E, Yen Y, et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget.* 2014;5:12891–12907.
298. Wang G, Chen L, Pan X, Chen J, Wang L, Wang W, Cheng R, Wu F, Feng X, Yu Y, Zhang HT, O'Donnell JM, Xu Y. The effect of resveratrol on beta amyloid-induced memory impairment involves inhibition of phosphodiesterase-4 related signaling. *Oncotarget.* 2016;7:17380–17392. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8041>

299. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*. 2017. p. 6.
300. Heng MC. Signaling pathways targeted by curcumin in acute and chronic injury: burns and photo-damaged skin. *Int J Dermatol*. 2013;52:531–543.
301. Midura-Kiela MT, Radhakrishnan VM, Larmonier CB, Laubitz D, Ghishan FK, Kiela PR. Curcumin inhibits interferon-gamma signaling in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302:G85–96.
302. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat*. 2014;46:2–18.
303. Ryu EK, Choe YS, Lee KH, Choi Y, Kim BT. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J Med Chem*. 2006;49:6111–6119.
304. Monroy A, Lithgow GJ, Alavez S. Curcumin and neurodegenerative diseases. *Biofactors*. 2013;39:122–132.
305. Pellavio G, Rui M, Caliozna L, Martino E, Gastaldi G, Collina S, Laforenza U. Regulation of Aquaporin Functional Properties Mediated by the Antioxidant Effects of Natural Compounds. *Int J Mol Sci*. 2017. p. 18.
306. Chilelli NC, Ragazzi E, Valentini R, Cosma C, Ferrareso S, Lapolla A, Sartore G. Curcumin and *Boswellia serrata* Modulate the Glyco-Oxidative Status and Lipo-Oxidation in Master Athletes. *Nutrients*. 2016. p. 8.
307. Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Tonk S, Kuruva CS, Bhatti JS, Kandimalla R, Vijayan M, Kumar S, Wang R, Pradeepkiran JA, et al. Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid-beta in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;61:843–866.
308. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006; 147(12): 5542-5548.
309. Ketogenic Diets for Adult Neurological Disorders; McDonald TJW, Cervenka MC; *Neurotherapeutics*. 2018 Oct;15(4):1018-1031. doi: 10.1007/s13311-018-0666-8. Review.
310. Ketogenic Diet Modulates NAD<sup>+</sup>-Dependent Enzymes and Reduces DNA Damage in Hippocampus; Elamin M, Ruskin DN, Masino SA, Sacchetti P; *Front Cell Neurosci*. 2018 Aug 30;12:263. doi: 10.3389/fncel. 2018.00263.
311. Borissova AM, Shinkov A, Vlahov J, Dakovska L, Todorov T, Svinarov D, Kassabova L. Vitamin D status in Bulgaria--winter data. *Arch Osteoporos*. 2013;8:133. doi: 10.1007/s11657-013-0133-4. Epub 2013 Mar 23

312. Borissova A-M, Shinkov A, Vlahov J, Dakovska L, Todorov T, Svinarov D, Kassabova L. Frequency of Deficiency, Insufficiency and Sufficiency of Vitamin D in Bulgarian Population -(20-80 years old). *Endocrinologia* 2012; 17 (3):122-135.
313. Kennedy AR, Pissios P, Otu H, Roberson R, Xue B, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state O in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(6): E1724-1739.
314. Shukla SK, Gebregiworgis T, Purohit V, Chaika NV, Radhakrishnan P, et al. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab*, 2014; 2: 18.
315. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(2): E345-351.
316. Scragg R, Sowers M, Bell C, Third National H, Nutrition Examination S. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes care* 2004;27(12):2813-8.
317. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes care* 2001; 24(8): 1496.
342. Lips P, Eekhoff M, van Schoor N, Oosterwerff M, de Jongh R, Krul-Poel Y, et al. Vitamin D and type 2 diabetes. *J Steroid Bio-chem Mol Biol* 2017; 173: 280-285.
315. George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med: a journal of the British Diabetic Association*. 2012; 29(8): e142-150.
316. Jayanarayanan S, Anju TR, Smijin S, Paulose CS. Vitamin D3 supplementation increases insulin level by regulating altered IP3 and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat. *J Nutr Biochem* 2015; 26(10): 1041-1049.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Разрешително

Образец ЗХОЖ – 47/ Утвърден със Заповед № РД 11-2211/14.11.2016 г. на изпълнителния директор на БАБХ

 **РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ**  
**МИНИСТЕРСТВО НА ЗЕМЕДЕЛИЕТО, ХРАНИТЕ И ГОРИТЕ**  
**БЪЛГАРСКА АГЕНЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ**

**РАЗРЕШИТЕЛНО**  
**за използване на животни в опити № 316**

Настоящото разрешително се издава на **д-р Маргарита Строкова-Стоилова, Катедра по фармакология и токсикология, Медицински Университет, гр. София** (име, презиме и фамилия на собственика/управителя на обекта, в който се провеждат опити с животни)

на обекта с вет. регистрационен № **1 4 3 1 - 0 0 0 1**

и адрес: гр. София 1431, ул. „Здраве“ № 2  
(седалище, адрес на управление на юридическото лице)

БУЛСТАТ 8313857370037

за използване на **40 (четиридесет) броя мишки**  
(вид и брой опитни животни)

Целта на опитите/научните изследвания, за които ще се използват животните е за **“Оценка на нивата на прооксидантни, антиоксидантни и метаболитни показатели при опитни животни с различни хранителни режими”**.

Ръководителят на екипа, който ще провежда опитите/научните изследвания е:  
**д-р Маргарита Строкова-Стоилова**

За спазването на изискванията за хуманно отношение към опитните животни ще отговарят:  
**д-р Зафер Сабит**

Разрешението е вписано в регистъра на БАБХ за използване на опитни животни с регистрационен № 316 и е валидно до **15.10.2026 г.**

Настоящото разрешително се издава на основание чл. 155, ал. 7 от ЗВД и становището на комисията по етика № 232 от **06.10.2021 г.**, неразделна част от разрешението.

**Д-Р ХРИСТО ВЪЛЧАНОВ**  
**ИЗПЪЛНИТЕЛЕН ДИРЕКТОР**



**СТАНОВИЩЕ № 232**  
**към Разрешително за използване на животни в**  
**опити № 316**

на Комисията по етика към животните  
към Българската агенция по безопасност на храните

**Относно:** Заявление от д-р Маргарита Строчева-Стоилова, Катедра по фармакология и токсикология, Медицински Университет, гр. София за получаване на Разрешително по чл. 5, ал. 1 от Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, за използване на

40 (четирдесет) броя мишки

На заседанието си проведено на 06.10.2021 г. – Протокол № 25, Комисията дава положително становище с № 232 за издаването на Разрешително, като препоръчва при провеждането на експериментите да бъдат съблюдавани строго изискванията за работа с особено опасни вирусни инфекции и зоонози.

Д-Р ХРИСТО ВЪЛЧАНОВ  
ИЗПЪЛНИТЕЛЕН ДИРЕКТОР



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**РЕКТОРАТ**

София 1431, Бук. „Акад. Ив. Евст. Гешов“ 15  
тел.: +359 2 9152 129, факс: +359 2 953 2816, e-mail: rector@mu-sofia.bg, www.mu-sofia.bg

№ 157/13.01.2021

ДО  
МАРГАРИТА ВЛАДИМИРОВА  
СТРОКОВА-СТОИЛОВА  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И  
ТОКСИКОЛОГИЯ, МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**Отнено:** Експертна етична оценка на научна разработка с пореден № 77 на обсъждане в КЕНИМУС, по преписка с вх. № 6992/04.11.2021 г,

**УВАЖАЕМА Г-ЖО СТОИЛОВА,**

Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет София, на свое заседание проведено на 16.12.2021 г. разгледа експертната етична оценка на методологията и документацията по научно изследване на тема „Оценка нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D“ и мотивира положително решение за провеждането на научните изследвания и публикуване на резултатите.

ПРЕДСЕДАТЕЛ НА КЕНИМУС:  
ДОЦ. А. ВОДЕНИЧАРОВА, ДМ

РЕКТОР:  
АКАД. Я. ТРАЙКОВ, ДМН



Изготвил:  
Натали Димитрова  
Секретар на КЕНИМУС:

## Приложение 2

### НАУЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ОКСИДАТИВЕН СТРЕС И ВИТАМИН D

#### КАРТА НА ПАЦИЕНТА

##### АНКЕТА

Номер на пациента	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	дата	
Възраст (г)		Пол	
Ръст (см)		Тегло (кг)	

Теглото Ви промени ли се след началото на COVID кризата?	<input type="radio"/> Напълнях значително <input type="radio"/> Малко напълнях <input type="radio"/> Отслабнах значително <input type="radio"/> Малко отслабнах <input type="radio"/> Не се е променило
Правили ли сте опити за редукция на тегло?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Запознати ли сте с препоръките за здравословно хранене?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не

**Приемали ли сте лекарства или хранителни добавки за отслабване? Ако отговорът е „Да“, моля попълнете:**

Какви?	
Колко дълго?	<input type="radio"/> Няколко седмици <input type="radio"/> Няколко месеца <input type="radio"/> По-дълго
Консултирахте ли се с лекар?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Имаше ли резултат?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Колко килограма отслабнахте?	<input type="radio"/> 1-5 кг <input type="radio"/> 5-10 кг <input type="radio"/> Над 10 кг <input type="radio"/> Друго, моля отбележете.....

Наблюдавахте ли нежелани реакции?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Ако да, какви?	
Напълняхте ли обратно след като спряхте приема?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не

**Поръчвали ли сте хранителни добавки за отслабване от интернет? Ако отговорът е „Да“, моля попълнете:**

Какви?	
Проверихте ли предварително сайта?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не <input type="radio"/> Приятелка ми го препоръча
Консултирахте ли се с лекар?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Имаше ли резултат?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Наблюдавахте ли нежелани реакции?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Ако да, какви?	

### **Физическа активност**

Определете как минава Вашият ден:	<input type="radio"/> В офис / вкъщи, но излизам редовно <input type="radio"/> Почти цял ден съм на крак <input type="radio"/> Физически труд <input type="radio"/> Работя / Предимно си стоя вкъщи
Колко често правите физически упражнения?	<input type="radio"/> 4 пъти седмично <input type="radio"/> 2-3 пъти седмично <input type="radio"/> Веднъж седмично <input type="radio"/> Не правя физически упражнения
Колко минути на ден ходите пеша?	<input type="radio"/> Повече от 60 минути <input type="radio"/> 30-60 минути <input type="radio"/> По-малко от 30 минути <input type="radio"/> Не ходя пеша
Когато излизате или извън дома:	<input type="radio"/> Ползвам автомобил или обществен транспорт <input type="radio"/> Ходя пеша <input type="radio"/> Карам велосипед
Ако трябва да се качите по стълбите или с асансьора:	<input type="radio"/> Винаги се качвам по стълбите

	<input type="radio"/> Ползвам асансьор само когато съм с багаж <input type="radio"/> Понякога ползвам стълбите <input type="radio"/> Винаги ползвам асансьор
През почивните дни:	<input type="radio"/> Помагам на семейството в домашните задължения <input type="radio"/> Правя кратки разходки <input type="radio"/> Прекарвам голяма част от деня навън, в движение <input type="radio"/> През по-голямата част от деня чета книга, гледам телевизия или съм пред компютъра
Лесно ли губите мотивация а активно движение / спорт?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не

### Хранителен режим

Колко пъти дневно се храните?	<input type="radio"/> Веднъж <input type="radio"/> Два пъти <input type="radio"/> Три пъти <input type="radio"/> Повече от три пъти
Как бихте определили количеството на поеманите храни на порция?	<input type="radio"/> Малко <input type="radio"/> Средно <input type="radio"/> Голямо
Спазвате ли специален режим на хранене?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Ако да, в какво се изразява той?	<input type="radio"/> Да, с понижено съдържание на въглехидрати <input type="radio"/> Да, с понижено съдържание на мазнини <input type="radio"/> Да, вегетариански <input type="radio"/> Да, веган съм <input type="radio"/> Да, контролирам количеството на поеманите калории <input type="radio"/> Да, временно / интервално гладуване <input type="radio"/> друго
Солите ли допълнително храната си?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Не
Какво количество вода приемате на ден?	<input type="radio"/> 1-2 чаши <input type="radio"/> Около 1 литър <input type="radio"/> >1,5 литра

**Колко често употребявате от посочените групи храни?** Моля, отбележете всички отговори, които се отнасят към Вас

	Не консумирам	Рядко	Един път седмично	Два пъти седмично	Всеки ден
--	---------------	-------	-------------------	-------------------	-----------

Месо	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Риба	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Мляко и млечни продукти	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Зърнени храни	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Бобови храни	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Мазнини, мазни храни (бекон, масло, маргарин)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Пресни зеленчуци	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Пресни плодове	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Сладки храни (бонбони, сладкиши, безалкохолни напитки)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Колко често употребявате алкохолни напитки от посочените видове?**

	Всеки ден	Два-три пъти седмично	Един път седмично	Два-три пъти месечно	По-малко от 2 пъти месечно	Не употребявам
Бира	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Вино	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
концентрат	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Тютюнопушене**

Пушите ли?	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Какви цигари пушите?	<input type="radio"/> Бездимни цигари <input type="radio"/> Традиционни цигари <input type="radio"/> Друго (моля отбележете).....
По колко цигари на ден пушите	<input type="radio"/> <5 <input type="radio"/> 5-10 <input type="radio"/> 10-20 <input type="radio"/> >20

**Сън**

Колко часа спите през нощта?	<input type="radio"/> <4 часа <input type="radio"/> 4-6 часа <input type="radio"/> 6-8 часа <input type="radio"/> >8 часа
Трудно ли заспивате?	<input type="radio"/> Не <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Често <input type="radio"/> Винаги
Будите ли се нощем	<input type="radio"/> Не <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Често <input type="radio"/> Винаги

#### Витамини

Приемате ли витамини	<input type="radio"/> Да <input type="radio"/> Не
Ако да, какви?	

#### Хранителни нагласи

Средно, през типична седмица (7 дни)

Колко често закусвате?	<input type="radio"/> Всяка сутрин <input type="radio"/> 2-3 пъти седмично <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Не закусвам
Кое е най-обилното Ви хранене?	<input type="radio"/> Закуска <input type="radio"/> Обяд <input type="radio"/> Вечеря <input type="radio"/> Друго (моля, отбележете)..... .....
Колко често похапвате нещо след последното хранене за деня? (0-7)	<input type="radio"/> Всяка вечер <input type="radio"/> 2-3 пъти седмично <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Никога
Колко често се събуждате през нощта, за да похапнете? (0-7)	<input type="radio"/> Всяка нощ <input type="radio"/> 2-3 пъти седмично <input type="radio"/> Понякога <input type="radio"/> Никога

#### Витамин Д

Как определяте степента на своето излагане на слънце?	<input type="radio"/> Ниско / много ниско <input type="radio"/> Средно <input type="radio"/> Високо
Как реагира кожата Ви при първо излагане на слънце през летния сезон:	<input type="radio"/> Винаги изгаря, никога не потъмнява <input type="radio"/> Изгаря лесно, много слабо потъмнява

	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Понякога изгаря, потъмнява постепенно</li><li>○ Трудно изгаря, потъмнява добре</li><li>○ Рядко изгаря, потъмнява до голяма степен</li><li>○ Никога на изгаря, дълбока пигментация</li></ul>
--	---

**Друга информация / коментари**

--



## Приложение 3

### ИНФОРМАЦИОНЕН ЛИСТ ЗА УЧАСТНИКА В ИЗСЛЕДВАНЕТО

**Заглавие на проекта: Оценка нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D.**

Уважаеми Госпожо/ Господине,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект към МУ София.

Целта на проекта е оценка нивата на оксидативен стрес при различни хранителни режими и установяване на протективното влияние на витамин D.

След получаване на писмено съгласие от Ваша страна, ще Ви бъде предоставена анкета, където да попълните информация за Вашите хранителни и двигателни навици и ще Ви бъде взета проба за биологично изследване (кръв) за определяне на нивата на витамин D и тези на глутатион пероксидаза (мощен клетъчен антиоксидант). Изследването ще бъде безплатно за Вас и ще получите своите резултати своевременно.

Изследователският екип ще има достъп до резултатите от Вашето изследване на нива на витамин D и глутатион пероксидаза и до данните, които сте попълнили в анкетата, но не и до Вашите лични данни.

Ако резултатите от това изследване бъдат публикувани, то самоличността на изследваното лице ще остане неразкрита.

Аз, долуподписаният.....

Съм съгласен да участвам доброволно в изследването.

Разбирам, че съм свободен да се откажа от участие в изследването по всяко време, без да давам обяснения за отказа си и без това да повлияе на полагащите ми се в бъдеще медицински грижи.

Бях подробно информиран/а относно целта, същността и значението на това изследване. Беше ми предоставена възможност да задавам въпроси относно подробности за ползата и рисковете от провеждането на това изследване. Получих задоволителни отговори на всички въпроси поставени от мен. Беше ми предоставено достатъчно време да взема решение за настоящето съгласие. Запознат съм с регламента GDPR за предоставяне и обработване на лични данни за целите на медицинската диагноза и документация.

Подпис:

Дата: